

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y
ZONÓTICAS**



“Determinación de la capacidad de *Brucella canis* cepa silvestre, para multiplicarse intracelularmente”

TESIS SUSTENTADA POR:

María Concepción Medina Rojas

PARA OPTAR AL GRADO DE MASTER EN

ENFERMEDADES

INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

TEGUCIGALPA M.D.C. JUNIO, 2012 HONDURAS C.A.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y

ZONÓTICAS

RECTORA

JULIETA CASTELLANOS, M.Sc.

VICERRECTORA ACADÉMICA

RUTILIA CALDERON, Ph.D.

DIRECTORA DEL SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

OLGA MARINA JOYA, Ph.D.

DECANA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

MIRNA MARÍN, Ph.D.

COORDINADORA DEL POSTGRADO EN ENFERMEDADES

INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

MARITZA CANALES GIRON, M.Sc.

TEGUCIGALPA, M.D.C.

JUNIO, 2012

HONDURAS C.A

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE HONDURAS

MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y
ZONOTICAS

ASESOR DE TESIS

ESTEBAN CHAVES OLARTE, Ph.D.

CO-ASESOR DE TESIS

EDGARDO MORENO, Ph.D.

TERNA EXAMINADORA:

ESTEBAN CHAVES OLARTE, Ph.D.

EDGARDO MORENO, Ph.D.

NORMAN ROJAS, Ph.D.

DEDICATORIA

A mis papás y hermanas por todo su amor, apoyo y comprensión. A Sophia y Jimena por su dulzura todos los días. A Carol y Montserrat por ser las mejores amigas; y a mis compañeros de maestría por tantos buenos y difíciles momentos compartidos.

RECONOCIMIENTOS

A la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional en Heredia, Costa Rica, particularmente al Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales (PIET) y en especial a mi equipo de asesores: Esteban Chaves, Edgardo Moreno y Caterina Guzmán-Verrí por sus invaluable aportes, enseñanzas y disposición para este proyecto.

A la Escuela de Microbiología de la UNAH y la coordinación de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas por las facilidades brindadas durante todo este proceso.

A Pamela Altamirano, Amanda Castillo, César Jimenez, Nazareth Ruiz, Grettel Arce, Karla Ruiz, Carlos Chacón, Reynaldo Pereira, Carlos Quesada, Elías Barquero y Esteban Lizano, por su valiosa colaboración, sincera amistad y apoyo.

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| LISTA DE CUADROS..... | i |
| LISTA DE FIGURAS..... | ii |
| LISTA DE ANEXOS..... | iii |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | iv |
| CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| CAPÍTULO 2: REVISIÓN DE LITERATURA..... | 5 |
| 2.1 Brucelosis como enfermedad..... | 5 |
| 2.1.1 Zoonosis..... | 5 |
| 2.1.2 Brucelosis animal..... | 6 |
| 2.1.3 Brucelosis humana..... | 8 |
| 2.1.4 Epidemiología y distribución mundial..... | 10 |
| 2.2 <i>Brucella</i> como género bacteriano:..... | 11 |
| 2.3 Patogénesis de la brucelosis..... | 15 |
| 2.3.1 Colonización y evasión del sistema inmune..... | 15 |
| 2.3.2 Internalización y tránsito intracelular..... | 17 |
| 2.3.3 Sistema de Dos Componentes BvrR/BvrS..... | 22 |
| 2.3.4 Sistema de Secreción Tipo IV VirB..... | 26 |
| 2.4 Justificación..... | 31 |

| | |
|--|----|
| 2.5 Objetivos..... | 32 |
| 2.5.1 Objetivo general..... | 32 |
| 2.5.2 Objetivos específicos..... | 32 |
| CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA..... | 33 |
| 3.1 Tipo de estudio: | 33 |
| 3.2 Consideraciones éticas..... | 33 |
| 3.3 Consideraciones de bioseguridad | 34 |
| 3.4 Cepas bacterianas y células utilizadas en el estudio | 34 |
| 3.5 Curva de crecimiento de <i>Brucella canis</i> | 38 |
| 3.6 Generación de la cepa <i>Brucella canis</i> - GFP (Proteína Verde Fluorescente)..... | 38 |
| 3.7 Generación de anticuerpos anti <i>B. canis</i> | 40 |
| 3.8 Procesos de infección de células fagocíticas y no fagocíticas con <i>B. canis</i> en etapa logarítmica..... | 40 |
| 3.9 Microscopía por Inmunofluorescencia | 41 |
| 3.10 Cuantificación de Factor de Necrosis Tumoral α en macrófagos Raw 264.7 | 43 |
| 3.11 Expresión de factores de virulencia en <i>B. canis</i> , usando la técnica de Western Blot..... | 44 |
| 3.12 Ensayo de virulencia en modelos murinos | 45 |

| | |
|---|----|
| 3.13 Análisis estadístico | 46 |
| CAPÍTULO 4: RESULTADOS | 47 |
| 4.1 Caracterización de la cepa de <i>B. canis</i> utilizada en los estudios mediante la técnica de PCR Bruceladder | 47 |
| 4.2 Generación de la cepa <i>B. canis</i> fluorescente | 50 |
| 4.3 Generación de anticuerpos anti <i>Brucella canis</i> en ratones | 52 |
| 4.4 Ensayos de virulencia con <i>B. canis</i> en modelos murinos | 54 |
| 4.5 Ensayos de virulencia en líneas celulares epiteliales humanas y macrófagos murinos | 57 |
| 4.6 Activación de células fagocíticas por parte de <i>B. canis</i> | 62 |
| 4.7 Expresión del sistema de secreción IV VirB en <i>B. canis</i> | 65 |
| CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN | 67 |
| CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS | 78 |
| CAPÍTULO 7: REFERENCIAS | 80 |
| ANEXOS | 96 |

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Nomenclatura y características de las especies de *Brucella*

Cuadro 2: Caracterización de las cepas bacterianas utilizadas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Verificación de la cepa de *B. canis* mediante la técnica de Bruce-ladder

Figura 2: Generación de la cepa *B. canis* GFP

Figura 3: Generación de anticuerpos anti *B. canis* GFP

Figura 4: Multiplicación de *B. canis* en ratones

Figura 5: Supervivencia de *B. canis* en células

Figura 6: Infección de macrófagos Raw 264.7 con *B. canis*

Figura 7: Inducción de TNF- α en macrófagos

Figura 8: Inducción de citoquinas en ratones

Figura 9: Expresión del T4SS VirB en *B. canis*

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Hoja de bioseguridad para especies del genero *Brucella* proporcionada por el Ministerio de Salud de Canadá (www.amexbio/blog.mx).

Anexo 2: Cronograma de actividades

Anexo 3: Flujograma de trabajo.

LISTA DE ABREVIATURAS

OMS: Organización Mundial de la Salud

OIE: Organización Mundial de Salud Animal

FAO: Organización de Alimentos y Agricultura

LPS: Lipopolisacárido

ELISA: Ensayo inmune ligado a enzimas

IFA: Inmunofluorescencia indirecta

OMP: Proteína de membrana externa

PMN: Polimorfonucleares

TLR: Receptores tipo Toll

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

LAMP- 1/LAMP-2: Glicoproteína lisosomal asociada a membranas

BSL: Nivel de Bioseguridad

ATS: Agar tripticasa de soya

CTS: Caldo tripticasa de soya

ORF: Open Reading Frames (Marcos de Lectura abierta)

EEA1: Antígeno endosomal temprano

RE: Retículo endoplásmico

MDC: Monodasil cadaverina

UFC: Unidad formadora de colonia

GFP: Proteína verde florescente

IFN γ : Interferon gamma

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), las zoonosis son consideradas enfermedades “marginadas”; a pesar de ello, éstas reciben cada vez mayor atención debido al impacto económico y de salud que representan para los países en vías de desarrollo. Una de las zoonosis de mayor impacto es la **Brucelosis**, enfermedad causada por bacterias miembros del género *Brucella*. Esta es una infección zoonótica de distribución mundial que se encuentra generalmente en países donde la actividad agrícola y ganadera es predominante. La enfermedad provoca considerables pérdidas económicas en la industria ganadera, debido a las manifestaciones clínicas que presentan los animales infectados. En Centroamérica, se estima una prevalencia de brucelosis bovina de 4 a 8% con pérdidas económicas de US\$ 25 millones al año [Fortun et al., 2002]. Actualmente en Honduras no hay datos reportados recientemente acerca de la brucelosis, y el último estudio realizado reporta una prevalencia serológica en población vulnerable de 0.8% [Javier et al., 1978].

Desde el descubrimiento de *Brucella mellitensis*, descrita por Sir David Bruce en 1887 y su transmisión a través de la leche de cabra [Edwards and Jawad, 2006; Haas, 2001], otras especies del

género han sido identificadas en diversos hospederos mamíferos entre ellos rumiantes, cerdos, perros, murinos salvajes y recientemente en algunos mamíferos marinos. Entre las especies identificadas se incluyen, *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* y *B. neotomae* y las más recientes identificadas *B. pinnipedialis* y *B. ceti* [Dawson et al., 2008b; Gonzalez-Barrientos et al., 2010; M.Kathleen Glynn, 2008; Moriyón and Lopez-Goñi, 2004]. En humanos, el principal síntoma son episodios intermitentes de fiebre, debido a lo cual se le ha denominado “fiebre ondulante” [Moriyón and Lopez-Goñi, 2004].

El principal reto que representa el control de esta zoonosis, son los mecanismos de virulencia poco convencionales que posee la bacteria. Estos microorganismos son capaces de invadir células fagocíticas profesionales y no profesionales sin desencadenar una respuesta inmune efectiva [Arenas et al., 2000; Pei and Ficht, 2004; Pei et al., 2008]. Debido a estos complejos mecanismos y otras características del género *Brucella*, se hace difícil su manejo y diagnóstico.

Como resultado de múltiples estudios para comprender la biología de *Brucella*, las bacterias se han clasificado en dos grandes grupos, las llamadas “bacterias lisas” y las denominadas “bacterias rugosas”, caracterizadas por la composición de su lipopolisacárido. Dentro de la primeras se incluyen *B. abortus*, *B. melitensis* y *B.*

suis; y en las segundas, *B. canis* y *B. ovis* [M.Kathleen Glynn, 2008]. Los proyectos de investigación se han dirigido principalmente a “bacterias lisas” naturales y ocasionalmente a mutantes rugosas, demostrando diferencias entre ambas, en sus patrones de virulencia en cuanto a internalización celular, multiplicación, citotoxicidad y activación de respuesta inmune [Bagués et al., 2004; Pei and Ficht, 2004; Pei et al., 2008]. Sin embargo, se han demostrado casos humanos y brotes graves en animales debido a “bacterias rugosas naturales” como es el caso de ***Brucella canis***, cuyo único hospedero son los caninos [Carmichael and Kenney, 1968; Lucero et al., 2010; Lucero et al., 2009; Soloaga et al., 2004; Spink and Morisset, 1970; Swenson et al., 1972].

Aunque existe un estudio publicado que analiza la interacción de cepas rugosas de *B. canis* y *B. ovis* con células eucariotas [Martín-Martín et al., 2010], este no demuestra la replicación intracelular de dichas bacterias, debido a que sus experimentos fueron únicamente a tiempos tempranos de la infección celular. Adicionalmente este artículo no evidencia replicación intracelular de bacterias con gráficos o fotografías. Por lo tanto estudios más detallados son necesarios para poder conocer a fondo la biología de este microorganismo.

Como parte de un abordaje sistemático de la brucelosis en Costa

Rica, recientemente se han detectado varios brotes epidémicos de brucelosis en criaderos de perros. A partir de estos casos se logró aislar *B. canis* de los productos abortados. Tomando en cuenta la problemática de salud que representa una zoonosis de difícil control en países en vías de desarrollo y a las preguntas aún circulando sobre la patogenicidad de este género bacteriano nos hemos propuesto en el presente estudio conocer y analizar los mecanismos de internalización de *B. canis*, una bacteria naturalmente rugosa. Partimos entonces de la hipótesis de que, a pesar de ser una cepa rugosa, *B. canis* tiene la capacidad de inducir su internalización y multiplicarse intracelularmente en compartimientos cercanos al retículo endoplásmico de células eucariotas. Al comparar los parámetros observados en bacterias lisas, mutantes rugosas y la cepa salvaje de *B. canis*, se facilitará la comprensión de los mecanismos de patogenicidad con el hospedero. Además ayudará el establecimiento de criterios de control y profilaxis más efectivos contra esta zoonosis.

CAPÍTULO 2: REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Brucelosis como enfermedad

2.1.1 Zoonosis

Los animales domésticos y salvajes, y sus ecosistemas contribuyen a la salud y bienestar de las personas; proveen proteínas y nutrientes para la alimentación, son fuente de transporte, recreación, y compañía, entre otros, pero a la vez la cercana interacción de sus ecosistemas con los humanos produce riesgos para la salud. De ahí el término de enfermedades zoonóticas, que según la OMS son aquellas comunes al hombre y a los animales. En 2004, junto a la Organización Mundial de Salud Animal (OIE) y la Organización de Alimentos y Agricultura (FAO), se definieron las zoonosis emergentes como ocasionadas por “un patógeno recientemente reconocido, o de reciente evolución, o que ha ocurrido anteriormente pero muestra un incremento en la incidencia o distribución geográfica, o cambios de hospedador o vector”. Aproximadamente un 60% de los patógenos emergentes

son zoonóticos y más del 71% son de origen silvestre [Cutler et al., 2010].

Para su mejor estudio, la OMS ha clasificado las zoonosis en, (1) virales como la rabia, influenza aviar, fiebre hemorrágica del Congo, Ébola; (2) parasitarias como la teniasis/cisticercosis, hidatidosis, equinococosis, toxoplasmosis y triquinosis; (3) ocasionalmente algunas micóticas como los dermatofitos y esporotricosis;(4) agentes no convencionales como el agente de la encefalopatía bovina esponjiforme y (5) las zoonosis bacterianas que incluyen al ántrax, campilobacteriosis, leptospirosis, shigelosis, tularemia, fiebre Q, tuberculosis y **brucelosis**.

Cada año cientos de adultos y niños mueren por enfermedades sub diagnosticadas que han surgido de la interacción ambiental entre humanos y animales. La sobrepoblación humana y los cambios ambientales han favorecido el contacto cercano del hombre con animales domésticos y salvajes [Mazet et al., 2009].

2.1.2 Brucelosis animal

La brucelosis afecta a varias especies de mamíferos salvajes y domésticos [M.Kathleen Glynn, 2008]. Los agentes etiológicos identificados parecen tener predilección por cada hospedero, por ejemplo; *B abortus* infecta el ganado bovino, *B. melitensis* el

ganado caprino y ovino, *B. suis* el ganado porcino, *B. canis* a los cánidos, *B. ovis* a los ovinos, *B. neotomae* hacia los murinos salvajes y *B. ceti* y *B. pinnipedialis* a cetáceos y pinípedos respectivamente [Dawson et al., 2008a; Mantur et al., 2006].

Las brucelas tienen tropismo por el sistema reproductivo de las hembras preñadas, siendo el signo más frecuente el aborto. La transmisión entre animales ocurre por vía oronasal, por consumo de productos abortados, membranas fetales y secreciones uterinas [Carvalho Neta et al., 2008]. La transmisión vía sexual a los machos es frecuente y las bacterias se alojan principalmente en el epidídimo, provocando inflamación testicular e infertilidad temporal [Paolicchi, 2000]. Otros signos incluyen atrofia testicular, dermatitis escrotal, disminución y alteración en la eyaculación, pérdida de libido y espermatozoides anormales con infiltración granulocítica [Hollett, 2006].

Para el diagnóstico presuntivo de la brucelosis animal se emplean pruebas serológicas de aglutinación rápida o en tubo, inmunofluorescencia indirecta (IFA) o inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA), para detección de anticuerpos anti-*Brucella*. El diagnóstico definitivo consiste en el aislamiento de las bacterias a partir de fluidos animales [OIE, 2007].

Debido a la fácil transmisión de la brucelosis en hatos de animales, se han empleado desde hace varias décadas, diferentes medidas

para su control, por ejemplo el sacrificio de los hatos infectados, que representa pérdidas económicas para los agricultores; el tratamiento antibiótico, que no siempre es efectivo, porque aunque la infección cede, este no protege de futuras recaídas y la profilaxis mediante vacunas que ha sido efectiva principalmente en países desarrollados [Moriyón and Lopez-Goñi, 2004; Saldarriaga and Rugeles, 2002a].

