



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

EVALUACIÓN DE LA CEPA VACUNAL RB51 DE *B. abortus* COMO VECTOR DE UN PLÁSMIDO VACUNAL ANTIRRÁBICO EN UN MODELO CELULAR. Estudio preliminar

Marzo 2026

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIATURA EN QUÍMICO
FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

UBALDO LÓPEZ ESLI

D.C. NIDIA GARY PAZOS SALAZAR
DIRECTORA DE TESIS

D.C. GUADALUPE ROJAS SÁNCHEZ
ASESORA DE TESIS

Agradecimientos

*Aquello que fue, ya es; y lo que ha de ser,
fue ya; y Dios restaura lo que pasó.
Eclesiastés 3:15.*

Primeramente, agradezco a Dios por la vida y la oportunidad de concluir con este trabajo de investigación, así como llenarme de amor y de las ricas bendiciones de las que hoy en día está rodeada mi vida, por los buenos y los malos momentos con los que llego hasta el día de hoy y los que están por venir.

A mi familia; a mis padres Saúl y Griselda, sin ustedes siquiera imaginar incursionar en la universidad y posteriormente en el desenlace de esta investigación no sería posible, porque cuando sentía que ya no podía, la confianza que siempre han depositado en mí me hacía seguir adelante, por el sustento y por su amor incondicional del que siempre me han llenado, por las enseñanzas que me han dado que no siempre han sido habladas sino demostradas con hechos. A mi hermana Miriam, sin lugar a duda has sido como una segunda madre para mí, todo el amor y apoyo que me has brindado tanto académico como emocional, porque cuando las cosas salían mal, sabía que al llegar a casa siempre estarías ahí para mí, dispuesta a escuchar mis experimentos fallidos y a lidiar con mi frustración; a lado de ustedes tres siempre he sentido que todo es posible, los amo con todo el corazón. A quienes siempre me han apoyado, tío Melquiades, tía Edith y Oli junto a quien he crecido.

A la doctora Nidia, gracias por su apoyo incondicional porque no solo me ha guiado académicamente, con toda confianza puedo decir que siempre ha sido un apoyo emocional, además, no solo me abrió las puertas del laboratorio sino a un mundo nuevo lleno de conocimiento y oportunidades que nunca pensé tener y también a una gran familia que en conjunto con los compañeros fuimos construyendo. A mi comisión revisora; maestra Laura, maestra Lore y doctora Nora por sus correcciones que contribuyeron a la mejora de este trabajo.

A mis amigas Eve y Mariana, porque cuando sentía que ya no podía con la carrera siempre estaban ahí para darme ánimos para seguir adelante, porque cuando les contaba de mi frustración en los experimentos fallidos siempre me decían “sí se puede”, “tú sabes mucho de eso, si te van a salir ya verás”, las quiero mucho. A mis ex compañeros de laboratorio: Fer, Vicky, Gaby, Adri, Migue, Uri, a lo largo de los años que compartimos juntos, me he quedado con parte de ustedes. A mis compañeros de laboratorio; con un reconocimiento especial a Alam, porque sabemos que gran parte de este trabajo te pertenece, gracias por acompañarme y ayudarme en los experimentos, por tu apoyo cuando más lo necesitaba, por compartir el estrés y la frustración conmigo y siempre buscar opciones de mejora para que esto saliera bien, a Julian, Willy, Bris, Tani. Brandon, Sebas, Ale y Mari, por ser mis compañeros de bromas, de juegos, de salidas, de comidas, todos ustedes hicieron que la estadía en el laboratorio fuera de las mejores experiencias de mi vida y se convirtieron en mi segunda familia, los quiero con todo el corazón.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	8
2. ANTECEDENTES	9
2.1. <i>Brucella abortus</i> RB51	9
2.2. Rabia.....	10
2.2.1. Prevención de la rabia	11
2.3. Glicoproteína G.....	12
2.4. Plásmidos vacunales	13
2.4.1. Plásmido vacunal antirrábico pBBR1-CMV-Ggp-SV40+.....	14
2.5. Mecanismo de acción de los plásmidos vacunales	15
2.6. Uso de plásmidos vacunales antirrábicos	16
2.7. Entrega de plásmidos vacunales	17
2.8. Bacterias intracelulares como vectores	17
2.8.1. RB51 como vector	18
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
4. JUSTIFICACIÓN	19
5. HIPÓTESIS	19
6. OBJETIVOS	19
6.1. Objetivo general.....	19
6.2. Objetivos particulares	19
7. METODOLOGÍA	20
7.1. Diagrama de trabajo	20
7.2. Cultivo de las cepas	20
7.3. Purificación de plásmido.....	21
7.4. Cultivo de células HeLa	21
7.4.1. Cuantificación de células	21
7.5. Caracterización de las cepas de RB51.....	22
7.6. Identificación del momento óptimo del crecimiento de las cepas de RB51 para la infección celular	22
7.7. Cultivo de las cepas para preparar el inóculo de infección	23
7.8. Evaluación de RB51/pBBR1-CMV-Ggp-SV40+ como vector	23
7.8.1. Preparación de la placa.....	23

7.8.2.	Extracción de ARN.....	24
7.8.3.	RT-PCR	24
7.8.4.	Análisis de la expresión de ARNm de la gpG.....	25
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
8.1.	Purificación de plásmido pBBR1-CMV-Ggp-SV40+	25
8.2.	Caracterización molecular de RbV y RbT	26
8.3.	Momento óptimo del crecimiento de RbV y RbT.....	27
8.4.	Conteo celular para la preparación de los pozos para cada variable	29
8.5.	Preparación del inóculo de infección y conteo final de UFC.....	30
8.6.	Extracción ARN	31
8.7.	RT-PCR.....	32
8.8.	Expresión de ARNm de la gpG.....	33
9.	CONCLUSIONES	38
10.	PERSPECTIVAS	38
11.	BIBLIOGRAFÍA	39
12.	ANEXOS	45
	Anexo 1. Conteo de UFC de RB51 y RB51/pBBR1-CMV-Ggp-SV40+ para determinar el momento óptimo de crecimiento	45
	Anexo 2. Protocolos de amplificación usados	46
	Anexo 3. Infección de las monocapas de HeLa	47
	Anexo 4. Morfología de las monocapas de HeLa 24 y 48 h post tratamiento.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURA DEL LIPOPOLISACÁRIDO PRESENTE ESPECIES DEL GÉNERO <i>BRUCELLA</i>	10
FIGURA 2. ESTRUCTURA Y GENOMA DEL VIRUS DE LA RABIA.	11
FIGURA 3. GLICOPROTEÍNA G DEL VIRUS DE LA RABIA.	12
FIGURA 4. ESTRUCTURA DE UN PLÁSMIDO VACUNAL.	13
FIGURA 5. ESTRUCTURA DEL PLÁSMIDO PBBR1-CMV-GGP-SV40+.	14
FIGURA 6. FUNCIONAMIENTO DE LOS PLÁSMIDOS VACUNALES,	16
FIGURA 7. CUANTIFICACIÓN EN CÁMARA DE NEUBAUER.	22
FIGURA 8. FORMULA USADA PARA DETERMINAR UFC/ML.	23
FIGURA 9. INTEGRIDAD Y CONCENTRACIÓN DEL PLÁSMIDO PURO OBTENIDO.	25
FIGURA 10. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS DE <i>BRUCELLA ABORTUS RB51</i>	26
FIGURA 11. CONTEO DE UFC.	27
FIGURA 12. GRÁFICAS DE UFC Y D.O.	29
FIGURA 13. CONTEO CELULAR A PARTIR DEL CUAL SE REALIZÓ LA PLACA.	29
FIGURA 14. SUSPENSIÓN DE CADA CEPA PARA LA PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE INFECCIÓN.	30
FIGURA 15. EXTRACCIÓN DEL ARN EXTRAÍDO DE LOS TRIPLICADOS DE CADA VARIABLE.	31
FIGURA 16. DEMOSTRACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA GP G EN LAS MONOCAPAS INFECTADAS.	34
FIGURA 17. REACCIONES DE AMPLIFICACIÓN REPETIDAS.	35
FIGURA 18. CONTEO DE UFC PARA RbV Y RbT.	45
FIGURA 19. INFECCIÓN DE LAS MONOCAPAS DE CÉLULAS HeLa.	47
FIGURA 20. MORFOLOGÍA DE LAS MONOCAPAS DE CÉLULAS HeLa REGISTRADA 24 H POSTRATAMIENTO.	48
FIGURA 21. MORFOLOGÍA REGISTRADA EN LAS MONOCAPAS DE CÉLULAS HeLa 48 H POSTRATAMIENTO	49

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. MANEJO DE LAS VARIABLES ANALIZADAS PARA EVALUAR LA CEPA RB51 /PBBR1-CMV-GGP-SV40+	24
TABLA 2. D.O Y UFC OBTENIDAS A LOS 3 TIEMPOS EVALUADOS.	27
TABLA 3. CONCENTRACIÓN DE ARN DE LAS REPETICIONES DE CADA VARIABLE Y CONCENTRACIÓN USADA POR REACCIÓN A LAS 24 Y 48 HORAS POST-MANEJO.	32
TABLA 4. CONCENTRACIÓN USADA EN LAS REACCIONES REPETIDAS.	35
TABLA 5. RESULTADOS OBTENIDOS DE AMPLIFICACIÓN DE CADA TRIPLICADO DE CADA VARIABLE.	36
TABLA 6. PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN DE ERI Y GPG	46
TABLA 7. PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN DE B-GLOBINA Y GLI	46

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

APCs: Células presentadoras de antígeno.

ARN: Ácido ribonucleico.

AST: Agar soya tripticasa.

C: Control negativo.

Clo: Cloranfenicol.

CMV: Citomegalovirus.

CST: Caldo soya tripticaseína.

CVS: Challenge virus strain.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium.

EGA: Electroforesis en gel de agarosa.

gpG: Glicoproteína G.

h.p.i: Horas post-inoculación.

MHC I: Complejo mayor de histocompatibilidad tipo I.

MHC II: Complejo mayor de histocompatibilidad tipo II.

MP: Marcador de peso.

Nal: Ácido nalidixico.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OMSA: Organización Mundial de Sanidad Animal.

P: Control positivo de expresión.

PBS: Buffer salino de fosfatos.

RbV: *Brucella* RB51 no transformante.

RbT: *Brucella* RB51 transformante.

SENASICA: Servicio nacional de sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria.

SFB: Suero Fetal Bovino.

UFC: Unidades Formadoras de Colonia.

1. INTRODUCCIÓN

La brucelosis y la rabia son enfermedades que afectan a diversas especies de interés ganadero, entre ellas, el ganado bovino estimándose pérdidas económicas de hasta \$51 000.00 por cabeza de ganado para la rabia y de 17 millones de dólares para la brucelosis (Córdova Izquierdo et al., 2020). Para ambas enfermedades, la mejor estrategia de erradicación y control es la vacunación.

La brucelosis en ganado bovino produce abortos e infertilidad y es ocasionada por bacterias del género *Brucella*, es transmitida por el consumo de alimentos o agua contaminados, así como el contacto con tejidos infectados. Para su prevención se usan las cepas atenuadas S19 y RB51 de *B. abortus*. La cepa RB51 es una cepa denominada rugosa por su morfología colonial y es ampliamente usada alrededor del mundo para la inmunización del ganado bovino, al no presentar oligosacárido O en su pared bacteriana, no genera anticuerpos anti-LPS, por lo cual, no interfiere con pruebas serológicas, permitiendo diferenciar a animales vacunados de enfermos.

La rabia es una neuroencefalitis ocasionada por el virus de la rabia perteneciente al género *Lyssavirus*, es transmitida al ganado bovino principalmente por el murciélago hematófago. Actualmente, para su prevención, se aplican vacunas de virus inactivados o activos modificados; también, se ha demostrado que en modelo murino, plásmidos vacunales codificantes del gen de la glicoproteína G del virus de la rabia inducen respuesta protectora contra el desafío con este virus, en dichos estudios se han administrado vía intramuscular, intradérmica e intranasal (Tesoro CE, 2008; Wang et al., 1997; Zhi Quan Xiang et al., 1994) y no se ha explorado la posibilidad de emplear bacterias intracelulares como vectores, como el caso de cepas de *Salmonella typhimurium* que han entregado eficientemente plásmidos codificantes de las proteínas S, RBD, NTD, HR, N y RdRp de SARS-CoV-2 o de *Listeria monocytogenes* que ha entregado plásmidos codificantes del complejo antígeno 85 y la proteína MPB/MPT51 de *Mycobacterium tuberculosis* (Dan Zhu et al., 2022; Lloren et al., 2023; Miki et al., 2004).

Las bacterias del género *Brucella* son naturalmente intracelulares por lo que, han sido usadas como vectores para la entrega de proteínas heterólogas de *Mycobacterium bovis* (Sabio et al., 2010) y *Babesia bovis* (Sabio y García et al., 2008) demostrando en modelo

murino, activación de respuesta inmune contra las proteínas de *M. bovis*, *B. bovis* y contra ella misma.

En el laboratorio de infectología molecular (LIM) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, se cuenta con la cepa vacunal RB51 transformante con el plásmido vacunal antirrábico pBBR1-CMV-Ggp-SV40+ de expresión eucariota codificante de la glicoproteína G. Este trabajo busca evaluar la capacidad de esta cepa transformante como vector para la entrega de este plásmido, aportando datos para su posible desarrollo como vacuna bivalente; así como, generar aportes a la literatura del uso de *Brucella* como vector.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Brucella abortus* RB51

La brucelosis es una enfermedad que afecta al ganado bovino produciendo abortos e infertilidad y es ocasionada por bacterias intracelulares pertenecientes al género *Brucella*. Según el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y calidad agroalimentaria (SENASICA), en México, de enero a septiembre del 2025, se han registrado 3450 casos positivos a brucelosis bovina (SENASICA, 2025b). En la actualidad las vacunas recomendadas por la Organización Mundial de Sanidad Animal OMSA contra la brucelosis bovina corresponden a las cepas atenuadas S19 y RB51 de *B. abortus* (OMSA, 2022).

La cepa vacunal RB51 fue producida a partir de la cepa 2308 de *B. abortus* mediante el pasaje en serie de ésta en medio con rifampicina. Cuenta con diferentes mutaciones que la hacen apta como vacuna, (Bricker et al, 2020), una de las más representativas es la ausencia del oligosacárido O en el lipopolisacárido (LPS) presente en la pared bacteriana (figura 1); por lo que, a diferencia de la cepa S19, no produce anticuerpos anti-LPS de larga duración permitiendo la diferenciación de animales vacunados de infectados mediante pruebas serológicas al no interferir en éstas; además, esta mutación genera una diferenciación morfológica en cultivo en placa al producir colonias con bordes rugosos, designándose así como una cepa rugosa (Dorneles et al., 2015; PRONABIVE, 2019).

La protección del ganado bovino contra la brucelosis es importante ya que causa pérdidas económicas al producir abortos e infertilidad, además, al ser considerada una zoonosis, el control de la enfermedad en ganado impacta favorablemente en la salud humana.

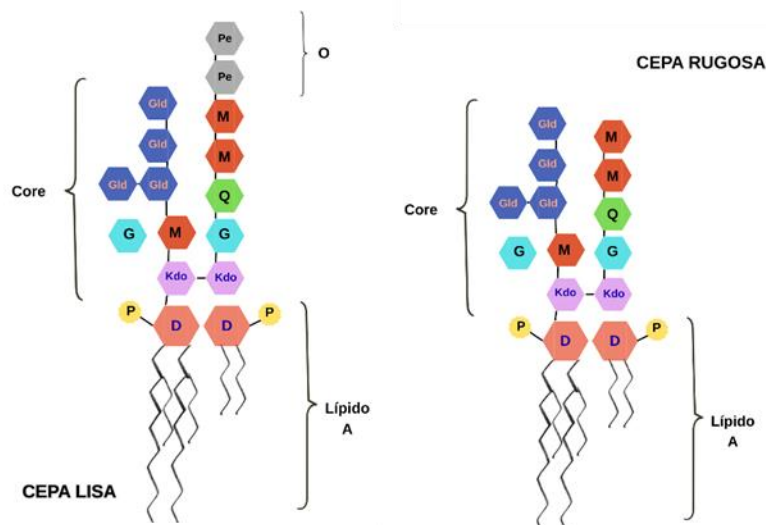


Figura 1. Estructura del lipopolisacárido presente especies del género *Brucella* mostrando la presencia o ausencia del oligosacárido O en especies lisas y rugosas. D: diaminoglucosa, G: glucosa, Ga: galactosa, Gln: glucosamina, H: heptosa, Kdo: ácido 3-desoxi-D-manosa-2-octulosónico, M: manosa, N: N-acetilglucosamina, Pe: N-formilperosamina; P: quinovosamina.. Tomado y adaptado de Stranahan & Arenas-Gamboa, 2021.

2.2. Rabia

La rabia es una enfermedad neurológica ocasionada por el virus de la rabia perteneciente al género *Lyssavirus* (figura 2); este es un virus envuelto en forma de bala, su genoma es de ARN de cadena sencilla no segmentado con polaridad negativa, tiene un tamaño de 12 Kb y codifica para cinco proteínas estructurales: proteína de matriz (M) que participa en el ensamblaje, morfogénesis y gemación del virus, la glicoproteína (G) ligando viral que permite la endocitosis del virus hacia la célula y es el mejor inmunógeno del virus (figura 3), la nucleoproteína (N) que empaqueta el ARN viral y la fosfoproteína (P) que funciona como cofactor de la ARN polimerasa (L). Las proteínas N, P y L forman la nucleocápside y un complejo ribonucleoproteico que permite la transcripción del ARNm del virus, la envoltura la conforman las proteínas M y G (Yin et al., 2021; Zandi et al., 2021).

Este virus, produce rabia paralítica bovina que concluye con la muerte de los animales; según el SENASICA, de enero a septiembre de 2025, en México se registraron 239 casos positivos (SENASICA, 2025a).

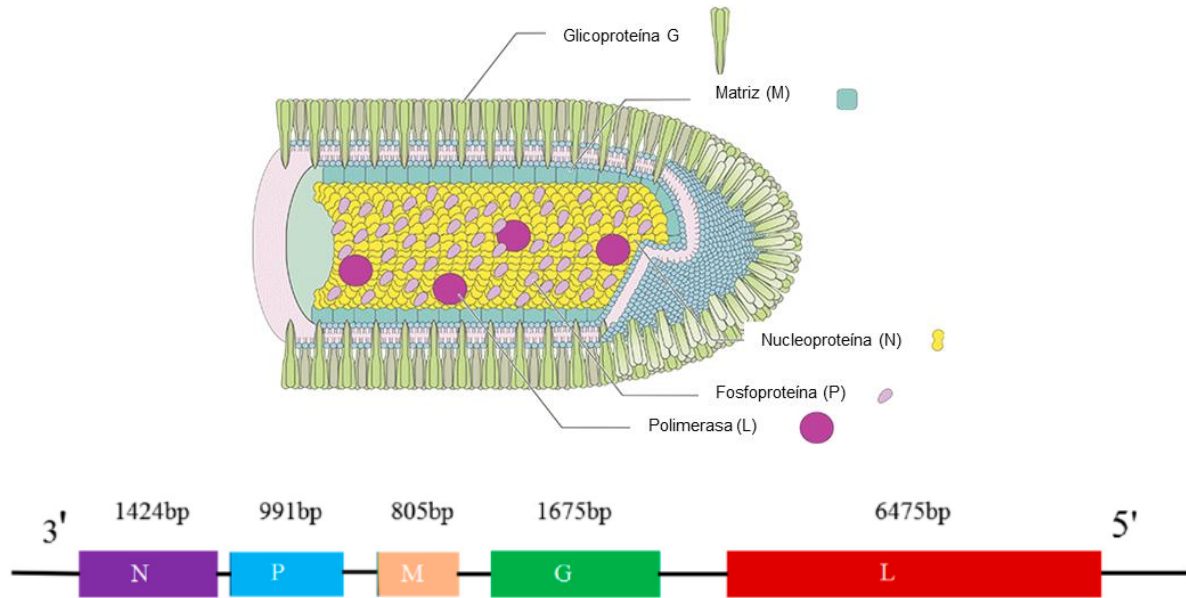


Figura 2. Estructura y genoma del virus de la rabia. Adaptado de Davis et al., 2015; Yin et al., 2021

2.2.1. Prevención de la rabia

La mejor estrategia de control y erradicación de esta enfermedad es la vacunación, actualmente se hace uso de tres clases de vacunas: inactivadas, vivas atenuadas y recombinantes. Las primeras se producen a partir de tejido cerebral de cabras, ovejas y ratones infectados con el virus de la rabia; sin embargo, debido a reportes de alergias, virulencia residual y algunos efectos neuoparalizantes, la Organización Mundial de la salud (OMS) recomendó que estas fueran sustituidas por vacunas inactivadas generadas en cultivos celulares (Abedi et al., 2023; Yang et al., 2013). Las vacunas vivas atenuadas se hacen a partir de pases en serie del virus en diferentes tipos celulares, logrando así disminuir la patogenicidad de éste; a pesar de que se ha comprobado que estas vacunas son seguras para vacunación animal, en 2004 la OMS dejó de recomendar estas vacunas en inoculación parenteral para perros, al presentarse algunos efectos adversos como anorexia, fiebre, paresia y parálisis; además la manipulación de estas vacunas puede ser complicada por la sensibilidad térmica que pueden presentar (Liu et al., 2014; Natesan et al., 2023). Para las vacunas recombinantes se ha hecho uso de virus como vectores de epítomos pertenecientes al virus de la rabia, ejemplo de esto son vacunas orales para animales salvajes, perros y gatos, en las que

se usó adenovirus y poxivirus que expresaban a la glicoproteína G del virus de la rabia; ambos han sido usados en Estados Unidos y Europa (Knowles et al., 2009; Wang et al., 1997).

2.3. Glicoproteína G

La glicoproteína G (gpG) del virus de la rabia es una proteína trimérica con 3 dominios: intracelular, transmembranal y extracelular (figura 3A), este último a su vez se divide en cuatro subdominios (Hellert et al., 2020); de las 5 proteínas estructurales que codifica el ARN del virus, esta es la única expuesta en la superficie viral. Juega un papel importante en el mecanismo de infección y supervivencia del virus, está directamente asociada al neurotropismo por el reconocimiento y adhesión a los receptores de acetilcolina, heparán sulfato, NCAM, p74NTR, mGluR2 e integrina $\beta 1$, mediando la endocitosis del virus en la célula, además, en conjunto con las otras proteínas del virus, regula la muerte o supervivencia de la célula infectada, así como la liberación de la progenie viral (Lian et al., 2022; Yin et al., 2021). Al ser la única proteína expuesta, es su principal inmunógeno, es reconocida por anticuerpos neutralizantes y es responsable de activar una respuesta innata fuerte, así como estimular a linfocitos T (Yang et al., 2020; Zhang et al., 2013). Su capacidad inmunogénica se deriva de la presencia de 5 sitios antigénicos en su estructura (figura 3B), estos son denotados como: I, IIa/IIb, III, IV y a (de Melo et al., 2022). El sitio antigénico III, que comprende los aminoácidos 34-42 y 198-200, ha sido identificado como el principal determinante de patogenicidad ya que, se ha demostrado que mutaciones en este sitio reducen la diseminación viral y la unión a receptores virales (Ross B et al., 2008).

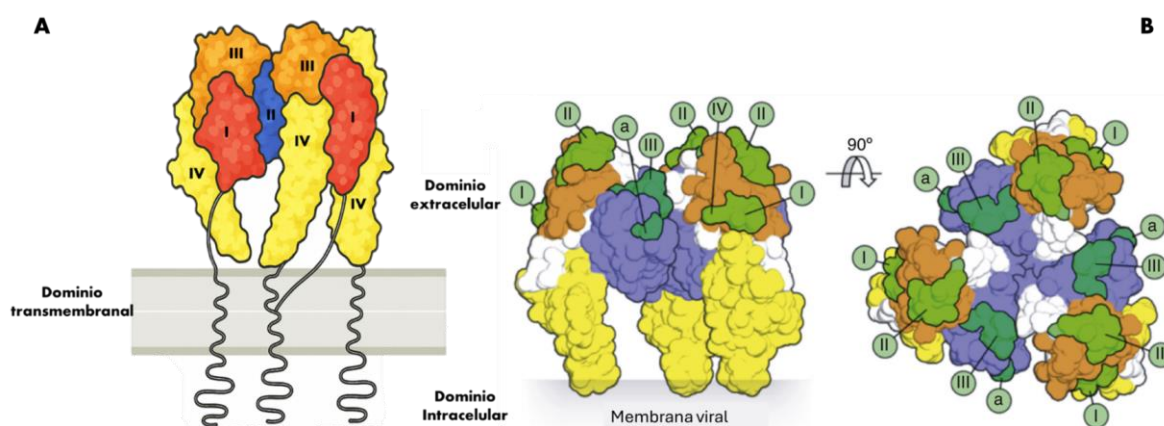


Figura 3. Glicoproteína G del virus de la rabia. (A) Estructura de la gpG mostrando sus dominios, así como los subdominios presentes en el dominio extracelular. **(B)** Ubicación de los 5 sitios antigénicos de la gpG. Adaptado de de Melo et al., 2022; Hellert et al., 2020

2.4. Plásmidos vacunales

Las vacunas basadas en ADN se empezaron a desarrollar en los años 90, cuando diversos investigadores demostraron que la administración de éstas despertaba una respuesta inmune específica contra las proteínas de interés (Pagliari et al., 2023); consisten en plásmidos de expresión, los cuales generalmente contienen una unidad de expresión/transcripción y una unidad de producción (figura 4); la unidad de expresión está constituida por secuencias promotoras o potenciadoras que suelen ser de origen viral, encargadas de regular la expresión de antígenos, posteriormente se encuentra un sitio de clonación múltiple (MCS por sus siglas en inglés), donde, mediante tratamiento con enzimas de restricción, se inserta el gen de la proteína antigénica de interés, también una secuencia de terminación llamada poli-adenilación (poly-A) la cual estabiliza la traducción del ARNm y secuencias inmunomoduladoras, también cuentan con un origen de replicación bacteriano o eucariota y genes de resistencia a antibióticos (Gómez & Oñate, 2019).

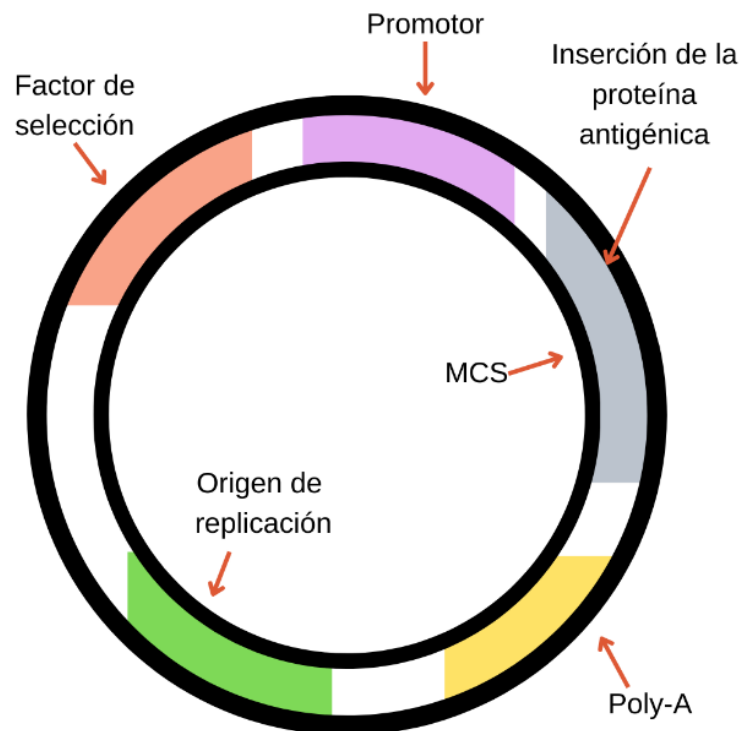


Figura 4. Estructura de un plásmido vacunal. Los plásmidos vacunales están conformados por cinco estructuras principales: un promotor, que regula la expresión de la proteína antigénica la cual, mediante enzimas de restricción es insertada en el sitio de clonación múltiple (MCS por sus siglas en inglés), una cola poly-A que estabiliza el ARN mensajero, un origen de replicación que permite generar copias del plásmido vacunal y un gen de selección. Adaptado de (Gómez & Oñate, 2019).

2.4.1. Plásmido vacunal antirrábico pBBR1-CMV-Ggp-SV40+

El plásmido pBBR1-CMV-Ggp-SV40+ (figura 5), fue construido por Pazos Salazar et al., (2015) a partir del plásmido PGQH descrito por Tesoro et al., (2008), del cual se liberó el fragmento que contiene el gen de la gpG regulado por el promotor de citomegalovirus (CMV) de expresión eucariota; este fragmento fue ligado al plásmido pBBR1, el cual cuenta con un origen de replicación (pBBR1 ORIV) que es compatible con *Brucella* y un gen de resistencia a cloranfenicol; en el constructo también se consideró el promotor SV40+ que funciona como origen de replicación episomal del plásmido en células eucariotas, obteniendo un tamaño final de 9921 pb. La funcionalidad de este constructo fue evidenciada al transfectar células BHK-21 con este plásmido y demostrar la expresión de la proteína gpG (Pazos Salazar et al., 2015)

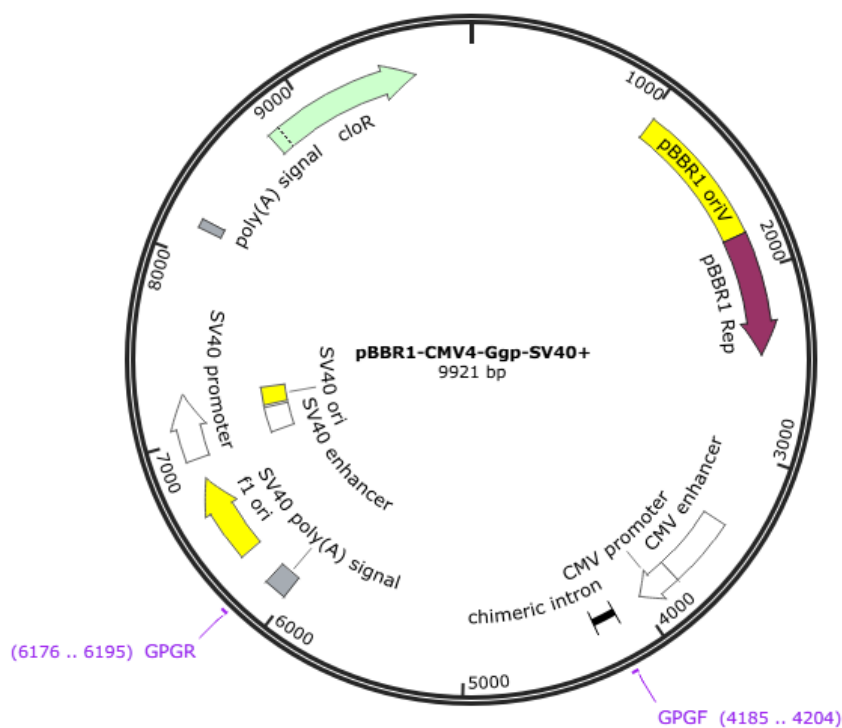


Figura 5. Estructura del plásmido pBBR1-CMV-Ggp-SV40+.

2.5. Mecanismo de acción de los plásmidos vacunales

El mecanismo de acción de las vacunas de ADN se puede dividir en tres etapas: ingreso, producción y procesamiento de antígenos y presentación de antígenos. El ingreso a la célula puede variar según el método de entrega usado, si se administra ADN desnudo, se han sugerido tres mecanismos de captación de plásmidos: a través de difusión mediante poros en la membrana celular, endocitosis caveolar o mediada por receptores como la clatrina o bien, mediante fuerza mecánica (por inyecciones) que puede producir la ruptura de la membrana celular permitiendo el ingreso de los plásmidos (Gómez & Oñate, 2019; Pagliari et al., 2023), la producción y procesamiento de antígenos hace uso de la maquinaria celular; una vez dentro de la célula, el plásmido viaja hacia el núcleo a través del citoplasma por medio de vesículas citoplasmáticas, una vez en el núcleo se lleva a cabo la transcripción para su posterior traducción y expresión de los antígenos, los cuales sufren todas las modificaciones postraduccionales necesarias y una vez ensamblada la proteína, esta puede presentarse mediante moléculas de histocompatibilidad de tipo I o II (MHC-I o MHC-II).

Para el ensamble a MHC-I, la proteína ingresa al sistema ubiquitina/proteasomas a partir de los cuales se obtienen péptidos que son dirigidos mediante transportadores asociados a proteínas (TAP) hacia la luz del retículo endoplásmico rugoso (RER) en el cual se ensamblan con el MHC-I, para posteriormente, ser presentados en la membrana celular y ser reconocidos por linfocitos T CD8. Si estas proteínas son liberadas, pueden ser endocitadas y presentadas por MHC-II expresado por células presentadoras de antígeno (APCs por sus siglas en inglés) a linfocitos T CD4; estas mismas células pueden viajar a ganglios linfáticos y a su vez activar a linfocitos T inmaduros. La activación de linfocitos T produce la secreción de citocinas, activación y diferenciación de linfocitos B, producción de anticuerpos y liberación de más antígenos (figura 6) (Kozak & Hu, 2024; Zhou et al., 2026).