2.1.3 Brucelosis humana

La transmisión al hombre ocurre principalmente por el consumo de productos contaminados de origen animal, principalmente lácteos sin pasteurizar; sin embargo, también es posible la contaminación accidental por labores agrícolas y veterinarias [Laval, 2006]. El periodo de incubación promedio en humanos es de 2 a 10 semanas con síntomas que incluyen fiebre intermitente, escalofríos, astenia, fatiga, debilidad, malestar general, artralgias, dolor de la espalda baja, dolores de cabeza y anorexia. Las formas crónicas de una brucelosis sin tratar incluyen complicaciones osteo-articulares, genitourinarias y en casos extremos la muerte [Tzaneva et al., 2009]. El diagnóstico se basa en la sospecha clínica de la enfermedad, que debe confirmarse con la demostración de *Brucella* en el organismo y/o presencia de

anticuerpos en sangre. La detección serológica de anticuerpos puede hacerse mediante la prueba de Rosa de Bengala y seroaglutinación para detección de anticuerpos aglutinantes, ensayos de ELISA, prueba de Coombs para anticuerpos no aglutinantes de la clase IgG, para las cuales es necesaria una interpretación adecuada de los títulos de aglutinación [Ariza, 2002]. El aislamiento de *Brucella* desde sangre periférica, medula ósea, ocasionalmente de fluidos cerebroespinales, orina o tejidos en medios de cultivo enriquecidos de Farrel, Thayer Martin modificado, Agar tripticasa de soya, entre otros, completa el diagnóstico definitivo [OIE, 2007].

En general, la forma aguda de la brucelosis humana cede al tratamiento antibiótico, pero este debe ser estratégicamente administrado incluyendo una combinación ideal de drogas, que en conjunto incrementen su capacidad de penetrar al interior de las células eucariotas adonde se hospeda la bacteria. El esquema básico consiste en una combinación de doxiciclina por vía oral; alternativamente se puede administrar monodosis de estreptomycinina o gentamicina por vía intramuscular, lo que representa menor toxicidad para el individuo. La combinación oral de doxiciclina y rifampicina tiene más aceptación debido a su tolerancia, aunque se han calculado porcentaje de recaídas hasta en un 15% [Ariza, 2002; Corbel, 1997].

2.1.4 Epidemiología y distribución mundial

La brucelosis es considerada una enfermedad de distribución global; aunque algunos países desarrollados han logrado erradicarla, en los países mediterráneos, de medio oriente y de América Latina sigue siendo una causa importante de pérdidas económicas en la producción ganadera así como un problema importante de salud pública y animal [WHO, 2010]. Se han reportado casos humanos y animales en Australia, Nueva Zelanda, México, Centro y Sur América, Asia Central, donde la actividad agrícola es de las principales actividades de subsistencia. Al parecer Estados Unidos y algunos países de Europa han logrado erradicar la enfermedad de hatos de animales domesticados [OIE, 2007], aunque se considera sub diagnosticada según la OMS y persiste en poblaciones de animales de vida silvestre.

Estudios en bovinos de Centroamérica revelan una seroprevalencia de 4 a 8% siendo Guatemala y Costa Rica los de más alta prevalencia, mientras El Salvador presenta menos del 1% [Fortun et al., 2002]. Se estima que anualmente ocurren desde 0.01 hasta 200 casos de brucelosis en áreas endémicas, pero los porcentajes bajos podrían deberse a la poca vigilancia y sub

diagnóstico de la enfermedad [Mantur and Amarnath, 2008]. Algo similar podría estar sucediendo en los países latinoamericanos, por ejemplo, en Panamá se reporta hace 35 años apenas 1,3% de seroprevalencia en población de riesgo [Kourany et al., 1975]. En Honduras, la única publicación respecto a la enfermedad consiste en un estudio de seroprevalencia en empleados de mataderos de Tegucigalpa, que refleja la presencia de anticuerpos anti *Brucella* en tan solo un 0.8% de la población en estudio [Javier et al., 1978].

2.2 *Brucella* como género bacteriano:

Brucella es una bacteria Gram negativa que pertenece al grupo de las α 2 proteobacterias, junto a *Ochobactrum*, *Rizhobium*, *Rodhobacter*, *Agrobacterium*, *Bartonella* y *Rickettsia* [Moreno et al., 1990]. Este género se ha clasificado en especies y biovares, basado en sus propiedades bioquímicas, características fenotípicas, propiedades metabólicas, susceptibilidad a colorantes y fagos, requerimientos de CO₂, producción de H₂S y preferencias por sus hospederos [Cutler et al., 2005; Moreno et al., 2002; Moriyón and Lopez-Goñi, 2004] (Cuadro 1). Entre las propiedades más importantes para su clasificación se encuentran las

características de su endotoxina o lipopolisacárido (LPS), que las divide en “bacterias lisas” si éstas poseen la porción terminal de azúcares de dicha estructura, denominada antígeno O, y, en “bacterias rugosas” cuando carecen de dicha porción terminal [Bowden et al., 1993]. Las bacterias lisas están asociadas a mayor virulencia y estas incluyen a *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*, mientras que *B. ovis*, *B. canis* y *B. neotomae* están caracterizadas como bacterias rugosas [M.Kathleen Glynn, 2008]. Otro argumento para su clasificación es la especificidad por hospederos mamíferos que clasifica las 6 especies clásicas, teniendo así a *B. abortus* para ganado bovino, *B. melitensis* o *B. ovis* para ganado caprino y ovino, *B. suis* en ganado porcino, *B. neotomae* en murinos salvajes, *B. canis* en cánidos y 3 especies más recientes, *B. microti* en pequeños roedores (de la que no hay mucha información) , *B. ceti* y *B. pinnipedialis* en especies marinas, cetáceos y pinípedos, respectivamente [Audic et al., 2009; Hernandez-Mora et al., 2009; M.Kathleen Glynn, 2008; Mantur et al., 2006].

| Especie | Biotipo | Hospedero | Descripción | Virulencia en humanos |
|----------------------|---------|--|---------------------------|-----------------------|
| <i>B. melitensis</i> | 1-3 | Ovejas, cabras, camellos | Bruce, 1887 | ++++ |
| <i>B. abortus</i> | 1-6, 9 | Vacas, camellos, búfalos | Bang, 1897 | ++ a ++++ |
| <i>B. suis</i> | 1-5 | Cerdos (biotipos 1-3) Liebres (biotipo 2) Caribúes (biotipo 4) Renos (biotipo 4) Roedores salvajes (biotipo 5) | Traum, 1914 | + |
| <i>B. canis</i> | --- | Caninos | Carmichael y Bruner, 1968 | + |

| | | | | |
|---|-----|--|--------------------------------|---|
| <i>B. ovis</i> | --- | Ovejas | Van Drimmelen, 1953 | - |
| <i>B. neotomae</i> | --- | Roedores | Stoenner y Lackman, 1957 | - |
| <i>B. ceti</i> y <i>B. pinnipedialis</i> | --- | Ballenas, delfines, marsupiales (<i>pinnipedialis</i>) Focas (<i>ceti</i>) | Ewalt y Ross, 1994 | + |

Cuadro 1: Nomenclatura y características de las especies de *Brucella*. El grado de virulencia es estimado en escala de no virulencia (-) al más alto grado de virulencia (++++) [Pappas et al., 2005].

2.3 Patogénesis de la brucelosis

2.3.1 Colonización y evasión del sistema inmune

El primer evento tras la infección con especies del género *Brucella* es la adherencia celular o colonización, esto requiere la presencia de adhesinas en el microorganismo y receptores en el hospedero que faciliten la penetración y diseminación de las brucelas a otros tejidos. Dicha adherencia está asociada a diferentes proteínas en la membrana externa bacteriana que actúan como porinas asociadas a la capa de peptidoglicano, favoreciendo su permeabilidad [Caro-Hernandez et al., 2007; Douglas et al., 1984; Hernandez-Mora G, 2009]. Otros autores refieren éstas como proteínas de superficie, ocultas por estructuras mayores como el LPS y OMPs, similares estructuralmente a un pelo bacteriano [Castaneda-Roldan et al., 2006]. Estas OMPs han demostrado ser similares en composición de aminoácidos entre bacterias lisas y rugosas, no así en la reducción relativa de producción de porinas en las cepas rugosas [Santos et al., 1984]. Posterior a la colonización, las bacterias deben usar sus estrategias de patogenicidad iniciando con la evasión del sistema inmune del hospedero. La célula blanco de la infección es el macrófago, sin

embargo se ha visto que la degranulación de polimorfonucleares (PMN) es inhibida por esta bacteria [Saldarriaga and Rugeles, 2002b]. Una de las estrategias desarrolladas por *Brucella* para infectar los PMN es mediante la unión a miembros de la familia de receptores de integrinas en la superficie celular; se ha sugerido que estos receptores poseen especificidad de unión hacia moléculas superficiales de algunos microorganismos como el LPS bacteriano [Pearson, 1996]. Muchas proteínas solubles, como receptores de manosa, CD14 de LPS y receptores de complemento median la fagocitosis de parásitos intracelulares; *Brucella* es capaz de recubrirse con estos receptores para favorecer su permanencia en la célula sin activar la combustión oxidativa ni la liberación de metabolitos tóxicos de O₂ evitando el reconocimiento inmunológico [Lin and Ficht, 1995; Ocon et al., 1994]. Más recientemente se sugiere que este proceso se lleva a cabo a través de la intervención de los denominados receptores tipo Toll (TLR), por su semejanza a los receptores Toll en *Drosophila melanogaster*. Dichos receptores están presentes en células dendríticas y macrófagos de mamíferos, y son responsables del reconocimiento de moléculas en la pared celular bacteriana [Campos et al., 2004]. Estudios revelan que *B. abortus* en ratones, no induce leucocitosis ni reclutamiento de PMN, induce niveles mínimos de citoquinas y TNF α , apenas consume moléculas

de complemento y es resistente a péptidos bactericidas [Barquero-Calvo et al., 2007].

2.3.2 Internalización y tránsito intracelular

La principal estrategia de virulencia de *B. abortus* es su capacidad de invadir y replicarse en células tanto fagocíticas profesionales como no profesionales. La habilidad de la bacteria para evadir la respuesta inmune extracelularmente y resistir las tácticas intracelulares que buscan su destrucción le permiten establecer infecciones crónicas y diseminadas en los seres humanos y los animales. Por lo tanto comprender las estrategias empleadas por la bacteria para internalizarse es vital para el esclarecimiento y la comprensión de la patogénesis de la brucelosis.

B. abortus utiliza formas diferentes para penetrar en células fagocíticas profesionales y no profesionales. En las primeras, la bacteria es fagocitada utilizando un mecanismo tipo zipper, aprovechándose de la respuesta inmune y las características propias de las células para entrar. Las bacterias opsonizadas son fagocitadas luego de la unión con receptores Fc y receptores del complemento mientras que las no opsonizadas penetran mediante

receptores de lectinas y fibronectina. Las células fagocíticas profesionales tienen una gran capacidad para destruir las bacterias y sólo de un 15 a un 30% de las células infectadas logran mantener la replicación bacteriana [Gorvel and Moreno, 2002]. La mayoría de las bacterias no pueden evitar la fusión con el lisosoma y son destruidas por las sustancias microbicidas. Las que logran escapar del fagolisosoma eventualmente llegan a compartimentos similares al retículo endoplásmico donde se reproducen masivamente. Sin embargo el proceso dinámico de destrucción y reproducción bacteriana dentro del macrófago lleva a la formación de muchos compartimentos diferentes dentro de la célula en un momento determinado. Por lo tanto se dificulta el estudio del tránsito intracelular en este tipo de células. Pese a esto se propone que el tránsito de las bacterias que eventualmente acceden a su nicho intracelular dentro de los macrófagos no es sustancialmente diferente al observado en células no profesionales, células en donde el transporte sigue una ruta más fácil de estudiar [Freer et al., 1999]

En células fagocíticas no profesionales, *B. abortus* se internaliza mediante endocitosis mediada por receptor. Cuando la bacteria se adhiere a la membrana celular induce el reclutamiento discreto de filamentos de actina en el sitio de adhesión. Además sustancias

inhibidoras de los microtúbulos del citoesqueleto, como la colchicina, o de los filamentos de actina disminuyen la internalización entre un 10-40% [Guzman-Verri et al., 2002]. La inhibición de las GTPasas de la familia Rho (Rho, Rac, Cdc42) mediante toxinas de *Clostridium* spp. disminuye notablemente la internalización mientras que la inducción de estas proteínas con la toxina Factor de Necrosis Citotóxica de *E. coli* aumenta la internalización [Guzman-Verri et al., 2002]. Luego de entrar a las células los compartimentos llenos de *B. abortus* se pueden caracterizar como endosomas tempranos. Esto debido a que 10 minutos post-infección del 10-15% de las bacterias se encontraron en compartimentos que expresaban el antígeno de endosomal temprano (EEA1) al igual que el marcador temprano, la GTPasa Rab5 [Pizarro-Cerdá et al., 1998b]. Luego de este período las vesículas con *B. abortus* no co-localizan con los marcadores de endosomas tardíos GTPasa Rab7 y CT-M6PR sino que se encuentran con LAMP-1 y LAMP-2 (proteínas de membrana asociadas a lisosomas). Es notable sin embargo que los compartimentos con cepas virulentas de la bacteria no co-localizan con la catepsina-D una hidrolasa ácida de los lisosomas responsable de la destrucción bacteriana. Esto indica que aunque adquieran ciertas proteínas del lisosoma no ocurre la fusión con el mismo permitiendo la supervivencia bacteriana.

Es importante notar la asociación de *B. abortus* con dos familias distintas de GTPasas. La bacteria utiliza la familia de GTPasas Rho para acceder a las células no fagocíticas. Directamente activa Cdc42 y parece requerir indirectamente de Rho y Rac para establecer una invasión efectiva de las células [Guzman-Verri et al., 2002]. Por otro lado la bacteria utiliza las GTPasas de la familia Rab para regular su tránsito intracelular. La bacteria utiliza Rab5 de los endosomas tempranos para regular su tránsito intracelular y a la vez prescinde de Rab7 una GTPasa característica de los endosomas tardíos [Chaves-Olarte et al., 2002]. Esto confirma que *B. abortus* ha desarrollado estrategias diferentes para manipular dos familias de GTPasas distintas y de esta manera controlar dos procesos completamente diferentes en su biogénesis: invasión y tránsito intracelular.

Luego de evadir la vía endosomal y el lisosoma, los compartimentos con *B. abortus* 2308 adquieren proteínas marcadoras del retículo endoplásmico (RE) como la sec61 β . Estos compartimentos tardíos se pueden clasificar como autofagosomas debido a su doble membrana, la presencia de marcadores de RE que indican un origen en esta organela, el efecto que tienen en modular la vía autofagocítica en el tránsito de la bacteria y el hecho de que los compartimentos se marquen con monodansilcadaverina

(MDC) un compuesto relacionado con los autofagosomas [Gorvel and Moreno, 2002]. Finalmente los compartimentos donde la bacteria se replica activamente pierden las proteínas LAMP pero mantienen $\text{sec61}\beta$ y adquieren otros marcadores de RE como la calnexina. Estos compartimentos finales poseen una sola membrana y se encuentran en una posición perinuclear dentro de la célula. Lo anterior confirma que *Brucella* encuentra su nicho intracelular dentro de compartimentos similares al RE y cercanos al mismo en la estructura celular. Esta posición podría facilitarle a la bacteria la obtención de nutrientes y péptidos necesaria para su adecuada replicación.

Es importante recalcar que mutantes en el sistema de dos componentes BvrR/BvrS y en el sistema de secreción tipo IV presentan deficiencias en su tránsito intracelular. Las mutantes bvrR y bvrS se internalizan de forma deficiente y cuando lo hacen son rápidamente enviadas a compartimentos positivos por catepsina-D en los cuales son destruidas. Estas mutantes nunca logran establecer una relación con los autofagosomas. Al contrario la cepa vacunal S19 sí es capaz de asociarse con los autofagosomas, sin embargo no puede controlar la maduración del mismo. En vez de dirigir la maduración hacia un compartimento similar al RE se une al lisosoma y también es destruida. Las mutantes en el sistema de secreción tipo IV VirB se internalizan de

la misma forma que la cepa silvestre 2308, sin embargo no son capaces de replicarse adecuadamente dentro de las células por lo que son eliminadas [Guzman-Verri et al., 2002].

2.3.3 Sistema de Dos Componentes BvrR/BvrS

B. abortus, al ser una bacteria expuesta tanto al ámbito intracelular como extracelular, requiere de mecanismos que puedan detectar variaciones en el ambiente y reaccionar ante estas activando o desactivando genes y regulando la expresión de proteínas. Dentro del grupo de las α -2 Proteobacterias se han descrito muchos géneros, como *Sinorhizobium* y *Agrobacterium*, que poseen sistemas de dos componentes similares a los de *Brucella*. Estos sistemas son grupos de genes que codifican por dos proteínas relacionadas. Una es una proteína de la membrana citoplasmática que se especializa en detectar cambios ambientales, siendo el sensor del sistema, mientras que la otra es una proteína citoplasmática que reacciona ante estos cambios generando señales que modulan la expresión genética bacteriana. Uno de estos sistemas, que presentaba alta homología con los de otras bacterias, fue descrito para *B. abortus* [Sola-Landa et al., 1998]. La proteína de membrana detecta cambios en el ambiente y mediante

su actividad de histidina quinasa se autofosforila. El grupo fosfato luego es pasado a la proteína reguladora en un residuo de aspartato desencadenando un proceso citoplasmático que activa factores de transcripción para genes específicos [Stock and Naor, 1995]. El sistema descrito para *B. abortus* se compone del regulador denominado BvrR y el sensor denominado BvrS. Este sistema de dos componentes es vital para la virulencia de *B. abortus* ya que mutantes en los genes que codifican por el sistema son atenuadas en estudios con ratones. La cepa silvestre 2308 es capaz de replicarse en el bazo de ratones infectados por hasta seis semanas. En comparación, mutantes en *bvrR* (cepa 65.21) y en *bvrS* (cepa 2.13) son eliminados aproximadamente 12 días post-infección. Estas cepas presentan tasas de invasión celular disminuidas, no pueden evitar la fusión con lisosomas, y son destruidas intracelularmente por lo que nunca pueden replicarse en células fagocíticas profesionales o no profesionales [Guzman-Verri et al., 2002; Sola-Landa et al., 1998]. Esto indica que el sistema de dos componentes está involucrado en determinar la invasión y el tránsito intracelular de la bacteria. Cuando las mutantes en este sistema entran en contacto con células no reclutan a GTPasas de la familia Rho necesarias para la polimerización de actina y la entrada a las células [Guzman-Verri et al., 2001]. Específicamente las mutantes nulas en BvrS/BvrR son incapaces de activar la

GTPasa Cdc42 necesaria para la internalización de la bacteria en células fagocíticas no profesionales. Sin un sistema de dos componentes funcional *B. abortus* no puede desviar su tránsito intracelular hacia el retículo endoplásmico sino que termina siendo destruida en un lisosoma. Además son más sensibles a sustancias policatiónicas antimicrobianas y a surfactantes por los cambios que sufre la composición de la membrana.

Las cepas mutantes *bvrS*- y *bvrR*- son deficientes en la expresión de ciertas Omps descritas para *B. abortus*. Se han utilizado anticuerpos monoclonales contra todas las Omps descritas para evidenciar su presencia en la membrana externa de las mutantes al compararlas con la cepa silvestre. Se detectó una deficiencia de la Omp25 (Grupo 3, Omp3a) en ambas mutantes mientras que una cepa con *BvrR* reconstituido recuperó la expresión de esta proteína. Además las cepas defectuosas no expresaron otra proteína denominada Omp3b cuya función en la virulencia de la bacteria todavía no se ha dilucidado completamente ya que mutantes en esta proteína no son avirulentas [Manterola et al., 2007]. De igual manera, la actividad promotora para los genes que codifican para estas proteínas es casi nula en los mutantes de *bvrR* - y de *bvrS* - [Guzman-Verri et al., 2002] por lo que la transcripción de estos se encuentra regulada por el sistema de dos componentes. Cepas mutantes en los genes que codifican por la

Omp3a son incapaces de disminuir la producción de TNF- α en los macrófagos que infectan por lo que esta proteína está directamente involucrada en la virulencia de la bacteria. Sin embargo es importante que mutantes para la Omp3a presentan un grado menor de atenuación que las mutantes nulas en BvrR, lo que indica que este sistema regula procesos moleculares más complejos que la simple ausencia de una proteína [Edmonds et al., 2001].

El sistema de dos componentes también se ha implicado con las características del LPS de *B. abortus*. Las cepas con mutaciones en *bvrS* y *bvrR* presentan diferencias importantes en cuanto a la composición molecular del lípido A. Mediante HTPLC se detectaron diferentes niveles de acilación de este componente del LPS indicando que el sistema BvrR/BvrS determina directa o indirectamente su estructura. Esto se comprobó ya que quimeras de la cepa silvestre con LPS de cepas *bvrR*- o *bvrS*- eran más sensibles a sustancias policatiónicas mientras que quimeras *bvrS* - o *bvrR* - con LPS de la cepa silvestre eran más resistentes a estas sustancias[Sola-Landa et al., 1998].

Se ha propuesto que los cambios en la membrana sufridos por las mutantes afectan el ensamblaje del sistema de secreción tipo IV, otro factor de virulencia importante en la patogénesis de la brucelosis.

2.3.4 Sistema de Secreción Tipo IV VirB

El éxito de la infección por bacterias patógenas intracelulares va a depender de su habilidad para sobrevivir y multiplicarse dentro de la célula hospedadora. Existen una gran variedad de mecanismos por los cuales los microorganismos logran una adaptación al ámbito intracelular, generando un nicho que se encuentre exento del daño inducido por los componentes del sistema inmune del organismo infectado. Muchas de las estrategias utilizadas por las bacterias son todavía desconocidas, sin embargo, algunas como los sistemas de secreción de bacterias Gram-negativas han sido estudiados detenidamente, en este caso en particular, estos dispositivos les permiten exportar moléculas al exterior, ya sea al medio o a una célula en particular [Celli et al., 2003; Christie, 2001].

En las bacterias Gram-positivas la maquinaria Sec es suficiente para dirigir moléculas al exterior, esto debido a que deben pasar únicamente por una bicapa lipídica. La membrana externa de las bacterias Gram-negativas complica la secreción de proteínas al ambiente extracelular[Fath and Kolter, 1993].

Se conocen al menos cinco mecanismos denominados del tipo I al V. El sistema tipo I usa un complejo de tres proteínas que atraviesan tanto la membrana interna como la externa para liberar

las sustancias directo al medio. El tipo II involucra un mecanismo de dos pasos en el cual las proteínas pasan primero al periplasma y posteriormente son expulsadas por una reacción compleja que requiere alrededor de una docena de proteínas. Los de tipo III permiten la inyección directa de proteínas del patógeno al citoplasma de la célula hospedadora, debido a esto son conocidos como sistemas dependientes de contacto. Los sistemas de tipo IV no están bien caracterizados hasta el día de hoy, se les relaciona con las vías utilizadas para la transferencia de ADN de una bacteria a otra, según estudios recientes se les considera como un sistema autopromovido, pues una vez que la proteína llega al espacio periplásmico, ésta promueve su paso a través de la membrana externa gracias a una señal que tiene en el extremo carboxilo terminal. Los de tipo V son también conocidos como autotransportadores, los cuales utilizan la vía normal para enviar productos a la parte externa [Christie, 2001; Harper and Silhavy, 2001; Nagai and Roy, 2003].

La gran mayoría de los microorganismos pertenecientes al subgrupo α -2 de las proteobacterias han coevolucionado con sus hospedadores eucariotas, tal es el caso de bacterias como *Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti* y los miembros del género *Brucella*. Para estos últimos, la sobrevivencia intracelular así como la replicación son factores de virulencia claves, esto

evidenciado porque las cepas mutantes defectuosas para estos atributos son consideradas avirulentas [Celli et al., 2003; Sieira et al., 2000].

Mediante estudios genéticos se ha determinado que *Brucella abortus* posee al igual que *B. suis* un sistema de secreción tipo IV, el cual es considerado un posible determinante de virulencia, codificado por el denominado operón VirB, el cual posee un arreglo lineal que consta de 13 marcos de lectura abiertos (ORFs: *open reading frames*) que tienen la misma orientación. La activación de la transcripción de estos genes se lleva a cabo durante el inicio de la fase estacionaria de la bacteria, según pruebas realizadas con fusiones transcripcionales de virB10: lacZ. Se observa relación con esta fase de crecimiento de la bacteria pues la transcripción es detectada cerca de las doce horas post-infección [Boschioli et al., 2002; Sieira et al., 2000].

Se ha establecido que la sobrevivencia intracelular de *Brucella* depende de la inhibición de la fusión entre la vacuola que contiene la bacteria y los lisosomas, esto mediante una alteración en la maduración de la vesícula. Se ha propuesto que el sistema VirB se encuentra involucrado en la alteración del control en la maduración de la organela que alberga y permite el establecimiento de la bacteria en el interior de las células, generando un fenotipo avirulento. Algunos experimentos que apoyan esta teoría

demuestran que mutantes polares en el gen *virB10* no pueden controlar adecuadamente la maduración del fagosoma que las contiene, lo cual sucede tanto en células fagocíticas profesionales y no profesionales con la consecuente fusión a los lisosomas y destrucción del microorganismo. Otras pruebas realizadas mediante el uso de bacterias silvestres (cepa 2308) y las mutantes polares y no polares del gen *virB10* en las cuales se asocia el asincronismo madurativo de los fagosomas con la presencia/ausencia de marcadores lisosomales como la catepsina D, LAMP-1, los cuales se observan únicamente en las bacterias alteradas genéticamente y que son destruidas por el fallo en la evasión de la vía endocítica [Comerci et al., 2001; Sieira et al., 2000].

Algunos autores describen que el fagosoma generado por las bacterias del género *Brucella* es acidificado rápidamente en un tiempo corto después de la entrada del patógeno, con lo cual se da un decrecimiento del pH hasta 4.0. Por lo tanto, en experimentos en los que se ha bloqueado la acidificación en la fase temprana de infección se logra inhibir la multiplicación intracelular. Si se realiza el mismo tratamiento en un tiempo tardío de la infección no se presenta ningún efecto. De esta forma, se sugiere que la acidificación de la vesícula es una señal que induce la expresión de algunos factores de virulencia importantes para la vida

intracelular, dentro de los cuales destaca el operón que codifica por el sistema de secreción IV VirB [Boschioli et al., 2002; Sieira et al., 2000]. Hasta el día de hoy no se ha identificado con exactitud ninguna molécula efectora del sistema de secreción tipo IV (virB) de *Brucella abortus*, incluso es importante la resolución de las etapas precisas en las cuales esta vía controla la maduración de las vacuolas que contienen la bacteria. Algunos autores consideran que existen al menos dos proteínas distintas secretadas por la maquinaria de este sistema, una actuando a nivel de la vía degradativa y evitando este fenómeno (evidenciado por los experimentos con mutantes polares de *virB10*), y la otra es necesaria para que el nicho de replicación intracelular sea correctamente establecido (justificado por los ensayos con la mutante no polar de *virB10*). Como se mencionó anteriormente los genes *virB* poseen una elevada similitud con los de sistemas para transferencia de plásmidos (ADN) de una bacteria a otra o entre una bacteria y células eucariotas, como en el caso de *Agrobacterium tumefaciens*, bacteria evolutivamente relacionada con *B. abortus*, por lo que es importante descartar la capacidad del sistema VirB de *Brucella* para realizar esta función. Futuros estudios son necesarios para entender correctamente esta y otras interrogantes sobre este dispositivo bacteriano [Christie, 2001; Harper and Silhavy, 2001; Sieira et al., 2000].

2.4 Justificación

La capacidad de bacterias del género *Brucella* para invadir células eucariotas, alcanzar el retículo endoplásmico y replicarse en esta organela ha sido ligada estrechamente con la patogénesis de la brucelosis. Esta capacidad ha sido asociada a varios factores de virulencia como el sistema de secreción IV VirB y el sistema de dos componentes BvrR/BvrS. Adicionalmente, la cadena O del lipopolisacárido ha sido asociada a la virulencia de *Brucella* pues mutantes rugosas carentes de esta molécula tienen una patogenicidad disminuida e interaccionan en forma atípica con células eucariotas, demostrando un comportamiento tóxico hacia las mismas y siendo incapaces de establecer una infección intracelular productiva. En este contexto es interesante preguntarse cuál es el comportamiento de brucelas naturalmente rugosas, como *B. canis* en cuanto a su habilidad para invadir y replicarse en células eucariotas. Este trabajo, por tanto, pretende responder esta interrogante que hasta la fecha no ha sido abordada de forma sistemática por la comunidad científica que estudia la patogénesis de brucelosis.

2.5 Objetivos

2.5.1 Objetivo general

“Determinar la capacidad de internalización y multiplicación de la cepa salvaje *Brucella canis* en células Hela y macrófagos de ratón”

2.5.2 Objetivos específicos

- Generar herramientas que faciliten el estudio del comportamiento biológico de *B. canis*
- Cuantificar los niveles de multiplicación de *B. canis* cepa salvaje, en células Hela y macrófagos de ratón
- Comparar los parámetros de interacción celular de *B. canis* cepa salvaje y los obtenidos con bacterias lisas y mutantes rugosas
- Estudiar el comportamiento de *B. canis* en modelos murinos
- Determinar la expresión por *B. canis* de factores de virulencia clásicos del género.

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

3.1 Tipo de estudio:

Para la realización del presente estudio se empleó un diseño experimental reduccionista *ex vivo*, utilizando cultivo celular.

3.2 Consideraciones éticas

Las cepas de campo de *Brucella canis* fueron aisladas de fetos abortados y cánidos infectados en albergues de la ciudad de Heredia de Costa Rica, en la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, sin exponer a los animales a ningún riesgo, siendo tratadas las perras y manejados los fetos por personal veterinario capacitado. Los ratones para experimentación fueron criados y manejados por personal calificado del bioterio de la Escuela de Medicina Veterinaria, y cuenta con todas las regulaciones pertinentes. Igualmente la propuesta oficial de investigación fue sometida al Comité de Ética de la Investigación de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas para su análisis y aprobación.

3.3 Consideraciones de bioseguridad

Los ensayos se realizaron en los laboratorios de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Costa Rica con todas las medidas de contención y bioseguridad tipo II (BSL II)(Ver Anexo 1).

3.4 Cepas bacterianas y células utilizadas en el estudio

Se utilizaron líneas celulares eucariotas de la colección de la American Type Culture Collection (ATCC): Células epiteliales HeLa (ATCC No.CCL-2) y Macrófagos de ratón Raw 264.7 (ATCC No.TIB-71) y J774A.1 (ATCC No. TIB-67).

Todas las cepas se crecieron por 18 horas en caldo tripticasa soya (CTS) (Difco) a 37°C en agitación (200 rpm).

Para cultivos celulares se utilizó una línea de células no fagocíticas, células epiteliales tumorales de carcinoma de cérvix humano HeLa (ATCC No. CCL-2). Se utilizó también una línea de fagocitos profesionales derivados de monocitos-macrófagos de ratón, Raw 264.7 (ATCC No. TIB-71) y la línea de monocitos-macrófagos de ratón J774A.1 (ATCC No. TIB-67). Las células se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Sigma), suplementado con 5% de suero fetal bovino y

suplementados con penicilina y estreptomina. Los cultivos se mantuvieron a 37°C y 5% CO₂. Para realizar las infecciones las células se sembraron en placas de 24 pozos (Costar) para alcanzar una densidad de 500.000 células por pozo al momento de realizarse la infección.

La cepa silvestre de *Brucella canis* fue aislada en el Laboratorio de bacteriología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Costa Rica, junto a ella se analizaron las cepas bacterianas descritas en el cuadro 2.

La cepa con la que se trabajó fue aislamiento 206-10, correspondiente a un hisopado vaginal de un cánido raza Pomeranian. Dicho aislamiento se obtuvo en cultivo puro y fue identificado como *B. canis* mediante diferentes pruebas bioquímicas.

De igual manera se realizó un ensayo de PCR multiplex: Bruce-ladder, para caracterizar la cepa que se utilizó, ésta es ampliamente utilizada para diferenciar especies dentro del género *Brucella*. Para esta técnica se extrajo el ADN bacteriano a partir de un cultivo puro, aplicando calor durante 10 minutos. Luego se centrifugó a 12000rpm por 30 segundos y se usó el sobrenadante con el ADN liberado. Se realizó la amplificación del ADN usando 8 diferentes pares de imprimadores y en condiciones estandarizadas

de desnaturalización, unión de primadores y extensión final, para luego analizar los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5 % [López-Goñi et al., 2008]

| Cepas | Características | Referencia |
|--|--|----------------------------------|
| <i>Brucella abortus</i> 2308 | Tipo silvestre, virulenta, LPS liso | Sangari y Agüero, 1991 |
| <i>Brucella abortus</i> <i>per A</i> | 2308 Nalr per: Tn5, LPS rugoso, deficiente en la producción de la cadena O y NH del LPS | Moreno y Pizarro- Cerdá, 2001 |
| <i>Brucella canis</i> | Cepa salvaje | * |

Cuadro 2: Caracterización de las cepas bacterianas utilizadas en el presente estudio. (*) La cepa de *B. canis* analizada corresponde al aislamiento 206-10 del laboratorio de bacteriología.

3.5 Curva de crecimiento de *Brucella canis*

Se estandarizó la curva de crecimiento de *B. canis* en caldo tripticasa de soya (CTS) (Difco) a 37°C en agitación (200 rpm). Las mediciones de densidad bacteriana se determinaron mediante espectrofotometría (420nm) a diferentes tiempos de la curva de crecimiento para determinar las fases inicial, logarítmica y estacionaria de la bacteria.