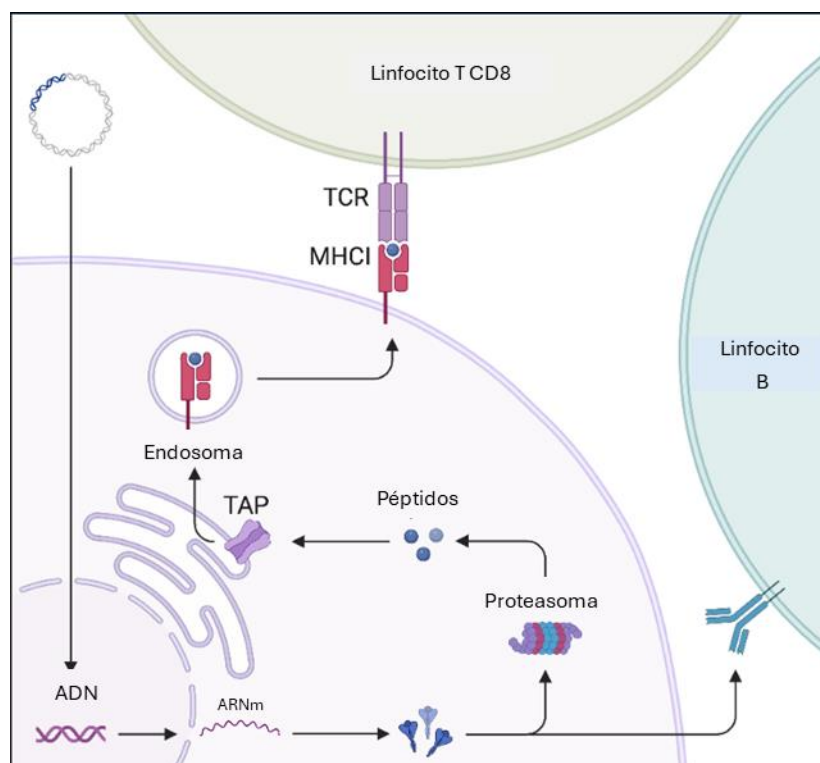


Figura 6. Funcionamiento de los plásmidos vacunales, el ADN desnudo ingresa a la célula y es dirigido al núcleo, donde haciendo uso de la maquinaria celular se lleva a cabo la transcripción y traducción de la proteína antigénica; una vez obtenida la proteína es ubiquitinada y dirigida a proteasomas para obtener péptidos los cuales son transportados hacia el retículo endoplásmico rugoso donde son ensamblados a MHC I despertando respuesta inmune mediada por linfocitos T; por otro lado si la proteína es liberada esta puede ser reconocida por células presentadoras de antígeno y es presentada por MHC II, generando respuesta inmune mediada por linfocitos B. Adaptado de Kozak & Hu, 2024

2.6. Uso de plásmidos vacunales antirrábicos

Tomando en cuenta las cualidades de la gpG como antígeno, esta proteína ha sido usada como proteína de interés en plásmidos antirrábicos.

Xiang et al. (1994) haciendo uso de un plásmido de expresión de la gpG regulada por el promotor eucariota SV40, al inmunizar al modelo murino vía intramuscular (I.M), demostraron la activación de respuesta inmune mediada por linfocitos T y B, así como la presencia de anticuerpos IgG específicos contra el virus de la rabia, además, al someter a los ratones inmunizados a desafío con el virus de la rabia demostraron la total protección de estos en comparación con el control, los cuales murieron 14 días post exposición. Wang et al. (1997) haciendo uso de un adenovirus recombinante que expresaba la gpG, demostraron en

modelo murino y cachorros caninos, la generación de respuesta inmune de tipo Th2, anticuerpos específicos IgG1 e IgG2a y linfocitos B, además de la supervivencia al desafío con este virus. Un ejemplo más es Tesoro et al (2008) quienes, al inmunizar vía intranasal a conejos y a ratones con un plásmido vacunal antirrábico, el cual contenía la secuencia de la gpG, regulado por el promotor CMV, demostraron la producción de anticuerpos neutralizantes, así como la supervivencia de estos al desafío con la cepa Challenge Virus Strain (CVS), la cual es ampliamente usada para el desafío con el virus de la rabia.

2.7. Entrega de plásmidos vacunales

Las vacunas basadas en plásmidos, o de tercera generación, son actualmente una propuesta prometedora; éstas han demostrado ser efectivas en modelos animales además de tener ventajas como seguridad, estabilidad, rentabilidad y un desarrollo relativamente rápido; sin embargo, una problemática a la que se enfrenta el desarrollo de este tipo de vacunas es la entrega de estos plásmidos (Eng et al., 2024). Los métodos usados actualmente para la entrega de plásmidos vacunales incluyen los mecánicos (microinyecciones, presión, bombardeo de partículas), los eléctricos (electroporación), los químicos (iones y polímeros) y los basados en vectores (virales principalmente) (Lu et al., 2024). A pesar del uso de estos métodos, se ha encontrado que la eficiencia de transferencia de estas vacunas sigue siendo baja debido a degradación por nucleasas, la alta cantidad necesaria de plásmido purificado, así como la necesidad de coadyuvantes seguros y eficaces para la administración y potenciación de la respuesta inmune, para poder evitar esto, en los últimos años se han usado vectores virales, sin embargo, estos siguen teniendo limitaciones, ejemplo de esto es una respuesta inmune exacerbada que en ocasiones requiere el uso de inmunosupresores así como reportes de toxicidad inflamatoria (Seow & Wood, 2009), es por esto que, el uso de bacterias intracelulares como vectores es una propuesta que ha tomado fuerza en los últimos años (Eng et al., 2024).

2.8. Bacterias intracelulares como vectores

La entrega de plásmidos vacunales puede llegar a sufrir diversas problemáticas, por esto, las bacterias intracelulares han sido propuestas como una buena opción como vectores de plásmidos codificantes de proteínas heterólogas (Eng et al., 2024).

Ejemplo de esto es Zhu et al. (2022), que al hacer uso de *Salmonella typhimurium* transformada con un plásmido que contenía el marco de lectura de la proteína S de SARS-CoV-2 para inmunizar ratas vía oral, comprobaron la generación de respuesta inmune tipo IgG contra este virus. Otro ejemplo de esto es Lloren et al. (2023) haciendo uso también de *Salmonella*, la cual contenía genes variables RBD, NTD y conservados (HR, N y RdRp) de SARS-CoV-2, realizaron infección celular de macrófagos murinos y mediante RT-PCR, inmunofluorescencia y Western blot, demostrando la expresión de las proteínas de interés; por otro lado, al inmunizar ratones y hámsteres vía oral e intranasal, respectivamente, demostraron respuesta inmune de tipo IgG e IgA en ratones y una disminución en título viral infeccioso, así como, reducción de inflamación y congestión pulmonar en el desafío de hámsteres con la variante Delta y Omicron de SARS-CoV-2. Otro ejemplo de bacterias intracelulares muy ampliamente usada para este fin es *Listeria monocytogenes*, Miki et al. (2004) haciendo uso de esta cepa, la cual albergaba plásmidos de expresión eucariota de proteínas (complejo antígeno 85 y MPB/MPT51) de *Mycobacterium tuberculosis*, al infectar con la cepa transformante células J774A, demostraron la expresión de las proteínas de *M. tuberculosis*, además de demostrar respuesta inmune celular contra *M. tuberculosis* en modelo murino.

Incluso la cepa vacunal S19 de *B. abortus* ha sido usada como vector de expresión de la proteína RAP1 de *Babesia bovis* (Sabio y García et al., 2008), generando la producción de IFN γ y anticuerpos IgG2a específicos contra la proteína RAP1, sin afectar sus características de infección en el modelo murino, por otro lado, también fue usada para la expresión de la proteína MPB83 de *Mycobacterium bovis* (Sabio et al., 2010), nuevamente demostrando producción de una respuesta inmune celular contra la proteína recombinante.

2.8.1. RB51 como vector

Debido a la característica intracelular que presentan las especies de *Brucella*, se ha planteado el uso de *Brucella* como vector. Vemulapalli et al. (2000) demostraron que la cepa rugosa RB51 es funcional como vector de proteínas heterólogas de *Mycobacterium bovis* y *Escherichia coli*, así como la producción de inmunidad mediada por Th1 al infectar ratones BALB/c y obtener su suero donde se encontró la producción de anticuerpos de tipo IgG2a

contra estas proteínas, todo esto sin afectar las características de atenuación de esta cepa, ni la respuesta inmune contra *Brucella*.

Con estos antecedentes, este trabajo busca evaluar de forma preliminar la utilidad de la cepa RB51 de *B. abortus* como vector para la entrega del plásmido vacunal antirrábico pBBR1-CMV-Ggp-SV40+.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

No se ha determinado la utilidad de la cepa de *B. abortus* RB51/pBBR1-CMV-Ggp-SV40+ como vector del plásmido vacunal antirrábico.

4. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que bacterias intracelulares son efectivas para la entrega de plásmidos vacunales, por esto, al considerar aspectos como: la naturaleza intracelular del género *Brucella*, que la cepa RB51 de *B. abortus* ha mostrado ser eficiente como vector de proteínas heterólogas y que plásmidos de expresión eucariota codificantes de la gpG inducen una respuesta protectora contra el virus de rabia; se hace importante evaluar a la cepa vacunal RB51/pBBR1-CMV-Ggp-SV40+ como vector para la entrega de un plásmido vacunal antirrábico, aportando datos para el futuro desarrollo como vacuna recombinante con capacidad bivalente, así como la generación de literatura del uso de *Brucella* como vector.

5. HIPÓTESIS

La cepa RB51/pBBR1-CMV-Ggp-SV40+ de *B. abortus* es capaz de entregar un plásmido vacunal antirrábico codificante de la gpG en un modelo celular eucariótico.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad de la cepa vacunal RB51/pBBR1-CMV-Ggp-SV40+ de *B. abortus* como vector de un plásmido vacunal antirrábico codificante de la gpG en un modelo celular eucariótico.

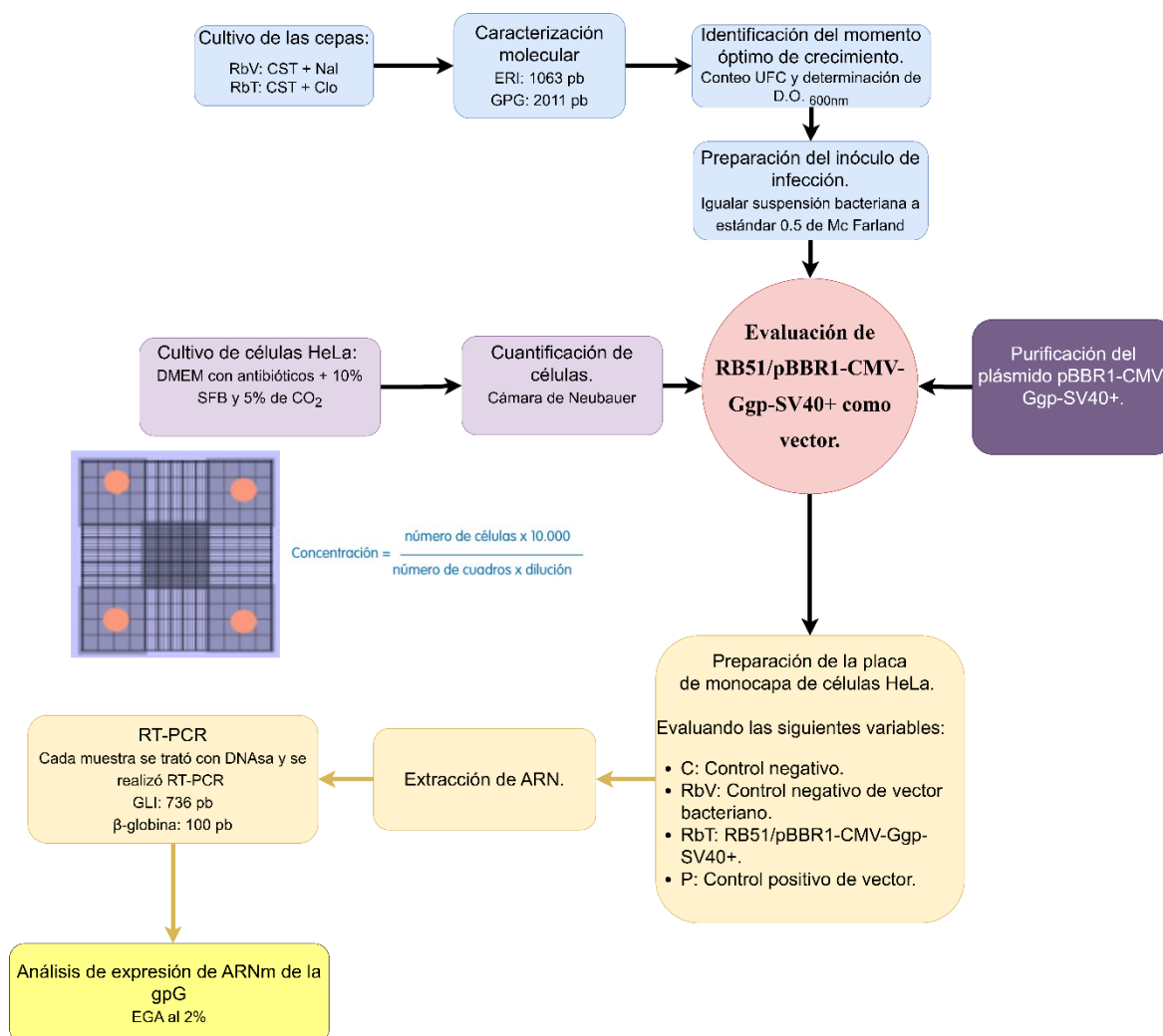
6.2. Objetivos particulares

- I. Caracterizar molecularmente la cepa vacunal RB51 transformada con el plásmido vacunal antirrábico pBBR1-CMV-Ggp-SV40+.

- II. Determinar la expresión de ARNm-gpG en monocapas de células HeLa infectadas con la cepa RB51/pBBR1-CMV-Ggp-SV40+.

7. METODOLOGÍA

7.1. Diagrama de trabajo



7.2. Cultivo de las cepas

Para el cultivo de las cepas vacunales se usó agar soya tripticasa (AST) y caldo soya tripticaséina (CST) con los siguientes antibióticos: ácido nalidixico (Nal) 25 µg/mL (CST+ Nal/ AST + Nal) para la cepa RB51 no transformante y cloranfenicol (Clo) 25 µg/mL (CST+ Clo/ AST+ Clo) para la cepa transformante RB51/pBBR1-CMV-Ggp-SV40+. En lo sucesivo

se usarán las siglas RbV para referirse a la cepa no transformante y RbT para la cepa transformante.

7.3. Purificación de plásmido

El plásmido pBBR1-CMV-Ggp-SV40+ purificado se obtuvo a partir de una cepa *E. coli TOP 10* transformante con este plásmido. A partir de una colonia aislada se inoculó un caldo de 3 mL de CST+ Clo, se incubó a 37°C y 200 rpm durante 17 horas, posteriormente, la extracción y purificación del plásmido se llevó a cabo mediante el kit Quick-DNA Miniprep Plus Kit de ZYMO® siguiendo las indicaciones del fabricante; se determinó la concentración mediante nanodrop, usando el equipo Nanodrop 2000 de Thermofisher® y la integridad se verificó mediante Electroforesis en Gel de Agarosa (EGA). El plásmido obtenido se usó para transfectar células HeLa, como control positivo de expresión en el ensayo de evaluación del apartado 7.7.

7.4. Cultivo de células HeLa

Las monocapas de células HeLa se mantuvieron con medio DMEM más antibióticos (estreptomicina 100 µg/mL y penicilina 100 u/mL), enriquecido con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) y 5% de CO₂, para su resguardo se congelaron con DMEM enriquecido con SFB al 20%, adicionado con 10% de DMSO.

7.4.1. Cuantificación de células

Para el conteo celular, la monocapa se trató con tripsina para obtener una suspensión celular, se tomaron 20 µL para realizar una dilución 1:2 con azul de tripán, que se colocó en la cámara de Neubauer y se contaron las células viables en los recuadros externos superiores e inferiores (figura 7); para calcular el número de células por mL se aplicó la fórmula de la misma figura.

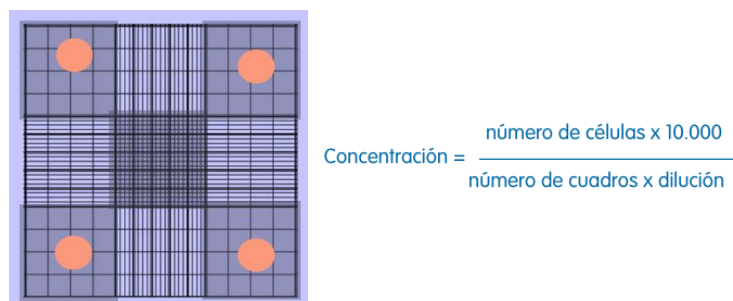


Figura 7. Cuantificación en cámara de Neubauer. Cuadros tomados en cuenta para el conteo celular en cámara de Neubauer (izquierda) señalados con círculos rosas y fórmula usada para determinar la concentración celular (derecha).