3.6 Generación de la cepa *Brucella canis*- GFP (Proteína Verde Fluorescente)

Para este experimento se purificó el plásmido PBBR-2GFP previamente propagado en *E. coli*. Este plásmido contiene el gen que codifica para la proteína verde fluorescente y un gen de resistencia a Kanamicina. Se comprobó la adecuada purificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se calculó a partir de dicha corrida la cantidad de plásmido a usar para electroporar (2µl).

Las bacterias electrocompetentes fueron preparadas a partir de un pre-cultivo puro de 24 horas de crecimiento de *B.canis* adicionando 2.5 ml del pre-cultivo en 247.5 ml de caldo tripticasa

de soya. Dicho cultivo se incubó por 18 horas a 37°C y 200rpm. Posterior a la incubación se calculó la densidad óptica del cultivo y se plateó en agar tripticasa de soya para confirmar crecimiento puro. Mediante procesos de centrifugación en frío se realizaron lavados de las células con agua estéril para finalmente resuspenderlas y alicuotarlas en glicerol 10% y guardar a -70 °C. La electroporación se realizó utilizando el equipo BTX ECM600 a una capacitancia de 50 MicroF, resistencia de 250 ohms y un voltaje de 2.5 kVolts, en cubetas de 2mm de separación. Se descongeló un tubo con bacterias electrocompetentes, se agregó 2µl del ADN del plásmido en la cubeta de electroporación se colocó en el equipo y se realizó la electroporación, luego se adicionó 960µl de SOC-B y finalmente se traspasó a un tubo falcon y se incubó a 37°C en agitación a 200rpm por 6horas. Transcurrido este tiempo se plateó en agar tripticasa de soya suplementado con 50µg/ml de kanamicina y se incubaron 6 días a 37°C en atmósfera parcial de CO₂. Las colonias que crecieron se amplificaron y se almacenaron a -70°C [Chacón-Díaz Carlos, 2011]

3.7 Generación de anticuerpos anti *B. canis*.

Se preparó el antígeno de *B.canis* 206-10 para la obtención de anticuerpos en ratones. A partir de un cultivo puro de 18-24 horas de crecimiento en caldo tripticasa de soya, se lavaron 4 veces las bacterias con PBS estéril por centrifugación (3 minutos/10000rpm) y se resuspendieron en 500µl de PBS estéril, se adicionó adyuvante completo de Freud y se inocularon 5 ratones *Swiss* hembras, intraperitonealmente con 0.2 ml de antígeno, semanalmente durante 4 semanas. Luego se sacrificaron los animales y se obtuvo suero conteniendo los anticuerpos.

3.8 Procesos de infección de células fagocíticas y no fagocíticas con *B. canis* en etapa logarítmica

Los inóculos se prepararon a partir de los cultivos de 18 horas de las cepas. En los mismos se determinó la concentración celular espectro-fotométricamente a 420 nm y se utilizó la siguiente fórmula: $(1 \times 10^9 \text{ bacterias/ml} \times \text{Volumen del medio}) / A_{420\text{nm}}$ para lograr un inóculo de 1000 bacterias/célula. El inóculo se preparó en el medio para células descrito anteriormente pero sin antibióticos. Las células se lavaron dos veces con PBS estéril y se aplicaron

500 µl del inóculo, seguido de una centrifugación a 1600 rpm por 5 minutos para favorecer el contacto de las bacterias con las células. Se incubó por 30 minutos a 37°C con 5% CO₂ y se lavó tres veces con PBS estéril, seguidamente se aplicaron 500 µl de medio para células con gentamicina (100 µg/ml) por 1 hora para eliminar las bacterias extracelulares. Luego de la hora de incubación se cambió el medio por medio para células suplementado con 5 µg/ml de gentamicina por el resto de tiempo que tardó el experimento.

Para evaluar el número de bacterias intracelulares se lisaron las células con 500 µl de tritón 0.1% estéril (Sigma) durante 10 minutos. Estos lisados fueron diluidos en PBS estéril y alícuotas de dicha dilución se depositaron en platos de agar tripticasa de soya (Oxoid). Las placas así inoculadas se incubaron a 37°C hasta 72 horas para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC).

3.9 Microscopía por Inmunofluorescencia

Las células infectadas tal y como se describió en el apartado anterior se incubaron a 37°C con 5%CO₂ por diferentes períodos de tiempo según el experimento. Tras la incubación se agregó a las células, previamente crecidas sobre cubreobjetos redondos de

13 mm, 500 µl de paraformaldehído 3.5% en PBS por 10 minutos para fijar. Seguidamente las células se incubaron 10 minutos con 500 µl de cloruro de amonio 50mM en PBS para bloquear posibles sitios de unión inespecífica de los anticuerpos. Luego se incubaron con 500 µl de tritón 0.1% (Sigma) en PBS durante 10 minutos para permeabilizar. Posteriormente se realizó una inmunofluorescencia indirecta, en la que las células se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente con anticuerpo policlonal anti *Brucella* producido en conejo o con los anticuerpos anti *B. canis* generados en el presente trabajo. Estos anticuerpos se diluyeron en PBS con 10% de suero de caballo. Luego se realizaron lavados con PBS y con tritón 0.1% en PBS. Posteriormente se realizó una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente con un segundo anticuerpo anti conejo marcado con Rojo Texas o anti ratón Rhodamina diluidos en PBS con 10% de suero de caballo. En los experimentos que requieren diferenciar bacterias extracelulares de intracelulares, se realizó una inmunofluorescencia directa previo a la fijación y permeabilización de las células, aplicando un anticuerpo policlonal contra el LPS de *Brucella* producido en vaca marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) diluido en PBS con 10% de suero de caballo, el cual se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se procedió con el protocolo descrito anteriormente para la fluorescencia.

Luego de realizar las fluorescencias, los cubreobjetos se montaron en mowiol sobre portaobjetos y se realizaron conteos utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus, BH-2). Los conteos se realizaron observando campos con un aumento de 1000X y contabilizando de forma manual el número de bacterias totales, el número de células infectadas y el número de células totales. A partir de estos datos se calcularon los porcentajes de células infectadas y el número de bacterias por célula. Adicionalmente se observó la presencia de replicación bacteriana en las células en los diferentes períodos de tiempo de incubación, esto viendo el aumento en el número de bacterias [Pizarro-Cerdá et al., 1998a].

3.10 Cuantificación de Factor de Necrosis Tumoral α en macrófagos Raw 264.7

Se obtuvieron sobrenadantes a 0, 2, 6, 24 y 48 horas post-infección de macrófagos con *B. canis*, *PerA* y *B. abortus*2308, a una multiplicidad de infección de 100 bacterias/ml, en fase logarítmica y utilizando lipopolisacárido de *E. Coli* como control positivo, así como, células sin infectar como control negativo. Para cuantificar la concentración de Factor de Necrosis Tumoral α , liberado como producto de la activación de macrófagos se usó la

técnica de ELISA indirecta MouseTNF α (*eBioscience*)[Barquero-Calvo et al., 2007].

3.11 Expresión de factores de virulencia en *B. canis*, usando la técnica de Western Blot.

Para evidenciar la expresión de la proteína VirB8 en *B. canis* se obtuvieron pellets de la bacteria a diferentes tiempos de la curva de crecimiento (2 a 48 horas) éstas fueron lisadas con 200 μ l de SDS2% en ebullición durante 20 minutos, para luego centrifugarlas durante 10 minutos a 14000rpm. Posteriormente se separó los sobrenadantes y se cuantificó las proteínas totales liberadas, con el kit BCA Protein Thermo Scientific®. Una vez cuantificadas se calculó la cantidad necesaria para trabajar con 20 μ g de proteínas.

Se realizó la corrida en geles de acrilamida durante 1 hora a 150 voltios. Luego se transfirieron los geles a una membrana PVDF, en agitación y en frío durante 1 hora, a 100 voltios. Posteriormente se bloquearon los sitios libres con PBS-Tween 0.1% y 5% leche descremada. Luego se incubó con los anticuerpos primarios (OMP19 y VirB8) durante 1 hora y luego de lavar 3 veces con PBS 0.1% Tween 20 se incubó con los respectivos conjugados (anti-

ratón-peroxidasa y anti-conejo-peroxidasa respectivamente). Posterior a esta incubación se lavó 3 veces con PBS0.1% tween 20 y se detectaron los complejos inmunes mediante la adición de sustrato para quimioluminiscencia. Las reacciones se detectaron mediante una cámara CCD en un detector de imágenes Chemidoc (BioRad) [Martinez- Núñez, 2010].

3.12 Ensayo de virulencia en modelos murinos

Se inocularon 60 ratones, de la cepa BALB/c con *B. canis* 206-10 por la ruta intraperitoneal utilizando un inóculo de 3×10^7 bacterias por ml. Los ratones se sacrificaron en grupos de 6 en los tiempos indicados y se obtuvo suero y se extrajeron los bazo. Estos órganos fueron pesados y posteriormente macerados en 1ml de PBS tween 0,05%. A partir de esta suspensión se realizaron diluciones en PBS, se platearon en agar tripticasa de soya y se incubaron a 37°C durante 3 días para cuantificar la recuperación bacteriana.

Con los sueros obtenidos se realizaron pruebas de ELISAS indirectos utilizando kits comerciales (eBiosciencie®) para cuantificar las citoquinas IL6, IL12/IL23 e IFN γ liberadas en respuesta a la infección por *B.canis*[Barquero-Calvo Elias, 2009].

3.13 Análisis estadístico

Una vez realizados los conteos respectivos, se analizaron los datos obtenidos, se discutieron los parámetros observados con las diferentes cepas de *Brucella*, a modo de comparación para establecer las diferencias observadas en la interacción celular entre bacterias lisas, mutantes rugosas y la cepa salvaje de *B. canis*, determinando la presencia o no de diferencias significativas mediante la prueba “*t de student*”, y se realizaron todos los ensayos en triplicados que nos permitieron tener promedios y desviaciones estándar confiables.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

4.1 Caracterización de la cepa de *B. canis* utilizada en los estudios mediante la técnica de PCR Bruce ladder

Con el fin de comprobar que la cepa utilizada en este trabajo en efecto correspondía a *B. canis* se procedió a implementar la técnica de caracterización molecular PCR Bruce Ladder. Dicha técnica se basa en la amplificación de fragmentos genéticos en los que difieren algunas especies del género *Brucella*, haciendo uso de 8 diferentes pares de imprimadores y análisis de los productos mediante un gel de agarosa al 1,5%. *B. canis* como ya se ha mencionado corresponde a una cepa rugosa natural lo cual se comprobó para la cepa utilizada con la prueba de aglutinación con el colorante acriflavina que tiene afinidad por compuestos del LPS diferentes al antígeno O. Adicionalmente a las pruebas bioquímicas específicas, la técnica de PCR múltiple Bruce ladder permitió ratificar la identidad de la cepa trabajada como *B. canis* debido a la ausencia de un amplicón de aproximadamente 794 pb que codifica por la enzima polisacárido deacilasa, presente en brucelas con LPS completo y ausente en las cepas rugosas(Figura 1).

Los 3 aislamientos de *B. canis* analizados presentaron la ausencia en ese producto de amplificación. Entre los diferentes aislamientos

de *B. canis* se encontraron algunas diferencias tal y como variaciones en la presencia de un amplicón de bajo peso (aproximadamente 152 pb) correspondiente a un regulador transcripcional de la familia CRP; lo que podría sugerir, como han descrito algunos autores que tanto *B. canis* como *B. suis*, poseen biovars y que algunos podrían ser patógenos de humanos[López-Goñi et al., 2008].

El patrón de bandas que se obtuvo con la cepa de trabajo *B. canis* 206-10 corresponde a los productos característicos de una especie rugosa. Igualmente los aislamientos control de *B. canis* (cepas 228, 234), con la salvedad que el aislamiento 234 carece del producto de amplificación de 152 pb, que se mencionó anteriormente. Por otro lado, los productos amplificados en las cepas control de *B. abortus* virulenta y las vacunales S19 y RB51 hacen posible su completa diferenciación.

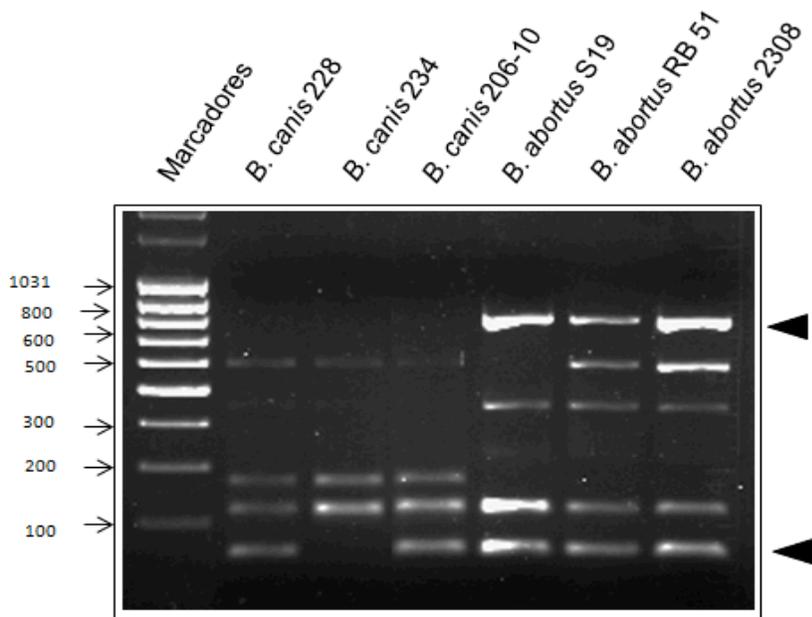


Figura 1: Verificación de la cepa de *B. canis* mediante la técnica de Bruce-ladder. Se preparó ADN genómico de las cepas indicadas incluyendo la cepa *B. canis* 206-10 que se utilizó en el presente proyecto. Los ADNs se sometieron a una reacción de amplificación utilizando el protocolo multiplex Bruce ladder. Los productos amplificados fueron separados en un gel de agarosa del 1,5% y visualizados mediante tinción con bromuro de etidio. La cabeza de flecha superior indica el producto de 794 pares de bases que se encuentra característicamente ausente en las cepas de *B. canis* y la cabeza de flecha inferior, señala una probable diferencia entre las cepas de *B. canis* analizadas, en un producto de amplificación de aproximadamente 152 pares de bases.

4.2 Generación de la cepa *B. canis* fluorescente

Con el fin de poder monitorear la vida intracelular de *B. canis* mediante microscopia de fluorescencia se decidió construir una cepa de esta bacteria constitutivamente fluorescente mediante la introducción del gen codificante de la proteína verde fluorescente [Chacón-Díaz, 2011a]. Para tal fin se procedió a purificar el plásmido PBBR2-GFP a partir de un cultivo de *E. coli* conteniendo al mismo. El plásmido purificado se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio en un gel de agarosa y se calculó mediante densidad óptica a 260 y 280nm, la concentración indicada (Figura 2A). Posteriormente se procedió a introducir el plásmido en la cepa *B. canis* 206-10 mediante electroporación. Las cepas que incorporaron exitosamente el plásmido se aislaron en agar tripticasa de soya suplementado con 50µg/ml de kanamicina. Una suspensión de las colonias resistentes a kanamicina en solución salina se observó mediante microscopía de fluorescencia (Olympus, BH-2) y se pudo determinar la presencia de bacterias de color verde fluorescente. (Figura 2B). Se realizó una determinación del porcentaje de bacterias fluorescentes mediante el conteo de los mismos campos en contraste de fases y microscopía de fluorescencia y se determinó que el 100% de las bacterias presentan una fluorescencia positiva. Se realizaron también

estudios de estabilidad del plásmido mediante pasajes sucesivos en ATS sin antibióticos y se determinó que el 100% de las colonias permanecen fluorescentes hasta después de 10 pasajes.

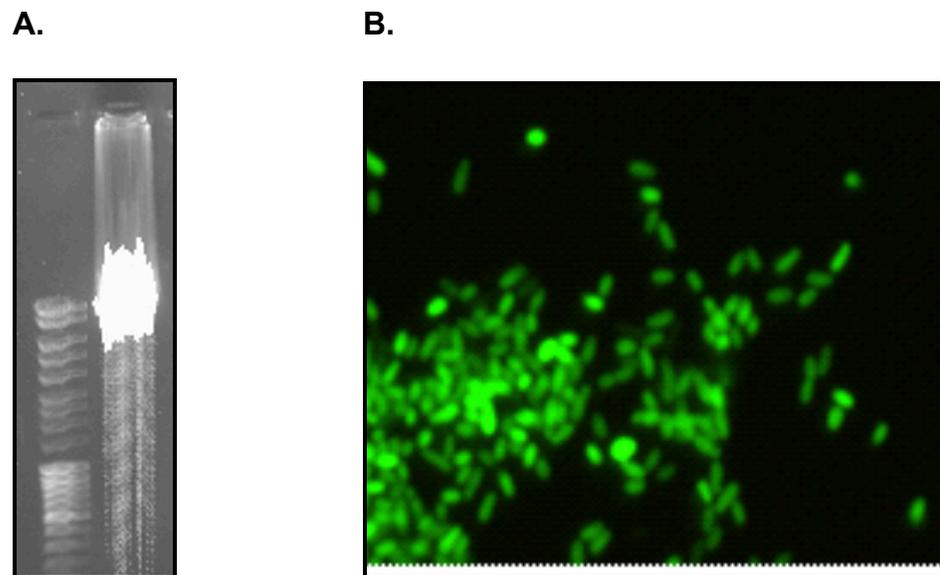
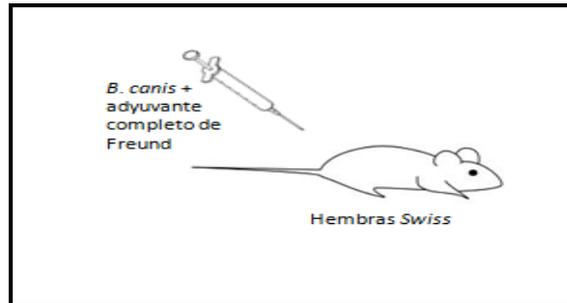


Figura 2: Generación de la cepa *B. canis* GFP. (A) El plásmido PBBR2-GFP se amplificó en *E. coli* y se purificó mediante columna. El producto purificado se muestra en la foto. (B) El plásmido fue introducido en la cepa *B. canis* 206-10 mediante electroporación y las cepas exitosamente transformadas fueron seleccionadas en medios suplementados con kanamicina 50ug/ml. Estas bacterias fueron fotografiadas utilizando microscopía de fluorescencia.

4.3 Generación de anticuerpos anti *Brucella canis* en ratones

Con el fin de contar con herramientas adicionales para la detección intracelular de *B. canis* mediante microscopía de fluorescencia se procedió a producir anticuerpos contra esta bacteria en ratones. Con este fin se inocularon intraperitonealmente 5 ratones hembras *Swiss con* 0,2ml de la suspensión bacteriana diluida con PBS estéril más adyuvante completo de Freud (Figura 3A). Luego de 4 inoculaciones se sacrificaron los ratones por dislocación cervical y se obtuvo sangre total. El suero conteniendo los anticuerpos contra *B. canis* fue almacenado en alícuotas conteniendo 50% glicerol. Con el fin de comprobar la eficacia de los anticuerpos se realizó una inmunofluorescencia indirecta con la bacteria, utilizando un segundo anticuerpo anti-ratón marcado con rodamina. Mediante esta inmunofluorescencia se pudo comprobar que los anticuerpos generados lograron teñir adecuadamente una suspensión de *B. canis*. (Figura 3B). Dicha tinción presentó el aspecto clásico descrito para inmunofluorescencias de *Brucella* mostrando bacilos cortos cuya tinción a nivel de membrana principalmente permite observar la morfología microscópica de “dona” con una intensidad muy fuerte en la periferia y un espacio obscuro en el centro de la bacteria. Se comprobó que estos anticuerpos teñían específicamente a *B. canis* pues no dieron reacción cruzada con otras bacterias probadas.

A.



B.

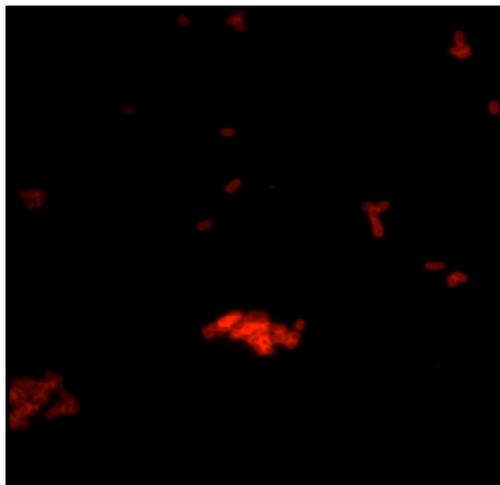


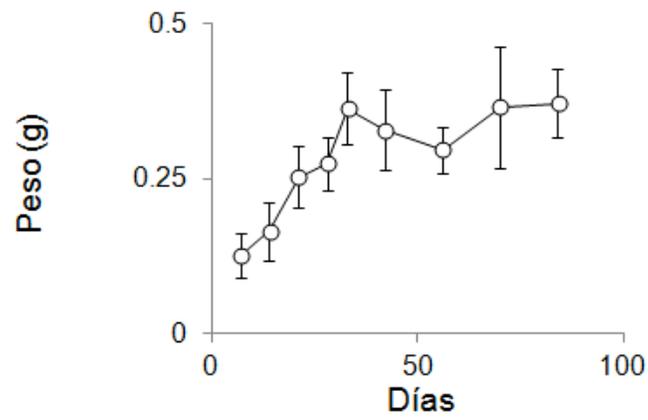
Figura 3: Generación de anticuerpos anti *B. canis*. (A) Esquema de inoculación de ratones hembras *Swiss* para la purificación de anticuerpos anti- *B.canis*. (B) *B. canis* se fijó a portaobjetos de vidrio y se tiñó utilizando los anticuerpos generados en ratón y visualizados mediante la utilización de un conjugado anti-ratón rhodamina. Las preparaciones fueron fotografiadas bajo microscopía de fluorescencia.

4.4 Ensayos de virulencia con *B.canis* en modelos murinos

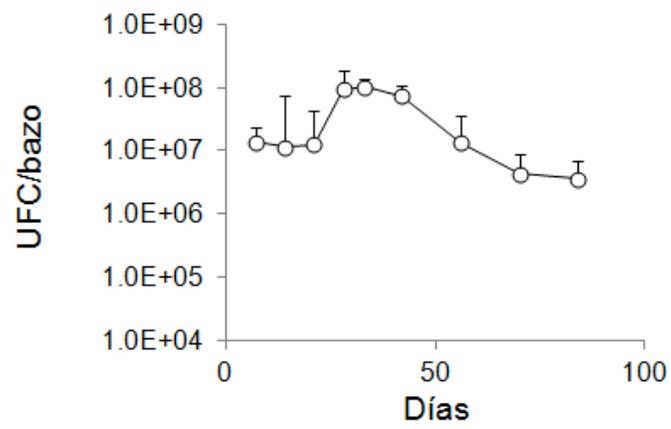
Con el fin de estudiar el comportamiento *in vivo* de *B. canis* se procedió a inocular intraperitonealmente murinos de la cepa Balb/C, con un inóculo 3×10^7 bacterias/ml. Se utilizó un inóculo más elevado al generalmente utilizado para brucelas lisas pues reportes previos indican que las cepas rugosas tienden a ser más atenuadas *in vivo* que las cepas lisas más comúnmente estudiadas. Los ratones fueron sacrificados a los tiempos indicados y se determinó el peso de los bazo y además se calcularon las UFC en los mismos. Adicionalmente se recuperaron muestras de sangre de los ratones con el fin de determinar la inducción de citoquinas en respuesta a la infección bacteriana. El experimento se extendió durante 10 semanas durante las cuales se pudo observar un aumento gradual en el tamaño de los bazo murinos, indicativos de inflamación por la infección con *B. canis*. Dicho aumento fue constante, hasta la quinta semana. En este momento el aumento en el peso del bazo fue de más del 300%, indicativo de una replicación activa de la bacteria. Luego de este punto comienza a revertirse este fenómeno de forma lenta y hasta el día 70 cuando acaba el experimento, los bazo continúan con un peso estimado del doble que al inicio del mismo. Este proceso de inflamación crónica ha sido previamente descrito junto con la cronicidad de las infecciones con brucelas patógenas en ratones.

Con el fin de cuantificar las UFC, los bazo fueron macerados en PBS estéril, plateado en agar tripticasa de soya a diferentes diluciones para contabilizar las UFC recuperadas tanto por bazo, como por gramo de bazo. Al momento de la primera cuantificación ya es posible detectar 1×10^7 bacterias por bazo, indicando que la bacteria no fue eliminada del sistema por la inmunidad del ratón y logró establecerse en este órgano como usualmente lo hacen las brucelas patógenas. La recuperación de UFC por gramo de bazo aumentó en forma paralela al aumento en la inflamación del órgano alcanzando un pico máximo a los 35 días post infección. Es importante notar que la densidad en dicho punto aumentó aproximadamente un logaritmo. Posterior a esto y también paralelamente a la curva de inflamación del bazo, comenzó un decline gradual en la recuperación de UFC recuperándose a los 70 días aproximadamente el 50% de las bacterias recuperadas al inicio del experimento (Figuras 4).

A.



B.



C.

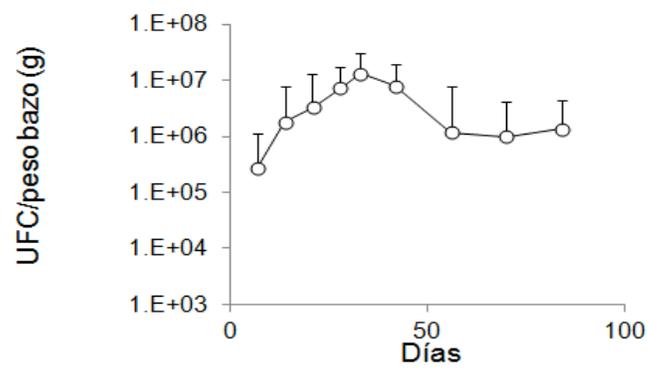


Figura 4: Multiplicación de *B. canis* en ratones. Ratones Balb/C fueron inoculados con *B. canis* intraperitonealmente. A los tiempos indicados grupos de 6 animales fueron sacrificados y el peso de los bazos **(A)**, número de UFC/bazo **(B)** y UFC/gramo de bazo**(C)** fueron determinados.

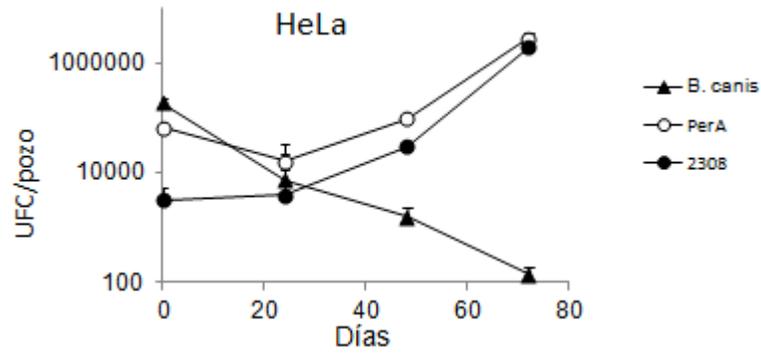
4.5 Ensayos de virulencia en líneas celulares epiteliales humanas y macrófagos murinos

Con el fin de determinar si *B. canis* es en realidad un patógeno intracelular se procedió a realizar ensayos de replicación en diversas líneas celulares eucariotas mediante el ensayo de la gentamicina y utilizando como control la infección con la cepa virulenta *B. abortus* 2308 y la cepa rugosa *B. abortus perA*-.

Se comenzó infectando células epiteliales fagocíticas no profesionales utilizando la línea celular HeLa, en presencia de la toxina CNF de *E. coli*. En este caso se utilizó una MOI de 1000 bacterias/célula. La infección con *B. canis* en células HeLa demuestra que a tiempos tempranos la bacteria ingresa en

números abundantes a las células pues se presenta una alta recuperación a las 0 horas post infección. Conforme transcurre el período de incubación se manifiesta que no existe replicación activa de la bacteria en esta línea celular que se pueda detectar mediante el ensayo de protección a la gentamicina. Las UFC recuperadas se reducen en el tiempo hasta prácticamente su desaparición a las 72 horas. Este patrón es contrario a lo ocurrido con *B. abortus* 2308y la mutante rugosa *B. abortus perA-* que tienden a incrementar la multiplicación bacteriana, con un leve descenso en tiempos intermedios para finalmente elevar el número de UFC indicando replicación intracelular. Cuando se evalúa la replicación en una línea fagocítica, macrófagos murinos J774A.1 se observa un panorama similar (Figura 5 A y B).

A.



B.

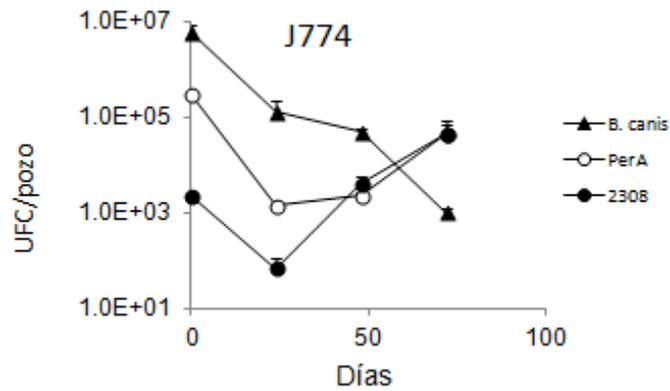
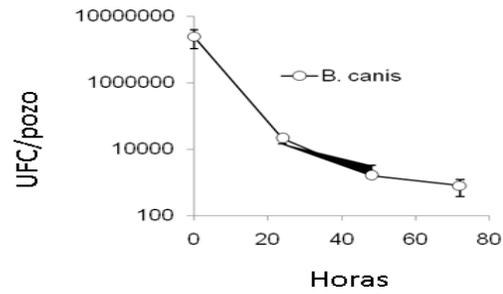


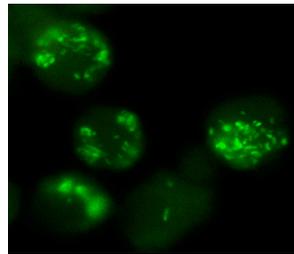
Figura 5: Supervivencia de *B. canis* en células. Células epiteliales (A) o macrófagos murinos (B) fueron inoculados con *B. canis*, *B. abortus* o *B. abortus Per-*. A los tiempos indicados las células fueron lisadas y la cantidad de UFC intracelulares fueron determinadas mediante plateos en ATS.

Con el fin de monitorear la infección intracelular por una estrategia independiente al plateo y conteo de UFCs, se procedió a realizar inmunofluorescencias utilizando la cepa de *B. canis* GFP y los anticuerpos que se produjeron en ratón. Mediante esta estrategia es posible visualizar directamente las bacterias. En la línea de macrófagos murinos Raw264.7 se pudo observar que al tiempo 0 horas post infección, las células están completamente repletas de bacterias. Adicionalmente, un alto porcentaje de las células tienen bacterias asociadas. Estas bacterias presentan una fluorescencia positiva por GFP y por el anticuerpo de ratón anti *B.canis*. Conforme transcurre el experimento, a las 24 horas, el porcentaje de células con más de 10 bacterias por célula disminuye, indicativo de destrucción bacteriana. Es importante notar que a estos tiempos, el anticuerpo anti *Brucella* ya no es capaz de reconocer a las bacterias y las mismas se detectan únicamente por la presencia de la fluorescencia de la proteína GFP o la tinción con DAPI. Interesantemente, a las 48 y 72 horas se evidencia una activa replicación de la bacteria pues se encuentra un gran porcentaje de células con varias decenas de bacterias positivas por GFP lo cual indica que a pesar de que no se recuperan UFCs, las bacterias parecen estar replicándose activamente. Cabe mencionar que estas bacterias tampoco reaccionan con el anticuerpo anti *B. canis* de ratón (Figura 6).

A.



B.



C.

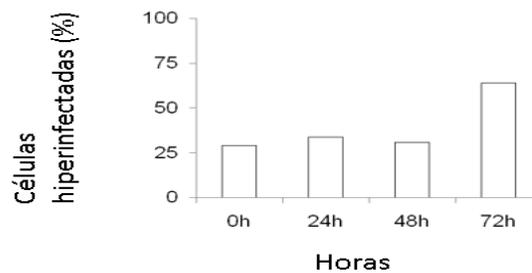


Figura 6: Infección de macrófagos Raw 264.7 con *B. canis*. (A) Macrófagos murinos fueron infectados con *B. canis* y contabilizadas las UFCs recuperadas por plateos en ATS. (B) Células hiperinfectadas con *B. canis*-GFP fueron fotografiadas y contabilizadas mediante microscopia por fluorescencia, en tiempos tardíos post-infección (C).

4.6 Activación de células fagocíticas por parte de *B. canis*.

En estudios previos se ha demostrado que cepas lisas de *Brucella* como *B. abortus* no inducen activación de células inmunes [Barquero-Calvo Elías, 2007] Por esta razón se quiso explorar el potencial activador de una cepa naturalmente rugosa como *B. canis*. Para cuantificar la respuesta inflamatoria inducida por *B. canis*, se analizaron los sobrenadantes obtenidos a las 0, 2, 6, 24 y 48 horas post infección de macrófagos Raw 264.7, con el fin de cuantificar mediante la técnica de ELISA el TNF- α . Se utilizaron la cepa *B. abortus*2308, la cepa rugosa *B. abortus PerA*- y LPS de *E. coli* como control positivo de activación. Se observó como *B. canis* estimuló en mayor grado la liberación de TNF- α por parte de estas células que la bacteria lisa *B. abortus*2308. El grado de estimulación producido por *B. canis* fue similar al inducido por la mutante rugosa *B. abortus PerA*-(Figura 7).