7.5. Caracterización de las cepas de RB51

A partir de una colonia aislada de las cepas RbV y RbT, se realizaron reacciones individuales de PCR con los cebadores denominados ERI, que van dirigidos hacia el gen del operón *ery* de *Brucella*, que amplifican un fragmento de 1063 pb y un par de cebadores denominados GPG, que flanquean el marco de lectura de la gpG introducido en el plásmido pBBR1- CMV-Ggp-SV40+ y generan un amplicón de 2011 pb. Los resultados obtenidos se resolvieron mediante EGA al 1%, se incluyeron 2 controles negativos de ERI y gpG y el plásmido pBBR1- CMV-Ggp-SV40+ puro como control positivo de gpG; el corrimiento se realizó a 80 V, 300 mA durante 1 h. Las colonias caracterizadas fueron congeladas en CST+ Nal y CST+ Clo con glicerol para su resguardo. El protocolo de amplificación se muestra en el anexo 2.

7.6. Identificación del momento óptimo del crecimiento de las cepas de RB51 para la infección celular

Con el fin de conocer el comportamiento de las cepas RbV y RbT, a partir de una colonia aislada se inocularon por triplicado caldos de 5 mL de CST+ Nal y CST+ Clo respectivamente, se incubaron a 37°C y 200 RPM, los cultivos se revisaron hasta que inició la turbidez en cada una, ese momento se estableció como el tiempo 0 (t_0); para la cepa RbV se revisaron los cultivos a los tiempos t_1 y t_2 con intervalos de 2 h, mientras que para RbT los intervalos fueron de 5 h entre t_1 y t_2 . Para ambas cepas se tomó 1 mL en los tiempos t_0 , t_1 y t_2 , se determinó la D.O_{600 nm} y se cuantificaron las UFC/mL. Para la determinación de UFC, en cada tiempo se tomó una alícuota de 20 µL a partir de la cual se realizaron diluciones de

10^{-1} hasta 10^{-6} , posteriormente se sembraron por triplicado 20 μ L de cada una de las diluciones 10^{-3} hasta 10^{-6} en AST+ Nal para RbV y AST+ Clo para RbT; pasadas 24 h y 72 h respectivamente para cada cepa, se realizó cuantificación de UFC con un contador de colonias. Para seleccionar la dilución en la que se cuantificaría UFC se tomó en cuenta que se apreciaran colonias contables y representativas (rango 30-300 colonias), posteriormente el cálculo se realizó siguiendo la fórmula de la figura 8.

$$UFC/mL = \# \text{ colonias significativas} * \text{Factor de dilución} * V \text{ inicial sembrado}$$

Figura 8. Formula usada para determinar UFC/mL.

7.7. Cultivo de las cepas para preparar el inóculo de infección

Una vez determinado el momento óptimo de crecimiento para cada una de las cepas, éstas se cultivaron en CST+ Nal y CST+ Clo, se incubaron a 37°C a 200 RPM hasta alcanzar el momento óptimo para cada una, las suspensiones bacterianas se igualaron al estándar 0.5 de Mc Farland y se realizó un ajuste teórico para cumplir una relación 1:500 con respecto a las células, esta relación fue elegida debido a que ha sido reportada anteriormente en ensayos de infección de células HeLa con *Brucella* (Carvalho et al., 2023; Sieira et al., 2000).

7.8. Evaluación de RB51/pBBR1-CMV-Ggp-SV40+ como vector

7.8.1. Preparación de la placa

A partir de botellas T25 de células HeLa con 100% de confluencia se obtuvo una suspensión celular y se determinó el número de células por mL, se prepararon en total 24 pozos de 200mm² estimando obtener una confluencia del 80% después de 24 horas, a ese tiempo todos los pozos de las monocapas se lavaron con PBS y posteriormente se emplearon para analizar por triplicado el comportamiento de cuatro variables tratadas de la manera descrita en la tabla 1, a las 24 h (12 pozos) y 48 h (12 pozos).

Tabla 1. Tratamiento de las variables analizadas para evaluar la cepa RB51 /pBBR1-CMV-Ggp-SV40+

Variable	Abreviatura*	Tratamiento
1. Control negativo (células HeLa sin tratamiento)	C	Adición de 500 µL de PBS + SFB 5%.
2. Control negativo de vector bacteriano	RbV	Infección con 500 µL de la cepa RbV en una relación estimada célula: bacteria 1:500, la bacteria se suspendió en PBS + SFB 5%.
3. RB51/pBBR1-CMV-Ggp-SV40+ como vector	RbT	Infección con 500 µL de la cepa RbT en una relación estimada célula: bacteria 1:500, la bacteria se suspendió en PBS + SFB 5%.
4. Control positivo de expresión	P	Transfección mediante fosfato de calcio con 250 ng/ µL de plásmido pBBR1-CMV-Ggp-SV40+ puro suspendido en 500 µL de la suspensión de transfección**

* Estas abreviaturas serán usadas de aquí en adelante para referirse a las variables.

** CaCl₂ 2.5 M, Buffer TE, HBS 2X (Hepes 250 mM,, 5N NaCl, 150 mM Na₂PO₄).

Después del tratamiento de cada variable, la placa se incubó a 37°C con 5% de CO₂ durante 2 horas, al término, se retiraron los 500 µL y se adicionó 500 µL de DMEM + Gentamicina con SFB 5% para incubarse nuevamente a 37°C con 5% de CO₂.

7.8.2. Extracción de ARN

Pasadas las 24 y 48 horas post tratamiento, se realizó extracción de ARN mediante Qiazol®, siguiendo las especificaciones del fabricante. Posteriormente, se determinó concentración mediante nanodrop y se evaluó su integridad por EGA. Para cada muestra se realizaron 2 alícuotas y se resguardaron a -80°C.

7.8.3. RT-PCR

Una vez obtenido el ARN, previo a la reacción de amplificación los ARN de cada una de las repeticiones de cada variable, se trataron en un rango de entre 50-200 ng/µL con DNasa y se realizó RT-PCR con el KIT One Step de Accuris® en reacciones de 20 µL, usando como control interno los cebadores denominados beta, que reconocen el gen de beta globina y generan un amplicón de 100 pb; para evaluar la presencia de ARNm de la gpG, se

usaron los cebadores denominados Gli, que reconocen un fragmento interno del gen de la gpG con un tamaño de amplicón de 736 pb. El protocolo de amplificación se muestra en el anexo 2.

7.8.4. Análisis de la expresión de ARNm de la gpG

Todas las reacciones de amplificación se resolvieron mediante EGA al 2%, se incluyó un pozo con marcador de peso de 100 pb.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Purificación de plásmido pBBR1-CMV-Ggp-SV40+

El plásmido se obtuvo a una concentración de 3368.2 ng/μL (figura 9A) y se verificó su integridad mediante EGA (figura 9B).

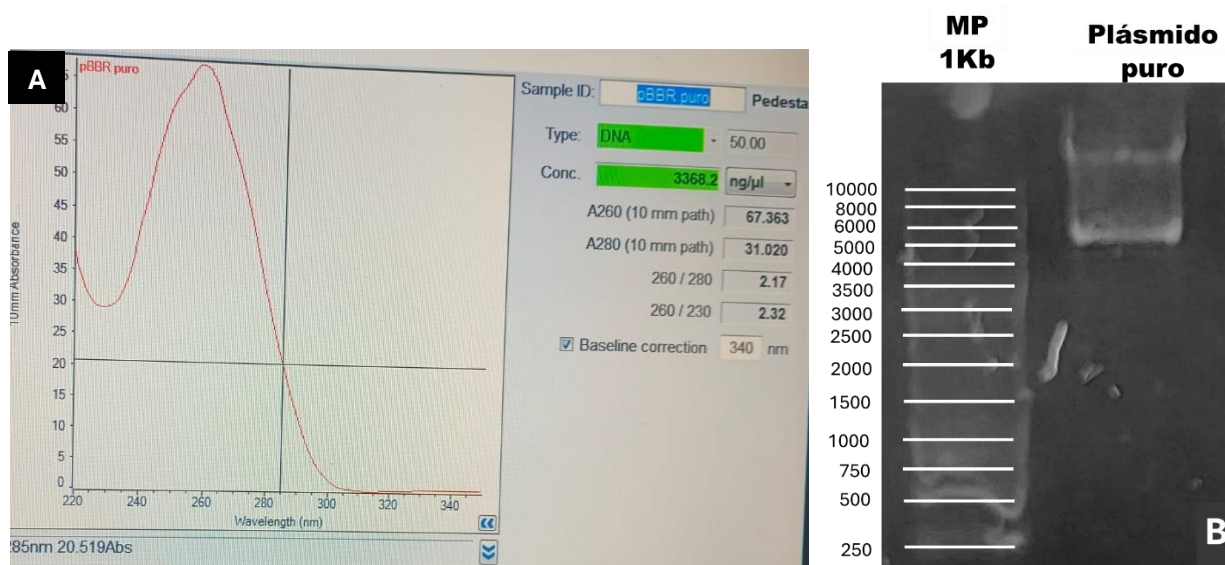


Figura 9. Integridad y concentración del plásmido puro obtenido. A. Gráfica obtenida en nanodrop. **B.** EGA en gel 1%. Carriles: 1; MP 1kb, 2; plásmido puro extraído. El plásmido se obtuvo a una concentración de 3368 ng/μL y como se aprecia en la figura B, al observarse la presencia de dos bandas y ausencia de barrido, se confirma la integridad de éste.

Para poder lograr el objetivo de este trabajo, era necesario contar con un control positivo de expresión que se cumplió con el uso del plásmido pBBR1-CMV-Ggp-SV40+ para transfectar la línea celular usada, para realizar la transfección es importante contar con plásmido puro, ya que se ha demostrado que sin purificar puede contener

endotoxinas, ARN, entre otros compuestos que pueden intervenir con la transfección, o bien, ser tóxico para las células de interés; Jordan & Wurm F (2004) señalan que el ADN purificado mediante columnas comerciales es suficientemente puro para poder realizar transfección celular, por lo que, el plásmido usado en la transfección cumple con este requisito; sin embargo, como se muestra en el anexo 4, la morfología celular registrada 24 horas post transfección (P1, P2 y P3), muestra células aglomeradas, lo que posiblemente se deba a la citotoxicidad que puede llegarse a presentar por la naturaleza de los precipitados de fosfato de calcio-ADN, esta presunta intoxicación no se observó 48 horas post transfección donde las células mostraron una mejor morfología y mayor concentración de ARN (tabla 3).

8.2. Caracterización molecular de RbV y RbT

En la figura 10, se muestran los amplicones del gen *ery* y el marco de lectura de la gpG para ambas cepas, así como los controles negativos incluidos para ambas secuencias y un control positivo de GPG.

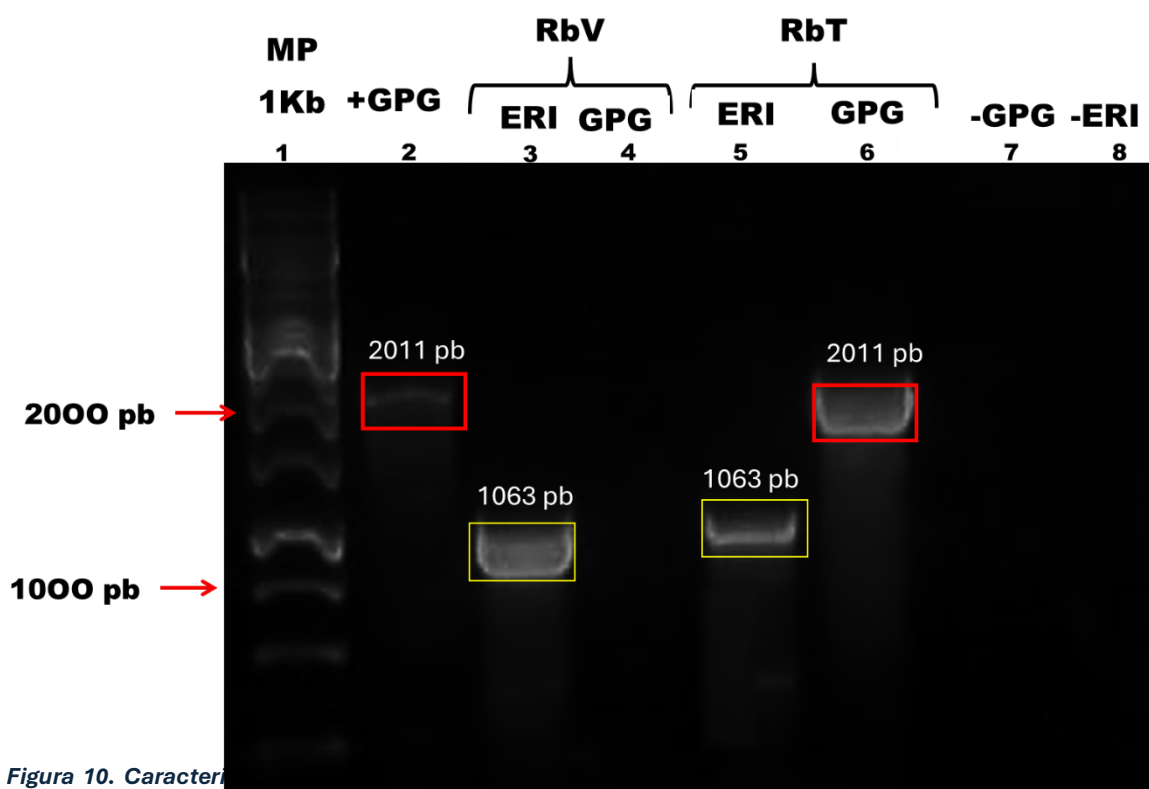


Figura 10. Caracterización molecular de RbV y RbT. Se muestran los amplicones del gen *ery* y el marco de lectura de la gpG para ambas cepas, así como los controles negativos incluidos para ambas secuencias y un control positivo de GPG. Los amplicados para GPG con un tamaño de 2011 pb y en amarillo el amplificado correspondiente a *ery* de 1063 pb. EGA 1%. A partir de la amplificación del gen constitutivo se confirma la identidad de las cepas de *Brucella*, con la amplificación de gpG en RbT y su ausencia en RbV se confirma la presencia de ésta solamente en la transformada.

Con el fin de tener la certeza de que se estaba trabajando con las cepas de interés fue necesario realizar su caracterización molecular con un gen constitutivo de las especies de *Brucella*; esto se cumplió con la amplificación del gen *ery* (figura 10, carril 3 y 5 con un tamaño de 1063 pb), del que ya ha sido reportado su uso (Bricker & Halling, 1995; Thorat et al., 2022). Para verificar la presencia/ausencia del plásmido de interés en la cepa transformante y no transformante se realizó la amplificación del marco de lectura de la gpG introducido en el plásmido (figura 10, carril 4 y 6).

8.3. Momento óptimo del crecimiento de RbV y RbT

En la tabla 2 se muestran las D.O obtenidas, así como la determinación por triplicado de UFC (figura 11) a los tiempos de incubación: t_0 , t_1 y t_2 . Para la cepa RbV inició la turbidez (t_0) 2 horas post inoculación (h.p.i) y para RbT 25 h.p.i.

Tabla 2. D.O y UFC obtenidas a los 3 tiempos evaluados.

Cepa	Tiempo	D.O _{600nm}	UFC/mL (Triplicado)			Promedio	Desviación estándar
RbV	t_0 (2 h.p.i)	0.418	3.7×10^8	3.8×10^8	7×10^7	2.7×10^8	1.76×10^8
	t_1 (4 h.p.i)	0.459	4×10^8	4×10^8	4×10^8	4×10^8	0
	t_2 (6 h.p.i)	0.451	2×10^8	1.7×10^8	1.85×10^8	1.8×10^8	1.5×10^7
RbT	t_0 (25 h.p.i)	0.017	1.6×10^7	1.3×10^7	1.5×10^7	1.4×10^7	1.53×10^6
	T_1 (30 h.p.i)	0.167	1.5×10^8	1.6×10^8	1.6×10^8	1.5×10^8	5.77×10^6
	T_2 (35 h.p.i)	0.385	3.6×10^8	3.9×10^8	3.5×10^8	3.6×10^8	2.08×10^7

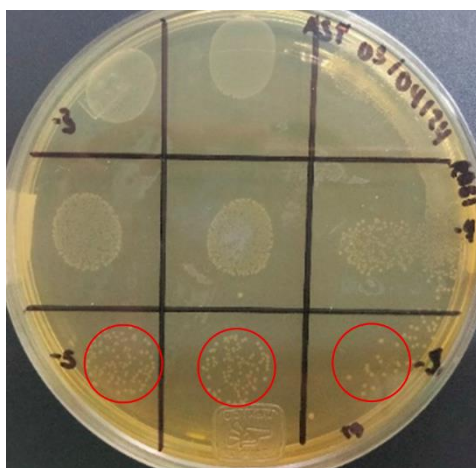
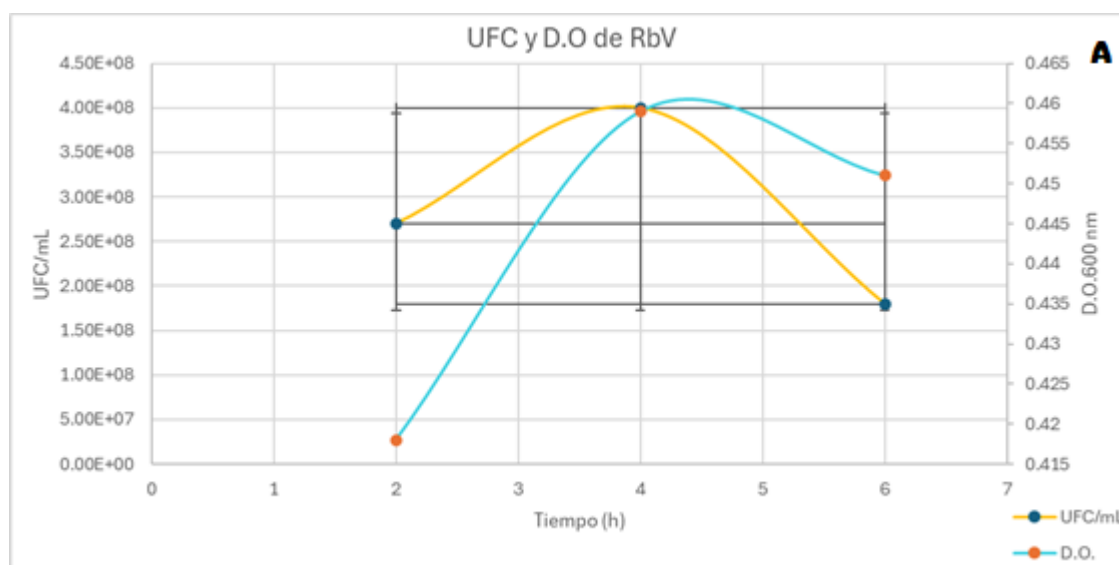


Figura 11. Conteo de UFC. Imagen representativa del conteo de UFC de cada dilución por triplicado. En rojo está señalada la dilución representativa donde hay UFC contables, la cual fue elegida para realizar el conteo de UFC.

Para llevar a cabo la infección de la línea celular fue necesario conocer el comportamiento de las cepas; como se observa en la tabla 2, RbV inició la turbidez a un menor tiempo (2 h.p.i) con respecto a RbT (25 h.p.i). Ya ha sido estudiado que la adquisición de plásmidos afecta a las bacterias transformantes metabólicamente y generan costes de aptitud (efectos de crecimiento) produciendo un crecimiento lento (Ahmad et al., 2023; Curtsinger et al., 2025; Rouches et al., 2022), lo que justifica el lento crecimiento de RbT con respecto a RbV.

Realizar el conteo de UFC permitió relacionar la D.O._{600nm} con el número de células viables. Para la cepa RbV se logra apreciar un aumento en la D.O. así como en el conteo de UFC en el t_1 para después disminuir nuevamente en el t_2 determinando que después de 6 h.p.i tanto la D.O. como el número de células viables se ve disminuida posiblemente debido a que la cepa empieza la fase de senescencia; este evento no sucede con RbT ya que se aprecia un aumento progresivo tanto en D.O. como en UFC, indicando que aún a las 35 h.p.i no se ha llegado a la senescencia de esta cepa (figura 12); esto nos permitió determinar que RbV no debía alcanzar una D.O. de 0.4 para evitar que llegara a la fase de senescencia, por lo que se decidió que una D.O. de 0.3 nos permitía tener a ambas cepas en un momento previo a la senescencia. Esto es importante ya que para poder realizar la infección es necesario que las bacterias se encuentren metabólicamente activas y en las mejores condiciones de crecimiento. Cabe señalar que en los conteos se presentaron valores altos de desviación estándar lo que se pudo deber a errores técnicos en el sembrado.



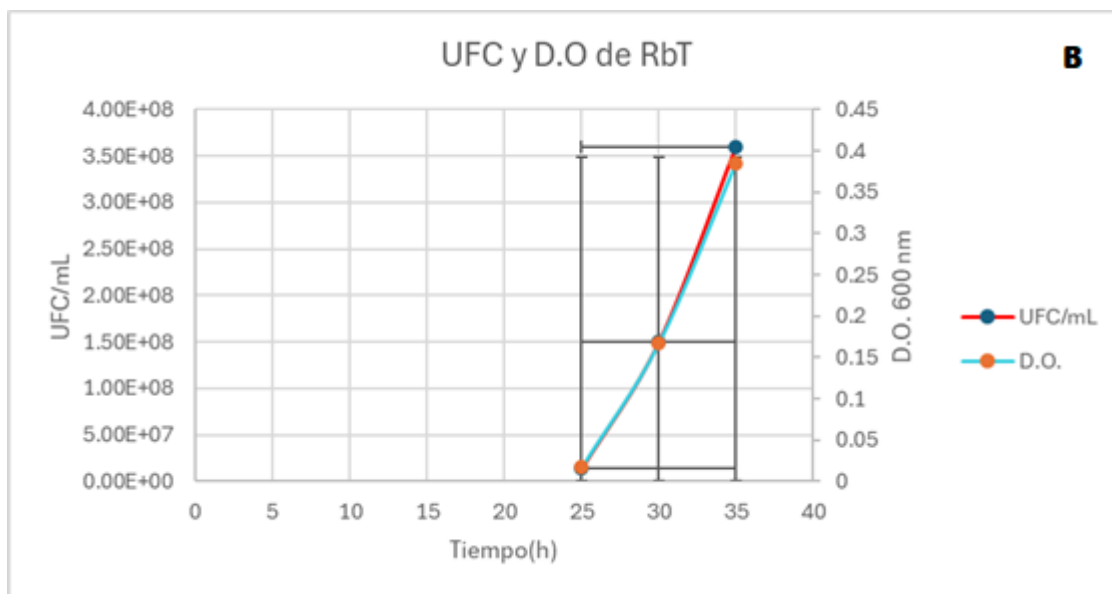


Figura 12. Gráficas de UFC y D.O. A) D.O. obtenida para los tres tiempos evaluados para RbV, se logra apreciar un aumento de conteo de UFC/mL, así como de D.O. del t_0 al t_1 , sin embargo, para el t_2 hay una disminución tanto para el conteo de UFC/mL como para la D.O. **B)** D.O. obtenida para los tres tiempos evaluados para RbT, para esta cepa tanto el conteo de UFC/mL como la D.O. aumenta entre los tres tiempos sin presentarse una disminución.

8.4. Conteo celular para la preparación de los pozos para cada variable

A continuación (figura 13), se ilustra un ejemplo de los conteos celulares en la cámara de Neubauer.

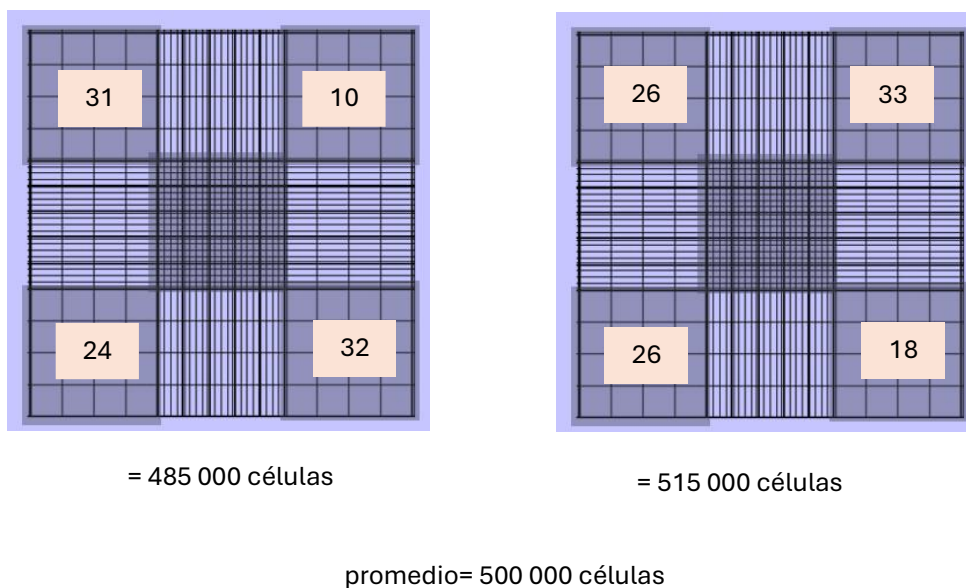


Figura 13. Conteo celular a partir del cual se realizó la placa. Para el conteo de cél/pozo se tomaron en cuenta los cuadrantes externos marcados con rectángulos rosas, y se obtuvieron los datos mostrados en la figura; el conteo se realizó por duplicado obteniéndose un promedio de 500 000 cél/mL.

Después de conocer el número de células por mL, se sembraron 40 000 células por cada pozo estimando tener a las 24 horas 160 000 células, tomando en cuenta el cálculo realizado por (Thermofisher, n.d.), esto con el fin de cumplir con un 80% de confluencia a la hora de infección.

Para verificar que se hubiera logrado obtener el número de células esperado se sembró un pozo más para contar las células 24 h después, el conteo resultó en 150 000 células, sólo 10 mil menos de lo esperado.

8.5. Preparación del inóculo de infección y conteo final de UFC

En la figura 14 se muestra la suspensión realizada después del manejo realizado para cada cepa mencionado en metodología en el apartado 7.7. cultivo de las cepas para preparar el inóculo de infección.

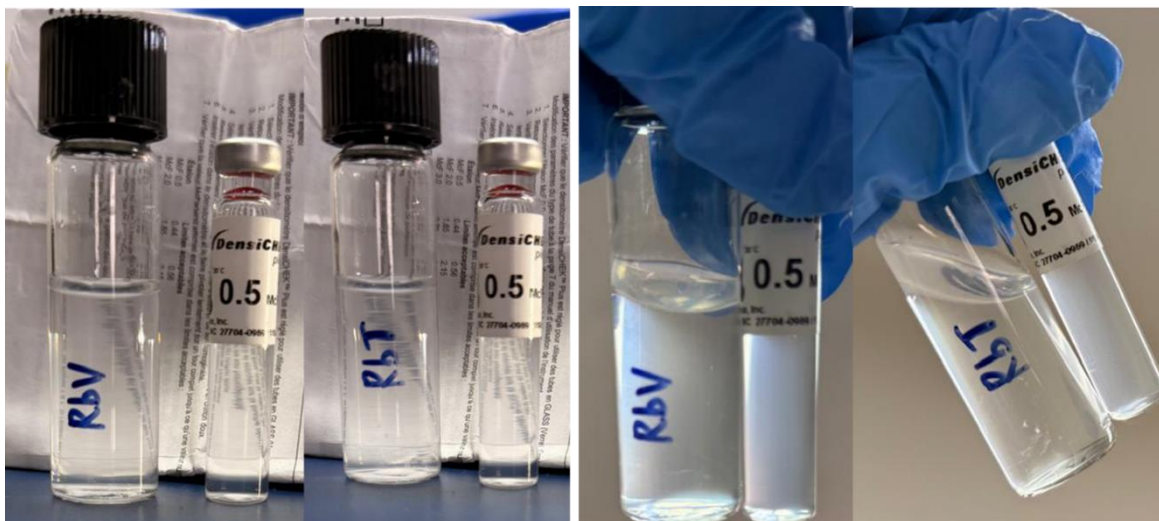


Figura 14. Suspensión de cada cepa para la preparación del inóculo de infección.

Tomando en cuenta que se obtuvo un conteo celular aproximado de 150 000 cél/pozo y para cumplir la relación 1:500 con respecto a la cantidad de bacterias, se necesitaba un total de 75 000 000 bacterias/pozo, por lo tanto, considerando los resultados obtenidos en la sección 8.3, los cultivos debían ajustarse a una densidad previo a senescencia por lo tanto, los cultivos se ajustaron a tubo 0.5 del estándar de nefelómetro, considerando que en este estándar se tienen 1.5×10^8 UFC (figura 14) se realizó una suspensión bacteriana en PBS+SFB 5% en la que se tenía una estimación de 75 000 000 bacterias por cada 500 μ L,

con esta suspensión se realizó la infección celular, así como el conteo de UFC el cual se realizó 24 h.p.i para RbV y 48 h.p.i para RbT y se obtuvieron 2.25×10^8 UFC/500 μ L para RbV y 4×10^8 para RbT. Finalmente se obtuvo una relación célula: bacteria de 1:1500 para RbV y 1:2674 para RbT que son 3 y 5 veces más de lo calculado. Una discusión de este punto se presenta en el apartado 8.7. Expresión de ARNm de la gpG.

8.6. Extracción ARN

En la tabla 3 se muestra la concentración de cada triplicado de cada variable a 24 y 48 horas, así mismo, en la figura 15 se muestra la EGA de extracción del ARN.

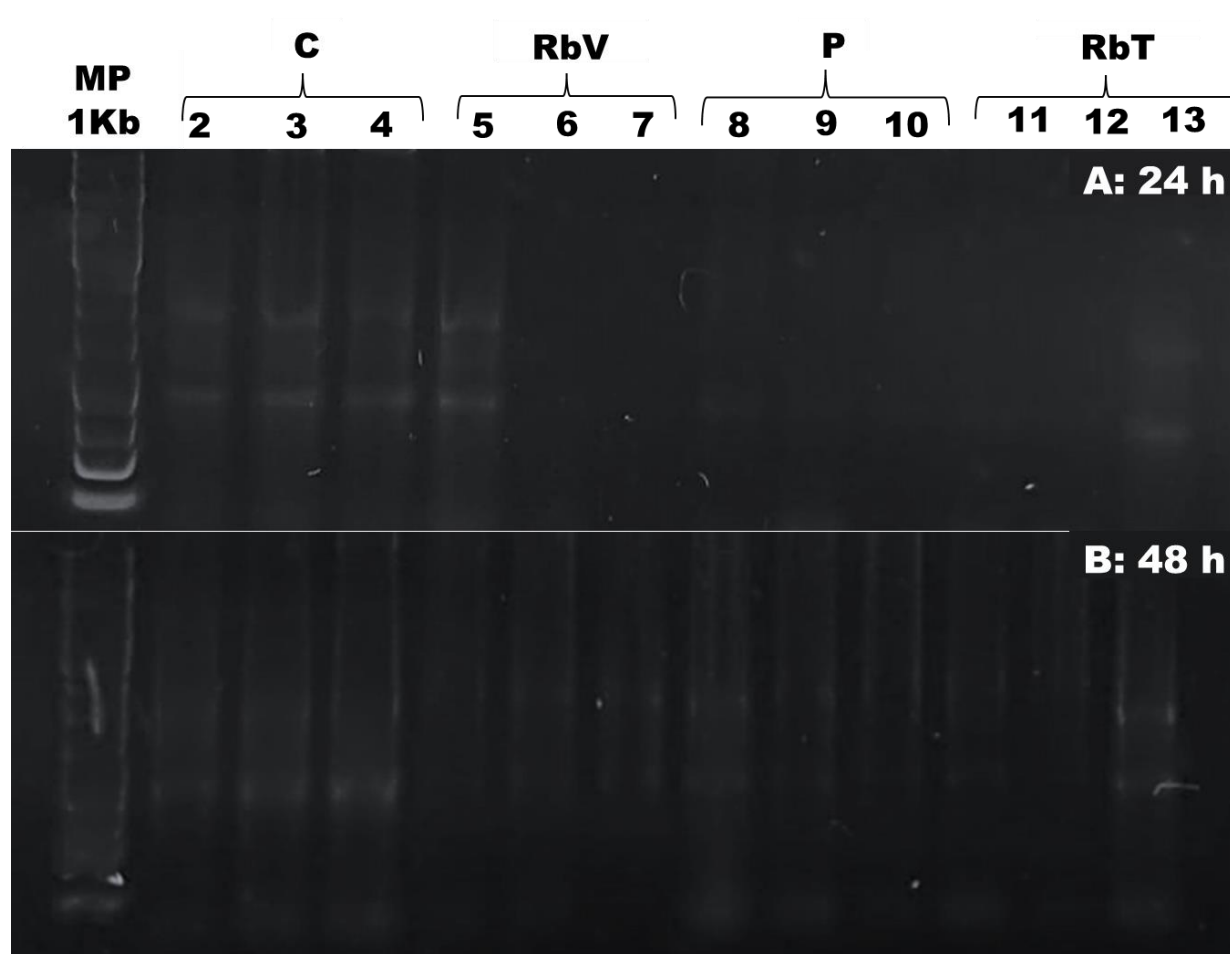


Figura 15. Extracción del ARN extraído de los triplicados de cada variable. Se aprecian las bandas 28S y 18S. EGA 1%.