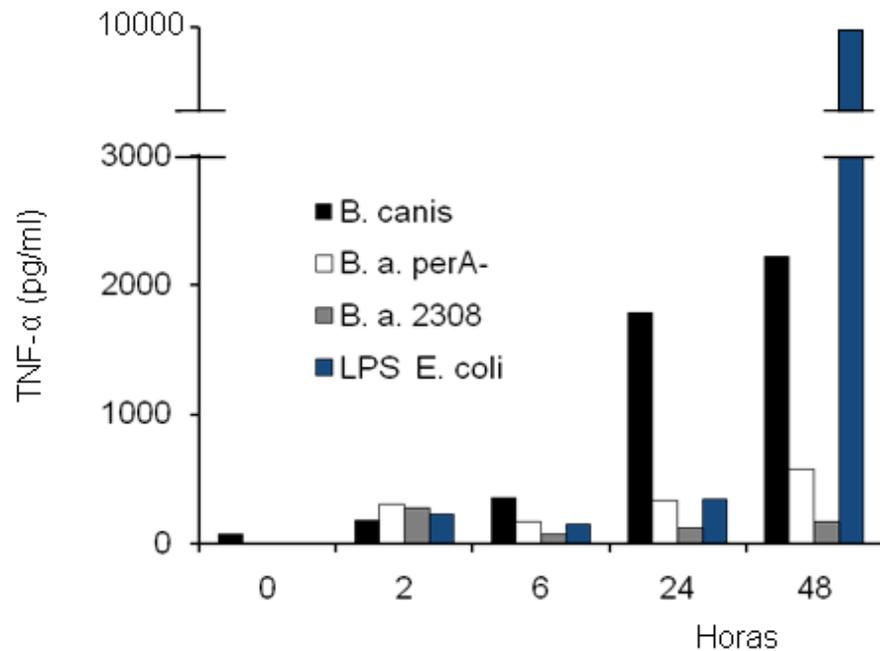
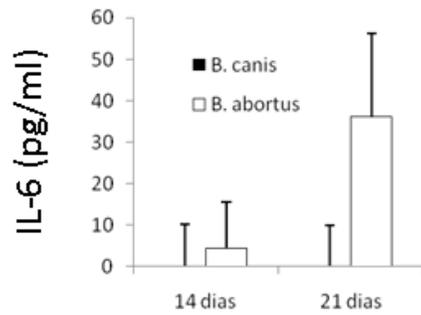


Figura 7: Inducción de TNF- α en macrófagos. Macrófagos murinos fueron infectados con *B. abortus* o *B. canis*. A los tiempos indicados se tomó sobrenadante y la cantidad de TNF- α liberada fue cuantificada por medio de ELISA.

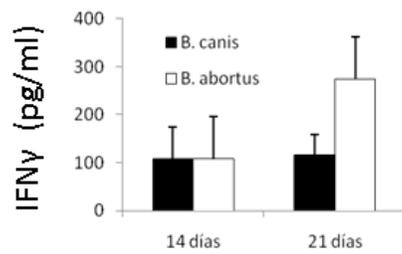
Bajo ese mismo precepto, se determinó mediante ELISA indirecto (eBiosciencie®) la cantidad de citoquinas IL6, IL12 e IFN γ liberadas en los sueros de murinos infectados con *B. canis*, como se describió previamente, y usando *B. abortus* como control de activación. De este modo se estableció que la infección con *B. canis* en estos modelos para el caso de la citoquina proinflamatoria

IL6 es casi nula a los 14 y 21 días post infección, mientras para el IFN γ y e IL12 la respuesta de *B. canis* es menor que la observada en *B. abortus* a los mismos tiempos (Figura 8).

A.



B.



C.

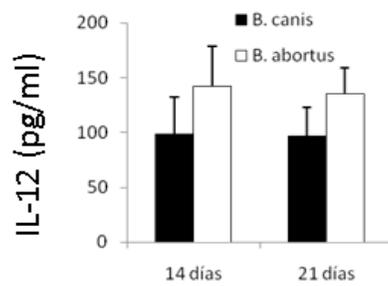


Figura 8: Inducción de citoquinas en ratones. Grupos de 10 ratones fueron inoculados con 2×10^5 UFC/ml de *B. abortus* o 3×10^7 de *B. canis*. A los tiempos indicados, los ratones se sangraron y las citoquinas fueron cuantificadas por medio de ELISA indirecto.

4.7 Expresión del sistema de secreción IV VirB en *B. canis*

Uno de los principales determinantes de la vida intracelular de *Brucella* es el sistema de secreción IV VirB el cual se ha visto que está muy regulado y se expresa en tiempos muy definidos de la curva de crecimiento de *B. abortus* [Martínez-Nuñez et al, 2010]. Con el fin de estudiar el comportamiento de este sistema en *B. canis*, se comparó la expresión de VirB8 tanto en *B. canis* como en *B. abortus* 2308 mediante la técnica de Western Blot, usando la proteína de membrana OMP 19 como control de expresión. Estudios previos han demostrado la expresión de dicha proteína en tiempos delimitados de la curva de *B. abortus* (18hrs), resultado que pudimos reproducir en nuestros experimentos. En contraste con esto, para *B. canis* sobresale el hecho de observar la proteína VirB8 expresada desde las primeras horas de la curva y manteniéndose así a lo largo de la misma, lo que deja claro que esta cepa rugosa mantiene en estado activo su sistema de

secreción durante todas sus fases de crecimiento extracelular, lo que puede jugar un papel importante en su virulencia (Figura 8).

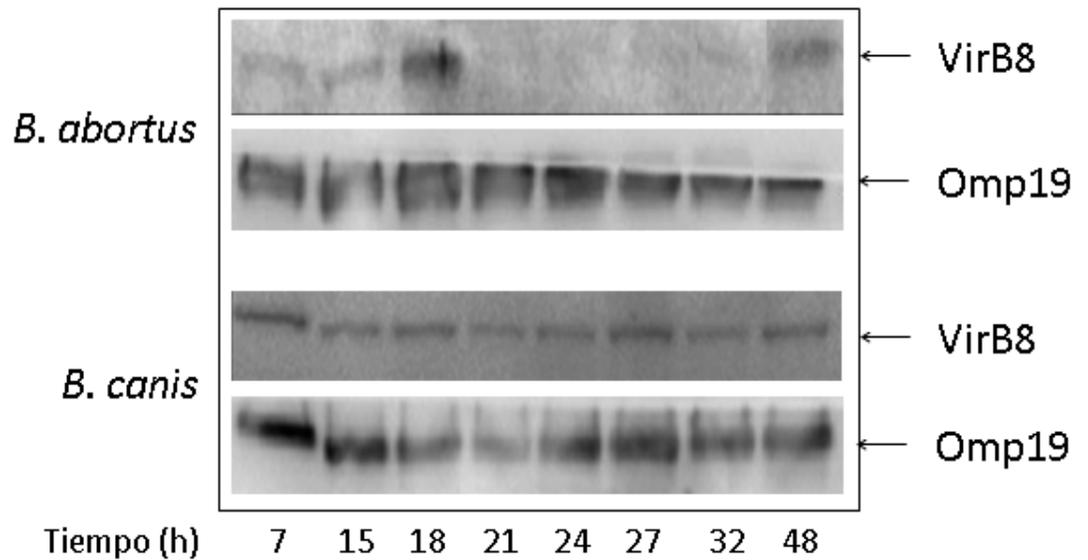


Figura 9: Expresión del T4SS VirB en *B. canis*. *B. abortus* y *B. canis* fueron crecidas en CTS y a los tiempos indicados se tomaron alícuotas para preparar lisados totales. 20 ug de cada lisado fueron separados en 12,5% SDS-PAGE, transferidos a PVDF y revelados con los anticuerpos indicados.

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

Las distintas especies del género *Brucella* poseen actividades bioquímicas y metabólicas que permiten en cierto grado su diferenciación en el laboratorio. Para ello se emplean técnicas de susceptibilidad y reacción a colorantes y fagos, producción de HS₂, y varias pruebas bioquímicas. Estos ensayos junto al aislamiento de la bacteria y procedencia clínica de la misma (huésped y entorno clínico) aunado a la presencia de anticuerpos brindan elementos que la mayoría de las veces son suficientes para el diagnóstico asertivo de brucelosis. Sin embargo existe la posibilidad de emplear técnicas más específicas como las moleculares con el fin de tener una mayor certeza de la especie con la que se está trabajando. Debido a que en el presente trabajo se pretendía estudiar el comportamiento biológico de *B. canis* y su habilidad de multiplicarse intracelularmente consideramos prudente utilizar una de estas técnicas moleculares con el fin tener certeza absoluta de que estamos trabajando con una bacteria de dicha especie. Una técnica ampliamente utilizada en años recientes con los propósitos apuntados anteriormente es la técnica Bruce ladder, un ensayo multiplex que permite la amplificación simultánea de varias regiones genómicas de *Brucella*, siendo de principal interés aquellas que diferencian dos especies extremadamente cercanas y

que a menudo causan confusión en las pruebas de identificación. En nuestra experiencia el Bruce ladder nos confirma una vez más la especie de nuestra cepa de estudio, pues como se mencionó anteriormente está da reacción positiva con el amplicón de 794pb aproximadamente que corresponde a una proteína presente únicamente en las especies lisas como es el caso de *B. suis*, *B. abortus* y *B. melitensis*. Nuestra cepa de estudio además ha sido y está siendo actualmente objeto de estudio para otros compañeros investigadores que han demostrado su especie con estudios de repeticiones genómicas y una extensiva caracterización bioquímica.

Una herramienta extremadamente útil para este estudio, resultó la generación de una cepa de *B. canis*, capaz de emitir fluorescencia por sí misma, pues a pesar de que los anticuerpos con los que se trabajó (anti-*B. abortus* producido en vaca, anti-*B. abortus* producido en conejo y anti-*B.canis* producidos en ratón) demostraron ser capaces de teñir bacterias extracelulares mediante una reacción de inmunofluorescencia aceptable, en muchos casos fue mucho más fácil y eficaz contabilizar las bacterias verdes intracelulares, y contrastarlas observando las células teñidas con Dapi (que solo tiñe el núcleo de las células). Adicionalmente, tanto en este proyecto como en observaciones

previas realizadas por nuestro grupo de trabajo, se ha visto que conforme avanza la replicación intracelular, por alguna razón desconocida las bacterias pierden la reactividad contra los anticuerpos que las tiñen adecuadamente cuando se encuentran intracelulares por lo que la utilización de bacterias que expresan GFP es la única posibilidad de monitorear la presencia de bacterias intracelulares. La modalidad de recurrir a bacterias que expresan GFP está siendo muy utilizada. Por ejemplo, recientemente se probó en modelos murinos la cepa vacunal S19 con GFP incorporada, utilizada como marcador de vacunación. Esto debido a las dificultades que presentan las vacunas convencionales que despierta una respuesta serológica idéntica a las cepas silvestres que inducen una infección activa. De esta forma, si un animal da una reacción positiva por anticuerpos anti- *Brucella* podría emplearse un ensayo inmunoenzimático que detecte anticuerpos anti-GFP y descartar así una brucelosis activa y en su lugar asignar dicha respuesta a una reacción inmunológica contra la vacuna. [Chacón-Díaz, 2011b].

Por otro lado, los murinos son los modelos animales más aceptados para la investigación experimental de infecciones *in vivo* producidas por bacterias del género *Brucella*. Los resultados obtenidos en este tipo de modelo pueden incluso extrapolarse a otros organismos como el ser humano. Por esta razón se decidió

analizar la habilidad de *B. canis* para multiplicarse en ratones de la cepa Balb/C.

Los experimentos realizados demostraron que *B. canis* es capaz de provocar una significativa esplenomegalia que alcanza el punto máximo alrededor de los 35 días del experimento. En este momento, el peso promedio del bazo es 3 veces más que al principio del experimento. Se ha reportado en diversos estudios que la inflamación del bazo correlaciona con la adecuada replicación *in vivo* de *Brucella*. Por ejemplo, en *B. abortus* el bazo alcanza 3 veces el tamaño normal del mismo a los 35 días de infección, mientras que cepas vacunales atenuadas o mutantes avirulentas producen una inflamación del bazo disminuida o totalmente ausente [Ficht, 2006; Jiménez de Bagués María P. , 2010; Teane M. A. Silva, 2011a]

Por lo tanto la reacción observada en los bazos de los ratones infectados con *B. canis* es muy sugestiva de una infección activa por parte de esta bacteria. Al finalizar el experimento, a los 70 días, los bazos son aún 1,5 veces más pesados que un bazo murino normal al día 0 del experimento. En curvas de bacterias atenuadas o avirulentas en este tiempo ya no se presenta inflamación en este órgano. Los datos de la inflamación del bazo, sugestivos de una infección activa por parte de *B. canis* son corroborados por el recuento de las UFCs aisladas. Ya que se observó una

recuperación de bacterias muy significativa hasta incluso los 70 días post infección que fue el último tiempo del experimento. Este tiempo no es muy distante de lo previamente reportado para *B. abortus* en este mismo modelo [Teane M. A. Silva, 2011b] bajo la salvedad de que en esta curva de *B. canis* se utilizó un inóculo mayor que el que se utiliza rutinariamente con *B. abortus*. A pesar de esto, es evidente que existe una replicación activa de la bacteria pues la recuperación de la misma en el bazo aumenta un logaritmo del día 21 al día 35 post infección. Todos estos resultados en conjunto demuestran que *B. canis*, a pesar de ser una cepa rugosa natural y considerada de menor virulencia que sus contrapartes lisas, tiene una habilidad indiscutible para multiplicarse *in vivo* ya que su efecto en este modelo animal es muy claro e importante. Algo similar podría ocurrir en la infección de sus hospederos naturales, en los que una pequeña porción de bacterias podrían alcanzar nichos intracelulares y mantenerse en forma latente en el animal hasta desencadenar la brucelosis como tal.

Al mismo tiempo se obtuvo suero de murinos infectados con *B. canis* a los 14 y 21 días post infección, para evaluar los niveles de citoquinas liberados, IL6, IL12 e interferon y fueron cuantificados, y se utilizaron sueros infectados con *B. abortus* 2308 como control comparativo. En dichas mediciones se observó que *B. canis* no induce la liberación de IL6 como respuesta proinflamatoria,

contrario a la cantidad de esta citoquina liberada frente a la infección con *B. abortus*, mientras que la IL 12 y el INF γ se liberaron en cantidades similares en ambas cepas, lo que llama la atención al tratarse de una bacteria rugosa, considerada menos virulenta, estudios más detallados sobre este hecho son necesarios. De cualquier modo se sugiere que la liberación de estas citoquinas frente a la infección con *B. abortus*, no desencadena una respuesta inmune lo suficientemente eficiente para detener la proliferación intracelular de *Brucella*[Barquero-Calvo Elías, 2007].

En el estudio de la patogénesis bacteriana de parásitos intracelulares se han empleado diferentes líneas celulares para realizar experimentos que expliquen la interacción bacteria-célula. Uno de los objetivos principales de este estudio fue entonces dilucidar si *B. canis*, al igual que los demás miembros de género *Brucella*, es una bacteria intracelular que se logra multiplicar activamente. Con tal fin se procedió a probar la habilidad de esta bacteria para ingresar y multiplicarse en diferentes líneas celulares utilizadas como modelo. Inicialmente se probó con células epiteliales de riñón de perro MDCK (ATCC NoCCL-34) pues se consideró que serían más susceptibles a la infección por *B. canis*, por ser provenientes su huésped natural. Sin embargo, este no fue el caso, pues las bacterias ni siquiera lograron establecer una

adhesión inicial en esta línea.