8.7. RT-PCR

En la tabla 3 se muestra la concentración de ARN obtenida y usada para cada reacción de cada triplicado de cada variable.

Tabla 3. Concentración de ARN de las repeticiones de cada variable y concentración usada por reacción a las 24 y 48 horas post-manejo.

Repetición de cada variable	Tiempo post-tratamiento			
	24		48	
	(ng/μL) Obtenidos	Concentración usada por reacción	(ng/μL) Obtenidos	Concentración usada por reacción
C1	188	188	154	154
C2	164	196	332	166
C3	272	163	376	188
RbV1	401	200	115	115
RbV2	35	196	107	160
RbV3	50	200	203	203
RbT1	24	134	81	202
RbT2	78	187	129	193
RbT3	98	196	133	199
P1	13	72	95	190
P2	28	156	208	208
P3	11	61	150	150

Como se muestra en la tabla 3, la concentración de ARN obtenida entre los triplicados de cada variable presentó una alta variabilidad, debido a ello, el rango elegido para cada reacción fue de 50 ng-200 ng según la disponibilidad de muestra, por ejemplo, la concentración más baja obtenida fue para el triplicado P3 de las 24 h de la cual solo se obtuvieron 11 ng/μL por lo que en cada reacción solo se incluyeron 61 ng de muestra.

8.8. Expresión de ARNm de la gpG

Las reacciones de RT-PCR se realizaron para las 24 horas y las 48 horas post tratamiento, la figura 16 muestra los resultados obtenidos.

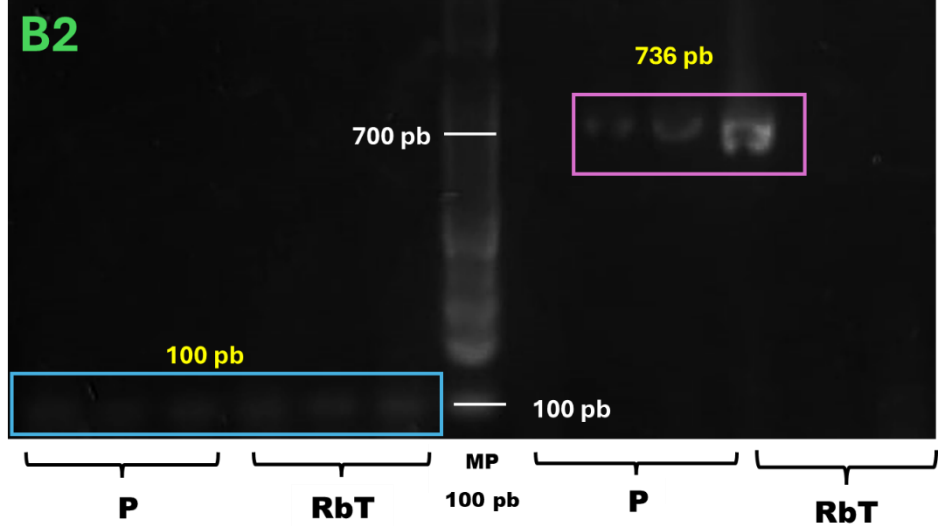
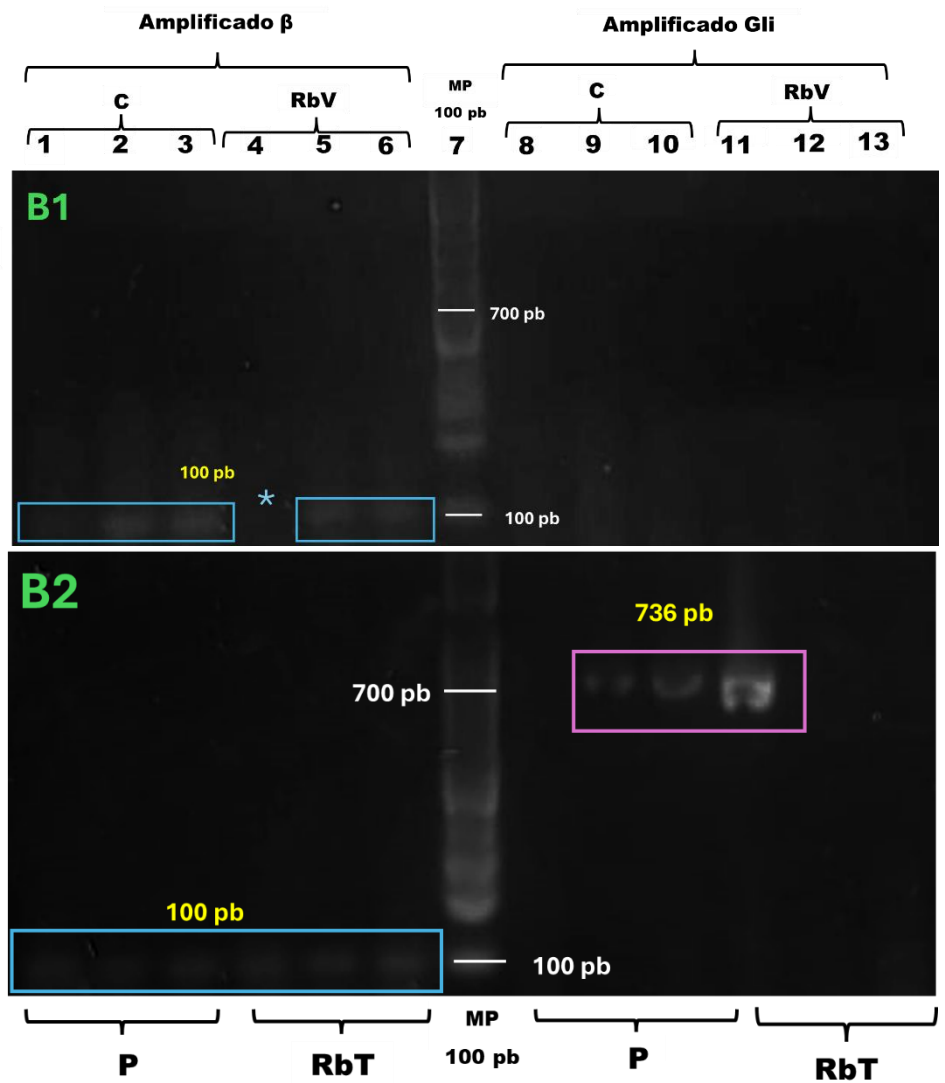
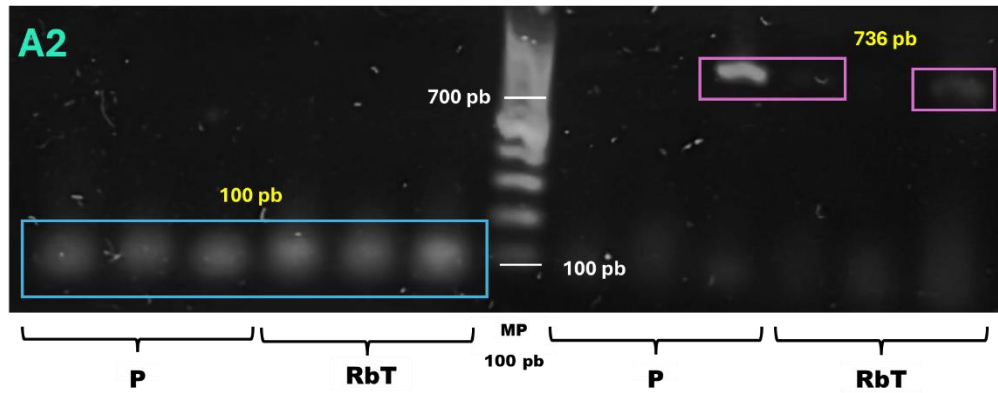
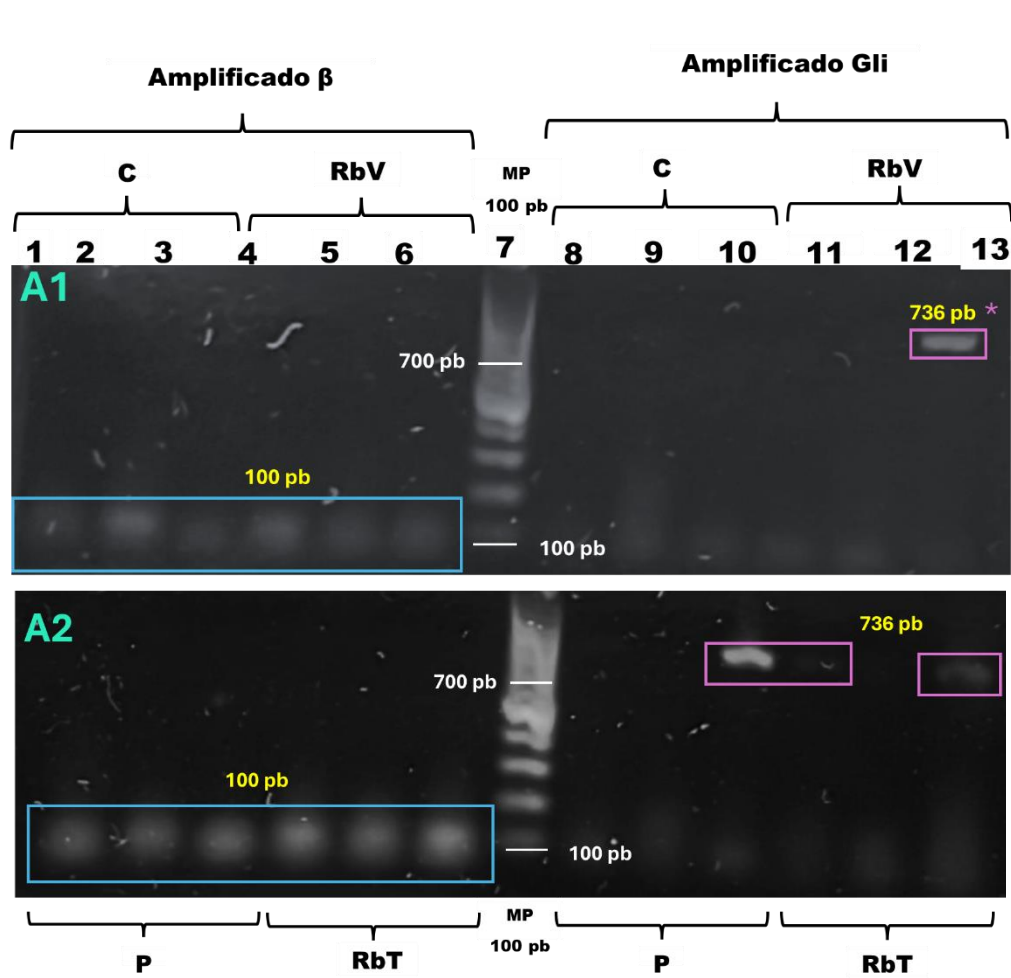


Figura 16. Demostración de la expresión de la gpG en las monocapas infectadas. En color azul se señalan los amplificados de β -globina y en morado los amplificados correspondientes a gpG. EGA 2%

Debido a la ausencia de amplificación o amplificación no esperada, se repitieron las reacciones RbV3, RbT2 (24 h) RbV1, P1, RbT2 y RbT3 (48 h) aumentando la concentración de ARN (muestras en las que aún se tenía disponibilidad) usada inicialmente (tabla 4). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 17.

Tabla 4. Concentración usada en las reacciones repetidas.

Tiempo evaluado	Variable	Concentración (ng) total usada en las reacciones
24 h	RbV3	200
	RbT2	237
48 h	RbV1	276
	P1	237
	RbT2	258
	RbT3	266

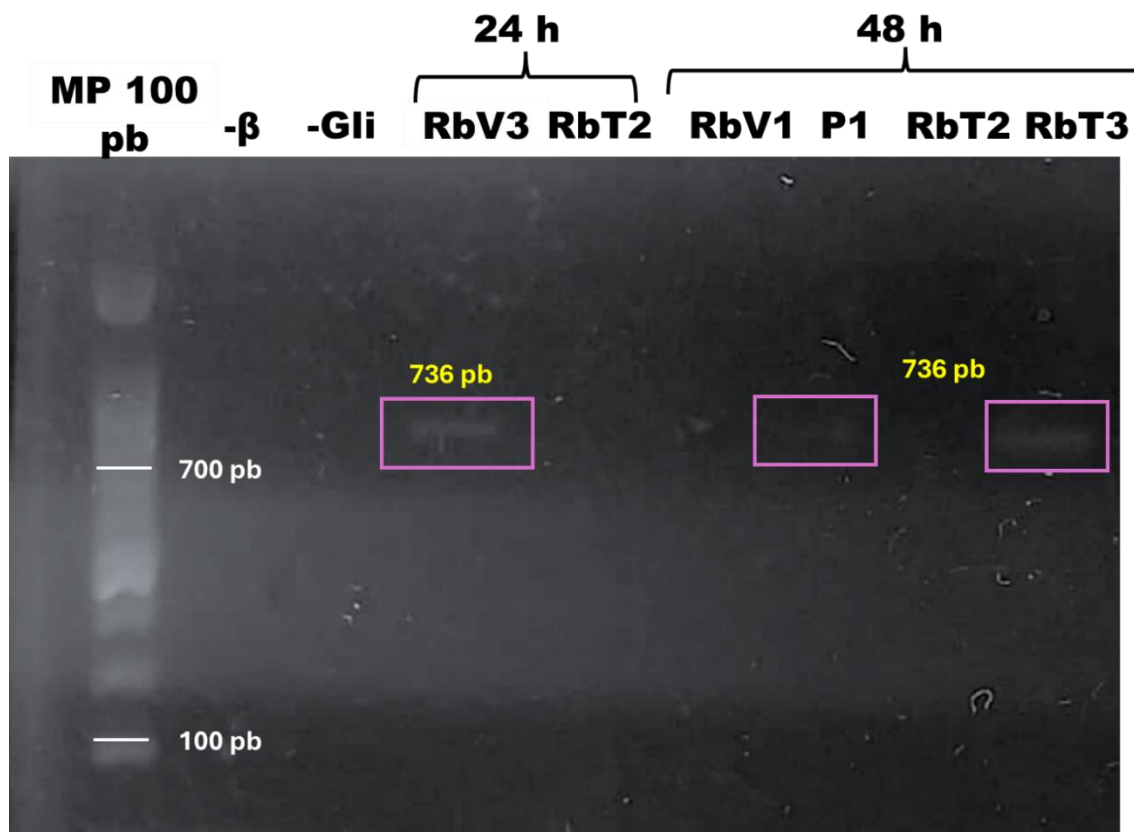


Figura 17. Reacciones de amplificación repetidas. EGA 2%

Después de la amplificación, en la tabla 5 se resumen los resultados esperados y los obtenidos.

Tabla 5. Resultados obtenidos de amplificación de cada triplicado de cada variable.

	Resultado esperado		Resultado obtenido				Resultado esperado vs obtenido			
	β-globina	Gli	24 h		48h		24 h		48 h	
			β-globina	Gli	β-globina	Gli	β-globina	Gli	β-globina	Gli
C1	+	-	+	-	+	-	✓	✓	✓	✓
C2	+	-	+	-	+	-	✓	✓	✓	✓
C3	+	-	+	-	+	-	✓	✓	✓	✓
RbV1	+	-	+	-	-	-	✓	✓	✗	✓
RbV2	+	-	+	-	+	-	✓	✓	✓	✓
RbV3	+	-	+	+	+	-	✓	✗	✓	✓
RbT1	+	+	+	+	+	+	✓	✓	✓	✓
RbT2	+	+	+	-	+	-	✓	✗	✓	✗
RbT3	+	+	+	+	+	+	✓	✓	✓	✓
P1	+	+	+	-	+	+	✓	✗	✓	✓
P2	+	+	+	-	+	+	✓	✗	✓	✓
P3	+	+	+	+	+	+	✓	✓	✓	✓

+: Amplificado

-: No amplificado

✓: El amplificado obtenido corresponde a lo esperado

✗: El amplificado obtenido no corresponde a lo esperado

La evaluación como vector de la cepa RB51/pBBR1-CMV-Ggp-SV40+, se realizó mediante la expresión de ARNm de la gpG después de la infección de monocapas celulares de HeLa, este modelo celular fue elegido debido a que ha sido ampliamente usado para el estudio de adhesión, internalización, supervivencia, replicación y tráfico intracelular de *Brucella* en células no fagocíticas profesionales (Casanova et al., 2016; Iannino et al., 2012; Sidhu-Muñoz et al., 2018; Verdiguél-Fernández et al., 2017). Por otro lado, la expresión de gpG en el plásmido vacunal está bajo la regulación del promotor de CMV que es compatible con células eucariotas, por lo que células HeLa son un modelo

válido para responder si la cepa RbT es útil como vector para entregar el plásmido, aun cuando las células blanco de *Brucella* son macrófagos, células dendríticas y trofoblastos, además, al tratarse de células epiteliales éstas constituyen la primera barrera mecánica e inmunológica en la infección contra *Brucella* (Rossetti et al., 2012), cuestión que es importante tomar en cuenta dado el planteamiento de la estrategia de entrega del plásmido antirrábico propuesto en este trabajo, también se consideró que la línea Hela son células de cérvix y *B. abortus* presenta tropismo por el sistema reproductor (Casanova et al., 2016; Iannino et al., 2012; Sidhu-Muñoz et al., 2018; Verdiguél-Fernández et al., 2017).

Se hizo uso de cebadores que amplifican el gen de β -globina, como control interno de la prueba con el fin de evaluar la calidad de la muestra, así como el correcto funcionamiento de la prueba molecular; el uso de este gen ya ha sido propuesto anteriormente (Morán-Torres et al., 2021; Wu et al., 2017; YANG et al., 2015). Como se aprecia en la figura 16, se tuvo amplificado de β -globina para la mayor parte de las repeticiones de los triplicados, sin embargo; para una repetición de RbV a las 48 h (marcado con *) no se obtuvo amplificación, debido a esto, se decidió repetir la amplificación de éste aumentando la concentración de molde usada (tabla 4), como se aprecia en la figura 17, nuevamente no se aprecia amplificado, esto nos lleva a pensar en problemas propios de la muestra como un bajo rendimiento o su degradación, la integridad del ARN es fundamental para el éxito y la reproducibilidad de los experimentos; esta puede ser determinada mediante el ratio 2:1 de las bandas 28S y 18S (Li et al., 2024; ThermoFisher, 2025) cuya presencia se observa en la figura 15 para el resto de las muestras excepto para esta, en el carril correspondiente a esta muestra se ve un barrido que sugiere la degradación de la muestra, esta puede deberse a diferentes factores entre los que se encuentran la acción de ribonucleasas (RNAsa) así como las condiciones ambientales en las que se lleva a cabo la extracción como pH, presencia de cationes divalentes o temperatura (Bennet Hunter, 2025).

Con respecto a la amplificación de ARNm de la gpG en las células infectadas con RbT, a las 24 horas se obtuvo amplificado en una repetición del triplicado de P, y dos más en RbT; a las 48 horas se obtuvieron dos amplificados para P y uno para RbT; sin embargo, como se observa en la figura 16, se obtuvo un amplificado no esperado en el

control negativo de vector (marcado con *), debido a esto y a la ausencia de amplificadores en los controles de expresión así como en la variable evaluada, fue necesario hacer repeticiones de las reacciones de las que aún se tuviera disponibilidad de ARN. Como se aprecia en la figura 17, al aumentar la concentración de ARN en la reacción, se logró obtener amplificado esperado en P y en una variable evaluada (RbT) a las 48 h (figura 17/tabla 5); sin embargo, se mantuvo el amplificado en el control negativo de vector (RbV3), debido a la no reproducibilidad de este, así como al mantenerse al repetirse la amplificación, se considera una posible contaminación durante la extracción de ARN.

Como se expone en el apartado 8.5, la relación célula: bacteria final fue mayor a la propuesta; sin embargo, considerando que la dosis aplicada de RB51 para becerras es de $1-3 \times 10^{10}$ y en vacas mayores es de $1-3 \times 10^9$, la cantidad total de bacterias (4×10^8) por célula es menor que ésta y aun así fue suficiente para su internalización e inducir la expresión de la gpG en las células eucariotas.

9. CONCLUSIONES

1. La amplificación del gen *ery* permitió confirmar la identidad de las cepas de *Brucella*, así mismo, la presencia del marco de lectura de la gpG en RbT y su ausencia en RbV aseguró que los experimentos de infección fueron realizados con las cepas adecuadas.
2. La amplificación de Gli en el modelo de células HeLa infectadas con la cepa RB51/pBBR1-CMV-Ggp-SV40+, es una evidencia preliminar del potencial de esta cepa para entregar el plásmido vacunal antirrábico.

10. PERSPECTIVAS

1. Demostrar la presencia de la gpG en células infectadas con la cepa RB51/pBBR1-CMV-Ggp-SV40+
2. Evaluar la cepa RB51/pBBR1-CMV-Ggp-SV40+ en infecciones de modelos animales para poder medir la respuesta inmune activada por esta.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abedi, M., Haftcheshmeh, S. M., Bashar, R., Kesharwani, P., Samadi, M., & Sahebkar, A. (2023). Rabies vaccine: Recent update and comprehensive review of in vitro and in vivo studies. *Process Biochemistry*, 124, 201–220. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.11.011>
- Ahmad, M., Prensky, H., Balestrieri, J., ElNaggar, S., Gomez-Simmonds, A., Uhlemann, A.-C., Traxler, B., Singh, A., & Lopatkin, A. J. (2023). Tradeoff between lag time and growth rate drives the plasmid acquisition cost. *Nature Communications*, 14(1), 2343. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38022-6>
- Bennet Hunter. (2025). *RNA Integrity Assessment for RT-PCR: A Comprehensive Guide for Accurate Gene Expression Analysis*.
- Bricker, B., Goonesekere, N., Bayles, D., Alt, D., Olsen, S., & Vrentas, C. (2020). Genome report-a genome sequence analysis of the RB51 strain of brucella abortus in the context of its vaccine properties. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 10(4), 1175–1181. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400964>
- Bricker, B. J., & Halling, S. M. (1995). Enhancement of the Brucella AMOS PCR Assay for Differentiation of Brucella abortus Vaccine Strains S19 and RB51. In *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* (Vol. 33, Issue 6).
- Carvalho, T. P. de, Silva, L. A. da, Castanheira, T. L. L., Souza, T. D. de, Paixão, T. A. da, Lazaro-Anton, L., Tsolis, R. M., & Santos, R. L. (2023). Cell and Tissue Tropism of Brucella spp. *Infection and Immunity*, 91(5). <https://doi.org/10.1128/iai.00062-23>
- Casanova, A., Low, S. H., Emmenlauer, M., Conde-Alvarez, R., Salcedo, S. P., Gorvel, J.-P., & Dehio, C. (2016). Microscopy-based Assays for High-throughput Screening of Host Factors Involved in Brucella Infection of Hela Cells. *Journal of Visualized Experiments*, 114. <https://doi.org/10.3791/54263>
- Córdova Izquierdo, A., Iglesias, A. E., Cervantes, R. E., Eulogio, J., Liera, G., Fabio, J., Castro, I., Abel, E., Mancera, V., Mendoza, M. M., Crispín, R. H., De, M., Mosqueda, L. J., Gómez Vázquez, A., Arroyo, G. C., Méndez Hernández, W., Olivares Pérez, J., Velázquez, V., Sánchez, P., & Engormkx, C. (2020). *IMPORTANCIA DE LA BRUCELOSIS BOVINA Y CONSECUENCIAS ECONÓMICAS PARA EL GANADERO Volver a: Enfermedades y problemas reproductivos*. www.produccion-animal.com.ar
- Curtsinger, H. D., Martínez-Absalón, S., Liu, Y., & Lopatkin, A. J. (2025). The metabolic burden associated with plasmid acquisition: An assessment of the unrecognized benefits to host cells. *BioEssays*, 47(2). <https://doi.org/10.1002/bies.202400164>
- Dan Zhu, Mengyue Mengyue, Aodeng Qimuge, Bilige Bilige, Tegexi Baiyin, Temuqile Temuqile, Shana Chen, Siqin Borjigen, Huricha Baigude, & Dezhi Yang. (2022). *Oral*

Delivery of SARS-CoV-2 DNA Vaccines Using Attenuated Salmonella typhimurium as a Carrier in Rat. <https://doi.org/https://doi.org/10.3103/s0891416822030107>

- Davis, B. M., Rall, G. F., & Schnell, M. J. (2015). Everything You Always Wanted to Know About Rabies Virus (But Were Afraid to Ask). *Annual Review of Virology*, 2(1), 451–471. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055157>
- de Melo, G. D., Hellert, J., Gupta, R., Corti, D., & Bourhy, H. (2022). Monoclonal antibodies against rabies: current uses in prophylaxis and in therapy. *Current Opinion in Virology*, 53, 101204. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2022.101204>
- Dorneles, E. M. S., Sriranganathan, N., & Lage, A. P. (2015). Recent advances in Brucella abortus vaccines. In *Veterinary Research* (Vol. 46, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0199-7>
- Eng, S. W., Vilassini, M., Lohshinni, P., Tew, H. X., Norazmi, M. N., Ravichandran, M., & Lee, S. Y. (2024a). Live Attenuated Bacterial Vectors as Vehicles for DNA Vaccine Delivery: A Mini Review. In *Malaysian Journal of Medical Sciences* (Vol. 31, Issue 6, pp. 6–20). Penerbit Universiti Sains Malaysia. <https://doi.org/10.21315/mjms2024.31.6.2>
- Eng, S. W., Vilassini, M., Lohshinni, P., Tew, H. X., Norazmi, M. N., Ravichandran, M., & Lee, S. Y. (2024b). Live Attenuated Bacterial Vectors as Vehicles for DNA Vaccine Delivery: A Mini Review. In *Malaysian Journal of Medical Sciences* (Vol. 31, Issue 6, pp. 6–20). Penerbit Universiti Sains Malaysia. <https://doi.org/10.21315/mjms2024.31.6.2>
- Gómez, L., & Oñate, A. (2019). Plasmid-Based DNA Vaccines. In *Plasmid*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76754>
- Hellert, J., Buchrieser, J., Larrous, F., Minola, A., de Melo, G. D., Soriaga, L., England, P., Haouz, A., Telenti, A., Schwartz, O., Corti, D., Bourhy, H., & Rey, F. A. (2020). Structure of the prefusion-locking broadly neutralizing antibody RVC20 bound to the rabies virus glycoprotein. *Nature Communications*, 11(1), 596. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14398-7>
- Iannino, F., Ugalde, J. E., & Iñón de Iannino, N. (2012). Brucella abortus efp gene is required for an efficient internalization in HeLa cells. *Microbial Pathogenesis*, 52(1), 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2011.09.008>
- Jordan, M., & Wurm F. (2004). Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate. *Methods*, 33(2), 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2003.11.011>
- Knowles, M. K., Nadin-Davis, S. A., Sheen, M., Rosatte, R., Mueller, R., & Beresford, A. (2009). Safety studies on an adenovirus recombinant vaccine for rabies (AdRG1.3-ONRAB®) in target and non-target species. *Vaccine*, 27(47), 6619–6626. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.08.005>

- Kozak, M., & Hu, J. (2024). DNA Vaccines: Their Formulations, Engineering and Delivery. *Vaccines*, 12(1), 71. <https://doi.org/10.3390/vaccines12010071>
- Li, S., Liu, J., Zhao, M., Su, Y., Cong, B., & Wang, Z. (2024). RNA quality score evaluation: A preliminary study of RNA integrity number (RIN) and RNA integrity and quality number (RNA IQ). *Forensic Science International*, 357, 111976. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2024.111976>
- Lian, M., Hueffer, K., & Weltzin, M. M. (2022). Interactions between the rabies virus and nicotinic acetylcholine receptors: A potential role in rabies virus induced behavior modifications. In *Heliyon* (Vol. 8, Issue 9). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10434>
- Liu, X., Yang, Y., Sun, Z., Chen, J., Ai, J., Dun, C., Fu, Z. F., Niu, X., & Guo, X. (2014). A Recombinant Rabies Virus Encoding Two Copies of the Glycoprotein Gene Confers Protection in Dogs against a Virulent Challenge. *PLoS ONE*, 9(2), e87105. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087105>
- Lloren, K. K. S., Jawalagatti, V., Hewawaduge, C., Chandran, S., Park, J. Y., & Lee, J. H. (2023). Salmonella-mediated oral delivery of multiple-target vaccine constructs with conserved and variable regions of SARS-CoV-2 protect against the Delta and Omicron variants in hamster. *Microbes and Infection*, 25(5). <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2023.105101>
- Lu, B., Lim, J. M., Yu, B., Song, S., Neeli, P., Sobhani, N., K, P., Bonam, S. R., Kurapati, R., Zheng, J., & Chai, D. (2024). The next-generation DNA vaccine platforms and delivery systems: advances, challenges and prospects. *Frontiers in Immunology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1332939>
- Miki, K., Nagata, T., Tanaka, T., Kim, Y. H., Uchijima, M., Ohara, N., Nakamura, S., Okada, M., & Koide, Y. (2004). Induction of Protective Cellular Immunity against Mycobacterium tuberculosis by Recombinant Attenuated Self-Destructing Listeria monocytogenes Strains Harboring Eukaryotic Expression Plasmids for Antigen 85 Complex and MPB/MPT51. *Infection and Immunity*, 72(4), 2014–2021. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.2014-2021.2004>
- Morán-Torres, A., Pazos-Salazar, N. G., Téllez-Lorenzo, S., Jiménez-Lima, R., Lizano, M., Reyes-Hernández, D. O., Marin-Aquino, J. de J., & Manzo-Merino, J. (2021). HPV oral and oropharynx infection dynamics in young population. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(4), 1991–2000. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00602-3>
- Natesan, K., Isloor, S., Vinayagamurthy, B., Ramakrishnaiah, S., Doddamane, R., & Fooks, A. R. (2023). Developments in Rabies Vaccines: The Path Traversed from Pasteur to the Modern Era of Immunization. In *Vaccines* (Vol. 11, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/vaccines11040756>

- OMSA. (2022). *Manual Terrestre*. <https://www.woah.org/es/que-hacemos/sanidad-y-bienestar-animal/recopilacion-de-datos-sobre-enfermedades/>
- Pagliari, S., Dema, B., Sanchez-Martinez, A., Montalvo Zurbia-Flores, G., & Rollier, C. S. (2023). DNA Vaccines: History, Molecular Mechanisms and Future Perspectives. *Journal of Molecular Biology*, 435(23), 168297. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2023.168297>
- Pazos Salazar, N. G., Benítez Serrano, J. C., Calderón Chamorro, J. L., Hernández-Castro, R., & Setién, J. A. A. (2015). *Estabilidad de la cepa vacunal B. abortus S19 portadora de un plásmido de expresión eucariota codificante de la glicoproteína G del virus de la rabia*. <http://www.revistas.unam.mx/index.php/Veterinaria-Mexicooa>
- PRONABIVE. (2019). *Vacunas utilizadas en la Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales*.
- Ross B, A., Favi C, M., & Vásquez V, A. (2008). Glicoproteína del virus rábico: Estructura, inmunogenicidad y rol en la patogenia. *Revista Chilena de Infectología*, 25(2). <https://doi.org/10.4067/S0716-10182008000200016>
- Rossetti, C. A., Drake, K. L., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.03.003>
- Rouches, M. V., Xu, Y., Cortes, L. B. G., & Lambert, G. (2022). A plasmid system with tunable copy number. *Nature Communications*, 13(1), 3908. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31422-0>
- Sabio, J. V., García, Bigi, F., Rossetti, O., & Campos, E. (2010). Expression of MPB83 from *Mycobacterium bovis* in *Brucella abortus* S19 induces specific cellular immune response against the recombinant antigen in BALB/c mice. *Microbes and Infection*, 12(14–15), 1236–1243. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.09.009>
- Sabio y García, J. V., Farber, M., Carrica, M., Cravero, S., Macedo, G. C., Bigi, F., Oliveira, S. C., Rossetti, O., & Campos, E. (2008). Expression of *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 (RAP1) in *Brucella abortus* S19. *Microbes and Infection*, 10(6), 635–641. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.02.010>
- SENASICA. (2025a). *INDICADORES VIGILANCIA RABIA*.
- SENASICA. (2025b). *Vigilancia brucelosis bovina-prueba de tarjeta*.
- Seow, Y., & Wood, M. J. (2009). Biological gene delivery vehicles: Beyond viral vectors. In *Molecular Therapy* (Vol. 17, Issue 5, pp. 767–777). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.41>