Por tal razón se probaron otras líneas celulares, los macrófagos murinos Raw 264.7 y J774A.1 como modelo de células fagocíticas profesionales y las células humanas epiteliales HeLa como modelo de células fagocíticas no profesionales. La idea de utilizar representantes de estos tipos de células era estudiar el comportamiento de *B. canis* en células que están acostumbradas a ingerir y degradar bacterias y en células que usualmente no llevan a cabo esta labor. Como control se utilizó la cepa lisa de *B. abortus* 2308 y la rugosa *B. abortus*PerA-. En las tres líneas probadas, fue evidente que ambas cepas controles ingresaron a la célula, luego un porcentaje fue eliminado en tiempos tempranos de la infección pues disminuyó la cantidad de UFCs recuperadas y más adelante entraron en una fase de franca replicación. Las bacterias de *B. canis* sin embargo, presentaron un comportamiento diferente. En tiempos tempranos de la infección fue posible recuperar una gran cantidad de UFCs indicativos de una masiva entrada en las células utilizadas como modelos. En contraste, más adelante en la infección comenzó una declinación gradual en la cantidad de UFCs recuperadas, tendencia que se mantuvo descendente hasta el final de los experimentos. Si la conclusión se basara únicamente en este tipo de ensayo, deberíamos concluir que *B. canis*, a diferencia de otras brucelas, no es un patógeno intracelular pues no tiene

capacidad de multiplicarse en ese tipo de células. A pesar de esto, también decidimos monitorear la infección mediante inmunofluorescencia haciendo uso de la cepa *B. canis*-GFP y de los anticuerpos anti-*B.canis* producidos en ratón. El panorama utilizando estas dos herramientas fue diferente al descrito por las curvas basadas en recuperación de UFCs. Si bien al principio existió concordancia pues fue evidente la infección masiva inducida por *B. canis* en todos los tipos celulares, y conforme avanzaba la curva se observó una disminución en el porcentaje de células infectadas al final del experimento fue notorio el aumento en dicho porcentaje así como en la fluorescencia emitida por la GFP. Esta última es un indicativo de viabilidad bacteriana pues la síntesis continúa de esta proteína depende de que los mecanismos metabólicos de la bacteria se encuentren activos. Este escenario fue particularmente evidente a las 72 horas de infección, tiempo al cual, la recuperación de UFCs fue mínima y en algunos casos nula. Ante la incongruencia entre ambos métodos, recuperación casi nula a las 72 horas pero una replicación activa evidenciada por la inmunofluorescencia es que postulamos la hipótesis de que *B. canis* al ingresar y multiplicarse intracelularmente alcanza un estado no cultivable que impide que sea recuperada en medios de cultivo convencionales como el agar tripticasa de soya o agar sangre.

Todos los resultados juntos nos indican y comprueban nuestra hipótesis de que *B. canis* es capaz de alcanzar nichos intracelulares y de replicarse con un patrón activo observado a las 48 y 72 horas post infección.

Las bacterias lisas del género *Brucella* se caracterizan por pasar inadvertidas para el sistema inmune durante las etapas tempranas de la infección [Barquero-Calvo Elías, 2007] debido a que tienen un LPS que no es reconocido fácilmente por los TLR4. Sin embargo este tipo de evasión no se ha estudiado en bacterias naturalmente rugosas por lo cual decidimos evaluar el grado de activación de macrófagos inducido por *B. canis*.

Es interesante observar como *B. canis* promovió una mayor activación de los macrófagos Raw 264.7, determinado como una mayor liberación de TNF- α , en comparación a la contraparte lisa *B. abortus*. En primera instancia se podría especular que esta diferencia en la activación de macrófagos se debe a la naturaleza rugosa del LPS de *B. canis* por lo que se podría postular que la presencia de cadena O, que confiere el fenotipo liso, sería parcialmente responsable de impedir un buen contacto entre el LPS y el TLR4. Sin embargo, el análisis de la cantidad de bacteria por célula en las etapas tempranas de la infección demuestra que mientras aproximadamente el 95% de los macrófagos se infectan

masivamente (más de 10 bacterias por célula) con *B. canis*, solo un 60% de macrófagos se infecta con *B. abortus* y con un promedio de bacterias por célula infectada mucho menor (2-5). Este alto grado de infección y adhesión ha sido previamente reportado para cepas rugosas y al parecer *B. canis* no es la excepción [Javier Pizarro-Cerdá, 2000; P. G. Detilleux, 1990]. Por lo tanto, el efecto de mayor activación inducido por *B. canis* se podría deber más a una mayor exposición a antígenos de la bacteria que a una diferencia en la composición del LPS de la misma. Esta pregunta se podría responder utilizando preparaciones purificadas de ambos LPSs o lisados totales de ambos tipos de bacterias. Estos son experimentos que pueden dar continuación a los resultados acá presentados.

Tal y como se mencionó en párrafos anteriores el género *Brucella* carece de factores de virulencia clásicos, por lo que para el estudio de la patogénesis de la brucelosis es necesario analizar los diferentes mecanismos no convencionales que participan en la virulencia de la bacteria. Tal es el caso del sistema de secreción Tipo IV VirB y el sistema de dos componentes BvrRS. Dentro del primero, la proteína VirB8 es considerada como indispensable debido a su participación en el ensamblaje del sistema de secreción y particularmente en *B. abortus* se ha demostrado que

ésta proteína es expresada durante una ventana relativamente pequeña de la curva de crecimiento extracelular de la bacteria [Martinez-Nunez et al., 2010]. En el caso de *B. canis*, reportamos en el presente trabajo que la expresión de VirB8 es constitutiva durante toda la curva de crecimiento. La regulación del T4SS es fundamental para el éxito intracelular de *Brucella*. Por ejemplo, se ha determinado que la expresión máxima de VirB ocurre durante las primeras horas de la vida intracelular justo en el momento en que la bacteria transita hacia el retículo endoplásmico. Esta inducción máxima al parecer depende de los niveles basales que presenta el sistema cuando viene de su fase extracelular. Si esta hipótesis es correcta, se podría postular que *B. abortus* tiene períodos de alta competencia de infección muy restringidos en la curva de crecimiento mientras que *B. canis* sería mucho más competente durante toda la curva gracias a su expresión constitutiva de VirB. Adicionalmente, varios sistemas se han reportado que regulan al T4SS VirB de una manera muy estricta. Las diferencias marcadas que encontramos nosotros podrían sugerir que existen entonces sistemas de regulación diferentes entre *B. canis* y *B. abortus*.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Al concluir nuestro proyecto podemos aseverar que *B. canis* es una cepa rugosa natural capaz de promover su internalización y replicación en líneas celulares monocitos - macrófagos Raw 264.7 y J774A.1 evidenciada con la presencia de células altamente infectadas en tiempos tardíos post infección, y se propone la utilización de dichas líneas celulares como modelo ideal para estudiar la interacción con ésta cepa rugosa.

Existen importantes diferencias entre las cepas analizadas, lisas, mutantes rugosas y *B. canis*, una de las más notables es la expresión de VirB8, y subsecuente ensamblaje del sistema de secreción tipo IV, a diferentes tiempos de la curva extracelular, dejando claro cómo esta bacteria modula sus mecanismos de patogenicidad y confirma el papel que juegan el LPS, particularmente el polisacárido O en dicha patogenicidad. A modo de similitud es interesante resaltar el comportamiento en modelos murinos de una cepa naturalmente rugosa, donde la curva de recuperación de bacterias es relativamente similar a lo que ocurre en infecciones con cepas lisas y mutantes rugosas, lo que refuerza nuestra aseveración de la exitosa replicación intracelular de *B. canis*.

El incremento en la demanda de servicios de salud veterinaria, la creciente interacción mascota-humano, la ya existente falta de conciencia sobre el bienestar animal y la prevalencia de animales callejeros, así como el promisorio mercado de la cría de perros en América Latina, entre otras, son razones pertinentes para mantenernos atentos a esta zoonosis bacteriana.

Se requieren estudios de fondo para ampliar los conocimientos de los mecanismos de patogénesis de *B. canis*, entre ellos podrían incluirse análisis proteómicos y de componentes de su membrana externa, incluido su LPS, estudios en modelos celulares de sistema reproductor ya sea de origen canino, etc. que se asemejen a lo que sucede en la infección natural, estudios de la ruta intracelular y la compartimentalización utilizada por *B. canis*, análisis moleculares de la interacción de esta cepa con el sistema inmune; análisis filogenéticos y genéticos para especies e incluso biovars, y finalmente estudios más detallados sobre la expresión de factores de virulencia observados en las cepas lisas, entre otros.

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS

Arenas GN, Staskevich AS, Aballay A, Mayorga LS. 2000. Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. *Infect Immun* 68(7):4255-4263.

Ariza J. 2002. Brucelosis en el siglo XXI. *Medicina Clinica Barcelona* 9(119):337-344.

Audic S, Lescot M, Claverie JM, Scholz HC. 2009. *Brucella microti*: the genome sequence of an emerging pathogen. *BMC Genomics* 10:352.

Bagués MJd, Terraza A, Gross A, Dornand J. 2004. Different Responses of Macrophages to Smooth and Rough *Brucella* spp.: Relationship to Virulence. *Infection and Immunity* 72(4):2429-2433.

Barquero-Calvo Elias C-AR, Chacón-Díaz Carlos, Quesada-Lobo Lucía, Martirosyan Anna, Guzmán-Verri Caterina, Iriarte Maite, Mancek-Keber Mateja, Jerala Roman, Gorvel Jean Pierre, Moriyón Ignacio, Moreno Edgardo, Chaves-Olarte Esteban. 2009. The Differential Interaction of *Brucella* and *Ochrobactrum* with Innate Immunity Reveals Traits Related to the Evolution of Stealthy Pathogens. *Plos One* 4(6).

Barquero-Calvo Elías C-OE, Weiss David S., Guzmán-Verri Caterina, Chacón-Díaz Carlos, Rucavado Alexandra, Moriyón Ignacio and Moreno Edgardo. 2007. *Brucella abortus* Uses a Stealthy Strategy to Avoid Activation of the Innate Immune System during the Onset of Infection. *PlosOne* 2(7).

Boschioli ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, Michaux-Charachon S, Bourg G, Allardet-Servent A, Cazeveille C, Liautard JP, Ramuz M, O'Callaghan D. 2002. The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(3):1544-1549.

Bowden RA, Verger JM, Grayon M, Limet JN, Dubray G. 1993. Simultaneous expression of smooth and rough phase properties related to lipopolysaccharide in a strain of *Brucella melitensis*. *J Med Microbiol* 39(5):363-370.

Campos MA, Rosinha GM, Almeida IC, Salgueiro XS, Jarvis BW, Splitter GA, Qureshi N, Bruna-Romero O, Gazzinelli RT, Oliveira SC. 2004. Role of Toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice. *Infect Immun* 72(1):176-186.

Carmichael LE, Kenney RM. 1968. Canine abortion caused by *Brucella canis*. *J Am Vet Med Assoc* 152(6):605-616.

Caro-Hernandez P, Fernandez-Lago L, de Miguel MJ, Martin-Martin AI, Cloeckaert A, Grillo MJ, Vizcaino N. 2007. Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*. *Infect Immun* 75(8):4050-4061.

Carvalho Neta AV, Styne AP, Paixao TA, Miranda KL, Silva FL, Roux CM, Tsolis RM, Everts RE, Lewin HA, Adams LG, Carvalho AF, Lage AP, Santos RL. 2008. Modulation of the bovine trophoblastic innate immune response by *Brucella abortus*. *Infect Immun* 76(5):1897-1907.

Castaneda-Roldan EI, Ouahrani-Bettache S, Saldana Z, Avelino F, Rendon MA, Dornand J, Giron JA. 2006. Characterization of SP41, a surface protein of *Brucella* associated with adherence and invasion of host epithelial cells. *Cell Microbiol* 8(12):1877-1887.

Celli J, de Chastellier C, Franchini DM, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel JP. 2003. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 198(4):545-556.

Comerci DJ, Martinez-Lorenzo MJ, Sieira R, Gorvel JP, Ugalde RA. 2001.

Essential role of the VirB machinery in the maturation of the Brucella abortus-containing vacuole. Cell Microbiol 3(3):159-168.

Corbel MJ. 1997. Brucellosis: an overview. Emerg Infect Dis 3(2):213-221.

Cutler SJ, Fooks AR, van der Poel WH. 2010. Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world.

Emerg Infect Dis 16(1):1-7.

Cutler SJ, Whatmore AM, Commander NJ. 2005. Brucellosis--new aspects of an old disease. J Appl Microbiol 98(6):1270-1281.

Chacón-Díaz C, Melissa Muñoz-Rodríguez, Elías Barquero-Calvo, Caterina Guzmán-Verri, Esteban Chaves-Olarte, María Jesús Grilló, Edgardo Moreno. 2011a. The use of green fluorescent protein as a marker for Brucella vaccines. Elsevier vaccine 29(2011):577-582.

Chacón-Díaz Carlos M-RM, Barquero-Calvo Elías , Guzmán-Verri Caterina , Chaves-Olarte Esteban , Grilló Maria Jesus, Moreno Edgardo. 2011. The use of green fluorescent protein as a marker for Brucella vaccines. Elsevier 27:577-582.

Chaves-Olarte E, Guzman-Verri C, Meresse S, Desjardins M, Pizarro-Cerda J, Badilla J, Gorvel JP, Moreno E. 2002. Activation of Rho and Rab GTPases dissociates *Brucella abortus* internalization from intracellular trafficking. *Cell Microbiol* 4(10):663-676.

Christie PJ. 2001. Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol Microbiol* 40(2):294-305.

Dawson CE, Perrett LL, Stubberfield EJ, Stack JA, Farrelly SS, Cooley WA, Davison NJ, Quinney S. 2008a. Isolation and characterization of *Brucella* from the lungworms of a harbor porpoise (*Phocoena phocoena*). *J Wildl Dis* 44(2):237-246.

Dawson CE, Stubberfield EJ, Perrett LL, King AC, Whatmore AM, Bashiruddin JB, Stack JA, MacMillan AP. 2008b. Phenotypic and molecular characterisation of *Brucella* isolates from marine mammals. *BMC Microbiology*.

Douglas JT, Rosenberg EY, Nikaido H, Verstrete DR, Winter AJ. 1984. Porins of *Brucella* species. *Infect Immun* 44(1):16-21.

Edmonds MD, Cloeckert A, Booth NJ, Fulton WT, Hagius SD, Walker JV, Elzer PH. 2001. Attenuation of a *Brucella abortus* mutant lacking a major 25 kDa outer membrane protein in cattle. *Am J Vet Res* 62(9):1461-1466.

Edwards C, Jawad AS. 2006. History of brucellosis. *J R Soc Med* 99(2):54.

Fath MJ, Kolter R. 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol Rev* 57(4):995-1017.

Ficht MMK-MaTA. 2006. Evaluation of Protection Afforded by *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* Unmarked Deletion Mutants Exhibiting Different Rates of Clearance in BALB/c Mice. *Infection and immunity* 74(7):4048-4057.

Fortun J, Martin-Davila P, Moreno S, De Vicente E, Nuno J, Candelas A, Barcena R, Garcia M. 2002. Risk factors for invasive aspergillosis in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 8(11):1065-1070.

Freer E, Pizarro-Cerda J, Weintraub A, Bengoechea JA, Moriyon I, Hultenby K, Gorvel JP, Moreno E. 1999. The outer membrane of *Brucella ovis* shows increased permeability to hydrophobic probes and is more susceptible to cationic peptides than are the outer membranes of mutant rough *Brucella abortus* strains. *Infect Immun* 67(11):6181-6186.

Gonzalez-Barrientos R, Morales JA, Hernandez-Mora G, Barquero-Calvo E, Guzman-Verri C, Chaves-Olarte E, Moreno E. 2010. Pathology of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) infected with *Brucella ceti*. *J Comp Pathol* 142(4):347-352.

Gorvel JP, Moreno E. 2002. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol* 90(1-4):281-297.

Guzman-Verri C, Chaves-Olarte E, von Eichel-Streiber C, Lopez-Goni I, Thelestam M, Arvidson S, Gorvel JP, Moreno E. 2001. GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in nonprofessional phagocytes: direct activation of Cdc42. *J Biol Chem* 276(48):44435-44443.

Guzman-Verri C, Manterola L, Sola-Landa A, Parra A, Cloeckert A, Garin J, Gorvel JP, Moriyon I, Moreno E, Lopez-Goni I. 2002. The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(19):12375-12380.

Haas LF. 2001. Sir David Bruce (1855-1931) and Thermistocles Zammit (1864-1935). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70(4):520.

Harper J, Silhavy T. 2001. Principles in bacterial pathogenesis. ed G, editor. 43-74 p.

Hernandez-Mora G, Manire CA, Gonzalez-Barrientos R, Barquero-Calvo E, Guzman-Verri C, Staggs L, Thompson R, Chaves-Olarte E, Moreno E. 2009. Serological diagnosis of *Brucella* infections in odontocetes. *Clin Vaccine Immunol* 16(6):906-915.

Hollett RB. 2006. Canine brucellosis: outbreaks and compliance. *Theriogenology* 66(3):575-587.

Javier CA, Félix GJ, Loreta. 1978. Serologia de la Brucelosis: A proposito de un estudio en una poblacion de alto riesgo en Tegucigalpa, Honduras. *Revista Medica Hondureña* 46.

Javier Pizarro-Cerdá R-MD, María-José Martínez-Lorenzo, Philippe Montcourrier, Ignacio Moriyón, Ignacio Lopez-Goñi, Jean-Jacques Letesson, Jean-Pierre Gorvel and Edgardo Moreno. 2000. Interaction of *Brucella* strains expressing different quantities of N-formylperosamine polysaccharides with non-professional phagocytes.