- Sidhu-Muñoz, R. S., Sancho, P., & Vizcaíno, N. (2018). Evaluation of human trophoblasts and ovine testis cell lines for the study of the intracellular pathogen *Brucella ovis*. *FEMS Microbiology Letters*, 365(24). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny278>
- Sieira, R., Comerci, D. J., Sánchez, D. O., & Ugalde, R. A. (2000). A Homologue of an Operon Required for DNA Transfer in *Agrobacterium* Is Required in *Brucella abortus* for Virulence and Intracellular Multiplication. *Journal of Bacteriology*, 182(17), 4849–4855. <https://doi.org/10.1128/JB.182.17.4849-4855.2000>
- Stranahan, L. W., & Arenas-Gamboa, A. M. (2021). When the Going Gets Rough: The Significance of Brucella Lipopolysaccharide Phenotype in Host–Pathogen Interactions. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.713157>
- Tesoro CE, F. R. L. M. O. S. H. G. B. F. P. T. A. SJA. (2008). Efficient post-exposure prophylaxis against rabies by applying a four-dose DNA vaccine intranasally. *Vaccine*, 26, 6936–6944.
- ThermoFisher. (n.d.). *Useful Numbers for Cell Culture*.
- ThermoFisher. (2025). *Methods to Check RNA Integrity*.
- Thorat, V. D., Bannalikal, A. S., & Majee, S. B. (2022). Evaluation of EryC as Molecular Marker for Differential Identification of Brucella abortus from Vaccine Strain S 19. *Indian Journal of Animal Research*, Of. <https://doi.org/10.18805/IJAR.B-4812>
- Vemulapalli, R., He, Y., Boyle, S. M., Sriranganathan, N., & Schurig, G. G. (2000). Brucella abortus Strain RB51 as a Vector for Heterologous Protein Expression and Induction of Specific Th1 Type Immune Responses. In *INFECTION AND IMMUNITY* (Vol. 68, Issue 6). <https://journals.asm.org/journal/iai>
- Verdiguél-Fernández, L., Oropeza-Navarro, R., Basurto-Alcántara, F. J., Castañeda-Ramírez, A., & Verdugo-Rodríguez, A. (2017). Omp31 plays an important role on outer membrane properties and intracellular survival of Brucella melitensis in murine macrophages and HeLa cells. *Archives of Microbiology*, 199(7), 971–978. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1360-7>
- Wang, Y., Xiang, Z., Pasquini, S., & Ertl, H. C. J. (1997). The Use of an E1-Deleted, Replication-Defective Adenovirus Recombinant Expressing the Rabies Virus Glycoprotein for Early Vaccination of Mice against Rabies Virus. In *JOURNAL OF VIROLOGY* (Vol. 71, Issue 5).
- Wu, L., Peng, Z., Lu, S., Tan, M., Rong, Y., Tian, R., Yang, Y., Chen, Y., & Chen, J. (2017). β -thalassemia caused by compound heterozygous mutations and cured by bone marrow transplantation: A case report. *Molecular Medicine Reports*, 16(5), 6552–6557. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7476>

- Yang, Kim, H.-H., Lee, K.-W., & Song, J.-Y. (2013). The present and future of rabies vaccine in animals. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 2(1), 19. <https://doi.org/10.7774/cevr.2013.2.1.19>
- Yang, Lin, S., Ye, F., Yang, J., Qi, J., Chen, Z., Lin, X., Wang, J., Yue, D., Cheng, Y., Chen, Z., Chen, H., You, Y., Zhang, Z., Yang, Y., Yang, M., Sun, H., Li, Y., Cao, Y., ... Lu, G. (2020). Structural Analysis of Rabies Virus Glycoprotein Reveals pH-Dependent Conformational Changes and Interactions with a Neutralizing Antibody. *Cell Host and Microbe*, 27(3), 441-453.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.12.012>
- YANG, Q., LI, X., AHMED ALI, H. A., YU, S., ZHANG, Y., WU, M., GAO, S., ZHAO, G., DU, Z., & ZHANG, G. (2015). Evaluation of suitable control genes for quantitative polymerase chain reaction analysis of maternal plasma cell-free DNA. *Molecular Medicine Reports*, 12(5), 7728–7734. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4334>
- Yin, J., Wang, X., Mao, R., Zhang, Z., Gao, X., Luo, Y., Sun, Y., & Yin, X. (2021). Research advances on the interactions between rabies virus structural proteins and host target cells: Accrued knowledge from the application of reverse genetics systems. In *Viruses* (Vol. 13, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/v13112288>
- Zandi, F., Goshadrou, F., Meyfour, A., & Vaziri, B. (2021). Rabies Infection: An Overview of Lyssavirus-Host Protein Interactions. *Iranian Biomedical Journal*, 25(4), 226–242. <https://doi.org/10.52547/ibj.25.4.226>
- Zhang, G., Wang, H., Mahmood, F., & Fu, Z. F. (2013). Rabies virus glycoprotein is an important determinant for the induction of innate immune responses and the pathogenic mechanisms. *Veterinary Microbiology*, 162(2–4), 601–613. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.031>
- Zhi Quan Xiang, Spitalnik Steven, Tran Minh, Wunner William H, Cheng Jun, & Ertl Hildegund C.J. (1994). *Vaccination with a Plasmid Vector Carrying the Rabies Virus Glycoprotein Gene Induces Protective Immunity against Rabies Virus*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/viro.1994.1105>
- Zhou, Z. P., Chen, Z. R., Bandara, R. A., Duan, R., Cao, H., Liu, J., & Hu, J. (2026). DNA-Based Vaccines: Advances, Applications, and Future Prospects. *Genes & Diseases*, 102025. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2025.102025>

12. ANEXOS

Anexo 1. Conteo de UFC de RB51 y RB51/pBBR1-CMV-Ggp-SV40+ para determinar el momento óptimo de crecimiento

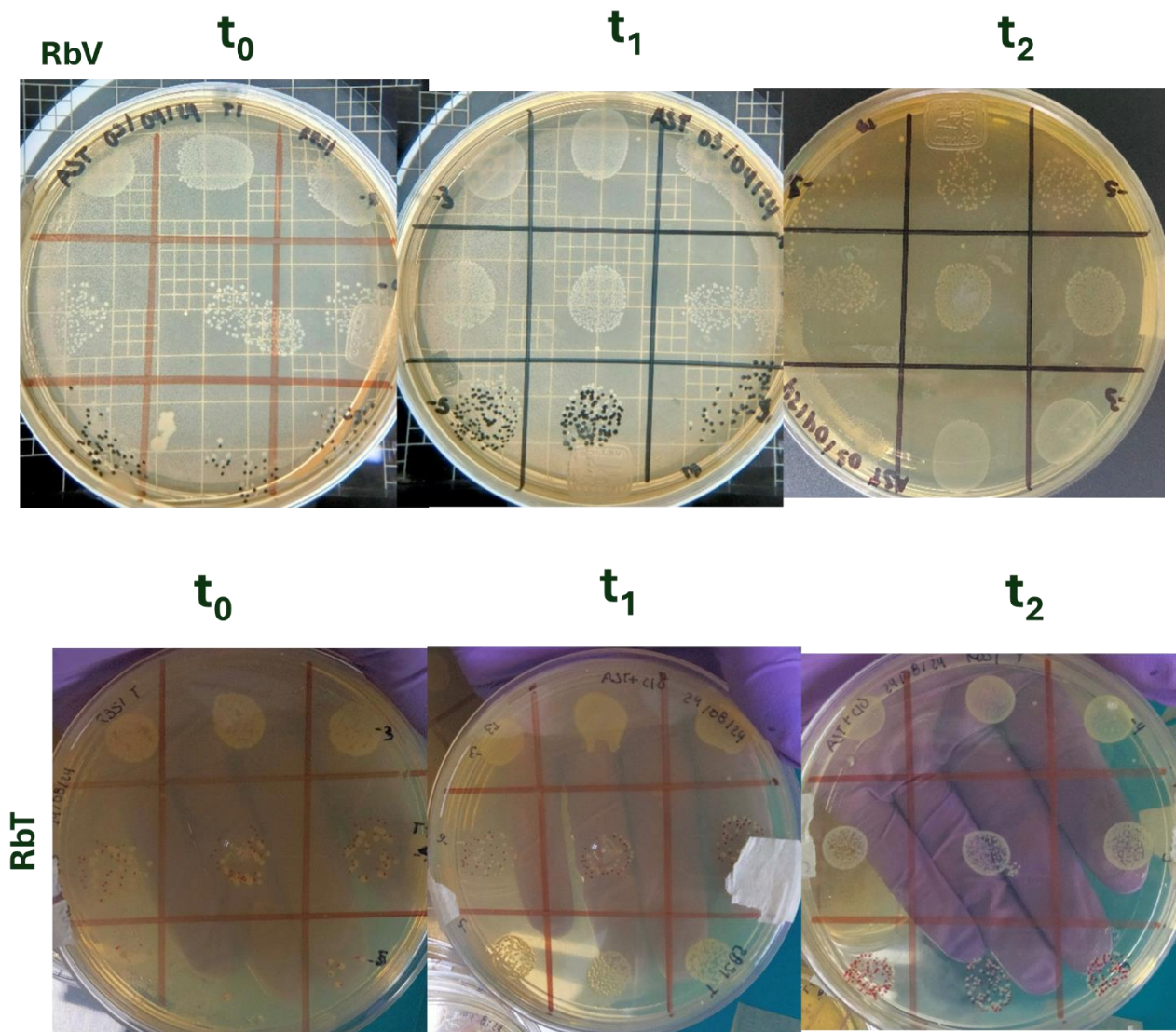


Figura 18. Conteo de UFC para RbV y RbT. Los conteos de UFC se realizaron por triplicado y se tomó la dilución en la que había colonias contables y significativas.

Anexo 2. Protocolos de amplificación usados

Tabla 6. Protocolo de amplificación de ERI y GPG

	Temperatura	Tiempo	# Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	10 min.	1
Desnaturalización	95°C	30 s	35
Alineamiento	60°C	30 s	
Extensión	72°C	2:05 min	
Extensión final	72°C	10 min	1

Tabla 7. Protocolo de amplificación de β -Globina y Gli

	Temperatura	Tiempo	# Ciclos
Retrotranscripción	50°C	10 min.	1
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	30 s	35
Alineamiento	60 °C	30 s	
Extensión	72°C	40 s	
Extensión final	72°C	5 min	1

Anexo 3. Infección de las monocapas de HeLa

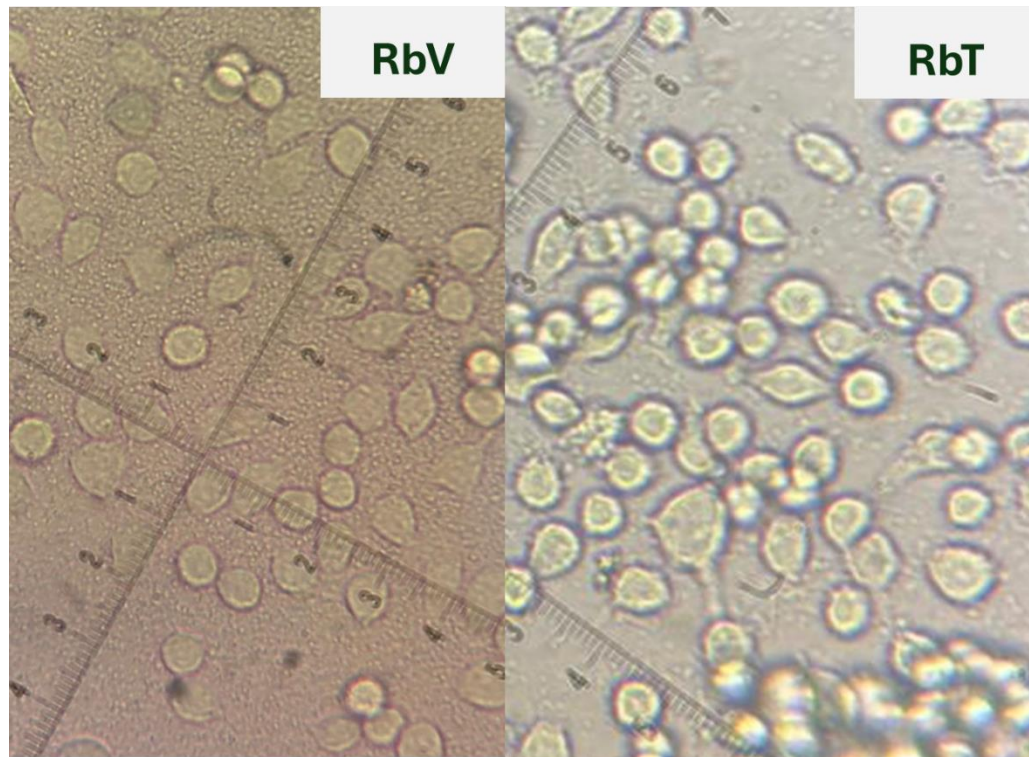


Figura 19. Infección de las monocapas de células HeLa. Con RbV (izquierda) y RbT (derecha)

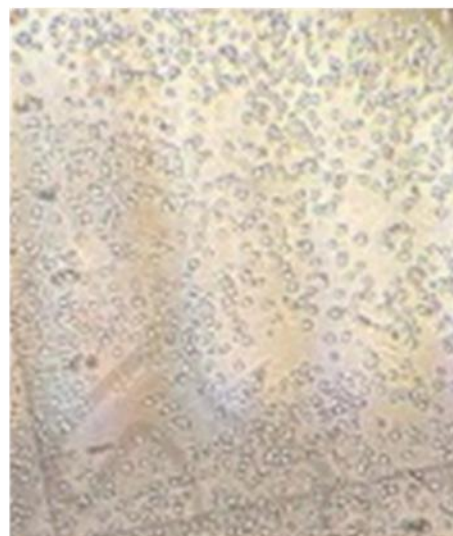
Anexo 4. Morfología de las monocapas de HeLa 24 y 48 h post tratamiento.

24 h

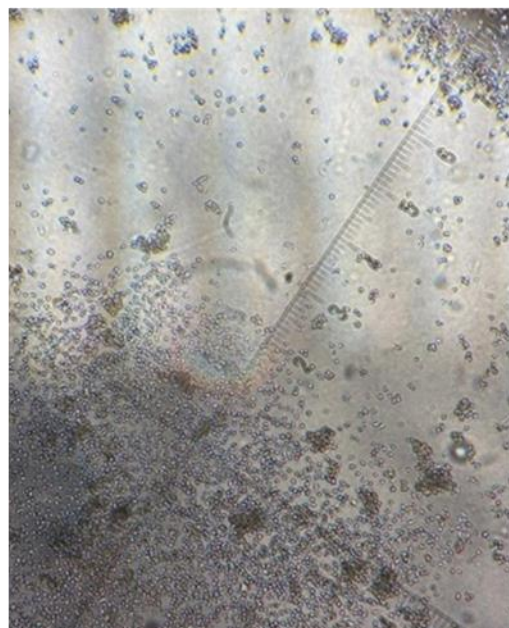
C



RbV



P



RbT

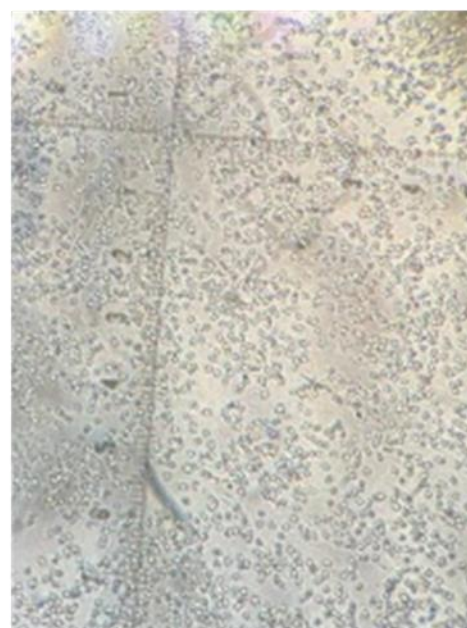


Figura 20. Morfología de las monocapas de células HeLa registrada 24 h postratamiento.

48 h

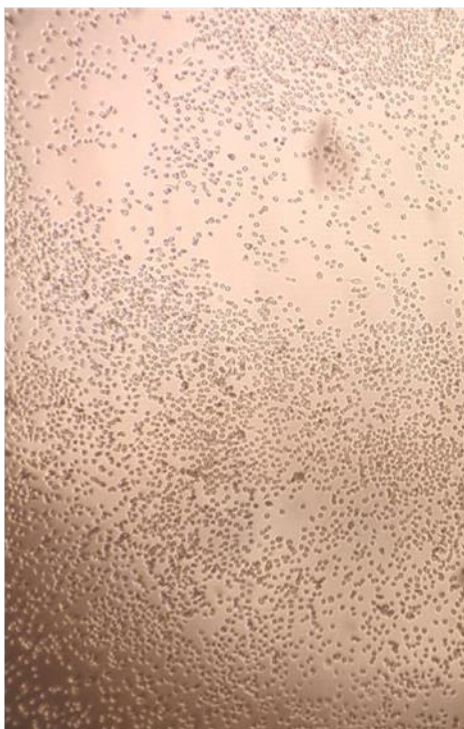
C



RbV



P



RbT



Figura 21. Morfología registrada en las monocapas de células HeLa 48 h postratamiento