Jiménez de Bagués María P. O-BS, Quintana Juan F., Mitjana Olga, Hanna Nabbil, Bessoles Stéphanie, Sanchez Francóise, Scholz Holger, Lafont Virginie, Kohler Stephan and Occhialini Alessandra. 2010. The New Species *Brucella microti* Replicates in Macrophages and Causes Death in Murine Models of Infection. *The Journal of Infectious Diseases* 202(1):3-10.

Kourany M, Martinez R, Vasquez MA. 1975. [Seroepidemiologic survey of brucellosis in a high risk population of Panama]. *Bol Oficina Sanit Panam* 79(3):230-236.

Laval ER. 2006. Contribución al estudio histórico de la brucelosis en Chile *Revista Chilena de Infectología* 23(4):362-366.

Lin J, Ficht TA. 1995. Protein synthesis in *Brucella abortus* induced during macrophage infection. *Infect Immun* 63(4):1409-1414.

López-Goñi DG-Y, C. M. Marín, M. J. de Miguel, M. Muñoz J. M. Blasco, I. Jacques MG, A. Cloeckert, A. C. Ferreira, R. Cardoso, M.M. I. Corrêa de Sá, K. Walravens DAaBG-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):p. 3484–3487.

Lucero NE, Corazza R, Almuzara MN, Reynes E, Escobar GI, Boeri E, Ayala SM. 2010. Human Brucella canis outbreak linked to infection in dogs. Epidemiol Infect 138(2):280-285.

Lucero NE, Maldonado PI, Kaufman S, Escobar GI, Boeri E, Jacob NR. 2009. Brucella canis Causing Infection in an HIV-Infected Patient. Vector Borne Zoonotic Dis.

M.Kathleen Glynn d, mpvm, and Tracey V. Lynn, dvm, ms, dacvpm. 2008. Zoonoses update: Brucellosis. The American Veterinary Medical Association 232(6):900-908.

Manterola L, Guzman-Verri C, Chaves-Olarte E, Barquero-Calvo E, de Miguel MJ, Moriyon I, Grillo MJ, Lopez-Goni I, Moreno E. 2007. BvrR/BvrS-controlled outer membrane proteins Omp3a and Omp3b are not essential for Brucella abortus virulence. Infect Immun 75(10):4867-4874.

Mantur BG, Amarnath SK. 2008. Brucellosis in India - a review. *J Biosci* 33(4):539-547.

Mantur BG, Biradar MS, Bidri RC, Mulimani MS, Veerappa, Kariholu P, Patil SB, Mangalgi SS. 2006. Protean clinical manifestations and diagnostic challenges of human brucellosis in adults: 16 years' experience in an endemic area. *J Med Microbiol* 55(Pt 7):897-903.

Martín-Martín AI, Vizcaíno N, Fernández-Lago L. 2010. Cholesterol, ganglioside GM1 and class A scavenger receptor contribute to infection by *Brucella ovis* and *Brucella canis* in murine macrophages. *Microbes and Infection* 12(3):246-251.

Martinez- Núñez C, Altamirano-Silva Pamela, Alvarado-Guillén, Francisco, Moreno Edgardo, Guzmán-Verri Caterina, and Chaves-Olarte Esteban. 2010. The Two-Component System BvrR/BvrS Regulates the Expression of the Type IV Secretion System VirB in *Brucella abortus* *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* 192(21): p. 5603–5608.

Mazet JA, Clifford DL, Coppolillo PB, Deolalikar AB, Erickson JD, Kazwala RR. 2009. A "one health" approach to address emerging zoonoses: the HALI project in Tanzania. *PLoS Med* 6(12):e1000190.

Moreno E, Cloeckert A, Moriyon I. 2002. Brucella evolution and taxonomy. Vet Microbiol 90(1-4):209-227.

Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Wolters J, Busch M, Mayer H. 1990. Brucella abortus 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. J Bacteriol 172(7):3569-3576.

Moriyón I, Lopez-Goñi I. 2004. Brucella Molecular and Cellular Biology.17-22.

Nagai H, Roy CR. 2003. Show me the substrates: modulation of host cell function by type IV secretion systems. Cellular Microbiology 5(6):373-383.

Ocon P, Reguera JM, Morata P, Juarez C, Alonso A, Colmenero JD. 1994. Phagocytic cell function in active brucellosis. Infect Immun 62(3):910-914.

OIE OfAH. 2007. Brucellosis. Organization for Animal Health Instituto de Sanidad Animal.

P. G. Detilleux BLDaNF. 1990. Entry and Intracellular Localization of *Brucella* spp. in Vero Cells: Fluorescence and Electron Microscopy. *Veterinary Pathology* 27:317-328.

Paolicchi F. 2000. Epididimitis ovina por *Brucella ovis*: Lesiones genitales y respuesta inmune antiespermatocida.. Sitio Argentino de Produccion Animal.

Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. 2005. Brucellosis. *N Engl J Med* 352(22):2325-2336.

Pearson AM. 1996. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 8(1):20-28.

Pei J, Ficht TA. 2004. *Brucella abortus* Rough Mutants Are Cytopathic for Macrophages in Culture. *Infection and immunity* 72(1):440-450.

Pei J, Wu Q, Kahl-McDonagh M, Ficht TA. 2008. Cytotoxicity in macrophages infected with rough *Brucella* mutants is type IV secretion system dependent. *Infection and Immunity* 76(1):30-37.

Pizarro-Cerdá J, Méresse S, Parton RG, Goot GVD, Sola-Landa A, Lopez-Goñí I, Moreno E, Gorvel J-P. 1998a. *Brucella abortus* Transits through the Autophagic Pathway and Replicates in the Endoplasmic Reticulum of Nonprofessional Phagocytes. *Infection and Immunity* 66(12):5711-5724.

Pizarro-Cerdá J, Moreno E, Sanguedolce V, Mege J-L, Gorvel JP. 1998b. Virulent *Brucella abortus* Prevents Lysosome Fusion and Is Distributed within Autophagosome-Like Compartments. *Infection and Immunity* 66(5):2387-2392.

Saldarriaga OA, Rugeles MT. 2002a. Inmunobiología de la infección por *Brucella* spp: Fundamentos para una estrategia vacunal. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 15(2):188-197.

Saldarriaga OA, Rugeles MT. 2002b. Inmunobiología de la infección por *Brucella* spp: Fundamentos para una estrategia vacunal. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 15(2):188-197.

Santos JM, Verstrete DR, Perera VY, Winter AJ. 1984. Outer membrane proteins from rough strains of four *Brucella* species. *Infect Immun* 46(1):188-194.

Sieira R, Comerci DJ, Sánchez DO, Ugalde RA. 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.

Sola-Landa A, Pizarro-Cerdá J, Grilló MJ, Moreno E, Moriyón I, Blasco JM, Gorvel JP, Goní IL. 1998. A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Molecular Microbiology* 29(1):125-138.

Soloaga R, Salinas A, Poterillo M, Margari A, Suar B, Lucero N, Turco M, M. Almuzara APa. 2004. Bacteriemia por *Brucella canis*. Aislamiento con el Sistema Bact-Alert. *Revista Argentina de Microbiología*(36):81-84.

Spink WW, Morisset R. 1970. Epidemic canine brucellosis due to a new species: *Brucella canis*. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 81:43-50.

Stock R, Naor D. 1995. Induction of an autoimmune response against syngeneic lymphoma cells by immunogenic 64-kDa protein isolated from normal blast cells of BALB/c mice. *Cancer Immunol Immunother* 40(1):48-56.

Swenson RM, Carmichael LE, Cundy KR. 1972. Human infection with *Brucella canis*. *Ann Intern Med* 76(3):435-438.

Teane M. A. Silva EC, Tatiane A. Paixao, Renée M. Tsolis and Renato L. Santos. 2011a. Laboratory Animal Models for Brucellosis Research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011.

Teane M. A. Silva TAP, Erica A. Costa, Mariana N. Xavier, Joicy Cortez Sa, Valeria S. Moustacas, Andreas B. den Hartigh, Alcina V. Carvalho Neta, Sergio C. Oliveira, Renee Tsolis and Renato L. Santos. 2011b. Putative ATP-Binding Cassette Transporter Is Essential for *Brucella ovis* Pathogenesis in Mice. *Infection and immunity* 79(4):1706 - 1717.

Tzaneva V, Ivanova S, Georgieva M, Tasheva E. 2009. Investigation of the spread of brucellosis among human and animal populations in southeastern Bulgaria, 2007. *Euro Surveill* 14(17).

WHO. 2010. World Health Organization. Zoonoses and Veterinary Public Health. Official Site.

ANEXOS

Anexo 1: Hoja de bioseguridad para especies del genero *Brucella* proporcionada por el Ministerio de Salud de Canadá.

Brucella spp. (*B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. suis*) -

Material Safety Data Sheets (MSDS)

**MATERIAL SAFETY DATA SHEET - INFECTIOUS
SUBSTANCES**

SECTION I - INFECTIOUS AGENT

NAME: *Brucella* spp. (*B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. suis*)

SYNONYM OR CROSS REFERENCE: Brucellosis, Undulant fever, Bang's disease, Malta fever, Mediterranean fever

CHARACTERISTICS: Gram negative cocci or small rods, aerobic, non-motile, urease +

SECTION II - HEALTH HAZARD

PATHOGENICITY: All *Brucella* isolates are potentially pathogenic to humans; systemic bacterial disease with acute or insidious onset; intermittent fever, headache, weakness, profuse sweating, chills, arthralgia; localized suppurative infections; subclinical infections are frequent; <2% case fatality rate for untreated cases; may have long recovery period

EPIDEMIOLOGY: Worldwide, especially in Mediterranean countries of Europe and Africa; Middle East, India, central Asia, Mexico, Central and South America; common in those who eat raw caribou; occurrence often depends on extent of animal *Brucellosis*; predominantly an occupational disease of those who work with infected animals or their tissues

HOST RANGE: Humans, cattle, swine, goats, sheep, deer, caribou, elk, dogs, coyotes

INFECTIOUS DOSE: Unknown

MODE OF TRANSMISSION: Through ingestion, direct contact via skin abrasions and mucous membranes, and inhalation; risk factors include contact with infected tissues, blood, urine, vaginal discharge, aborted fetuses; ingestion of raw milk or cheese from infected animals; contact in abattoirs; laboratory-acquired (generally through aerosolization)

INCUBATION PERIOD: Highly variable; 5- 60 days; occasionally several months

COMMUNICABILITY: No evidence of person to person transmission

SECTION III - DISSEMINATION

RESERVOIR: Cattle (*B. abortus* most common) and other animals

(see host range)

ZOONOSIS: Yes, especially from cattle

VECTORS: None

SECTION IV - VIABILITY

DRUG SUSCEPTIBILITY: Susceptible to tetracyclines and streptomycin or TMP-SMX; therapy usually consists of a combination of doxycycline and streptomycin

DRUG RESISTANCE: Resistant to penicillins and cephalosporins

SUSCEPTIBILITY TO DISINFECTANTS: Susceptible to many disinfectants - 1% sodium hypochlorite, 70% ethanol, iodine/alcohol solutions, glutaraldehyde, formaldehyde

PHYSICAL INACTIVATION: Susceptible to moist heat (121°C for at least 15 min) and dry heat (160-170°C for at least 1 hour)

SURVIVAL OUTSIDE HOST: Carcasses and organs - up to 135 days; paper - 32 days; soil - 125 days; blood 4°C - 180 days

SECTION V - MEDICAL

SURVEILLANCE: Monitor for symptoms; isolation of organism from blood or tissue samples; confirm by serological testing

FIRST AID/TREATMENT: Antibiotic therapy

IMMUNIZATION: Vaccines not available for use in humans

PROPHYLAXIS: None

SECTION VI - LABORATORY HAZARDS

LABORATORY-ACQUIRED INFECTIONS: Most commonly reported laboratory-acquired infection; 423 cases up to 1976 with 5 deaths

SOURCES/SPECIMENS: Cultures, blood, tissues, placentas, fetuses, urine, uterine discharges

PRIMARY HAZARDS: Exposure to aerosols; direct skin contact with cultures of infectious specimens from animals; ingestion (mouth pipetting); accidental inoculation; sprays into eyes, nose and mouth

SPECIAL HAZARDS: Most cases have involved exposure to *Brucella* organisms being grown in large quantities

SECTION VII - RECOMMENDED PRECAUTIONS

CONTAINMENT REQUIREMENTS: Biosafety level 2 practices for activities involving clinical materials of human or animal origin; Biosafety level 3 containment, practices and facilities for all manipulations of cultures and for experimental animal studies

PROTECTIVE CLOTHING: Laboratory coat; gloves when direct contact with infectious materials is unavoidable: gloves and gown (tight wrists and tie in back) for work with infectious material in

biosafety cabinet

OTHER PRECAUTIONS: All procedures likely to generate aerosols should be carried out in a biosafety cabinet

SECTION VIII - HANDLING INFORMATION

SPILLS: Allow aerosols to settle; wearing protective clothing, gently cover spill with paper towels and apply 1% sodium hypochlorite, starting at perimeter and working towards the centre; allow sufficient contact time (30 min) before clean up

DISPOSAL: Decontaminate before disposal; steam sterilization, incineration, chemical disinfection

STORAGE: In sealed containers that are well labelled

SECTION IX - MISCELLANEOUS INFORMATION

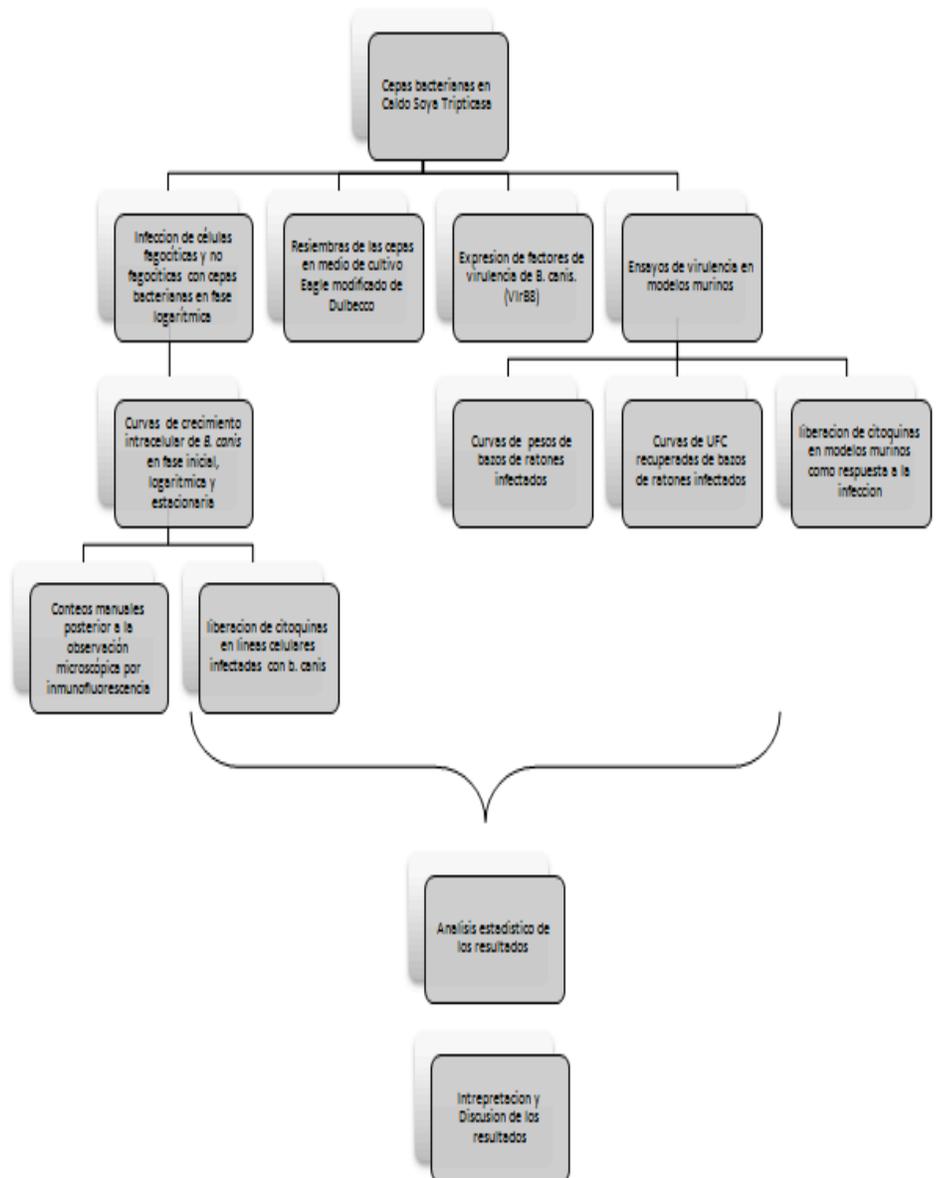
Date prepared: November 1999

Prepared by: Office of Laboratory Security, PHAC

Although the information, opinions and recommendations contained in this Material Safety Data Sheet are compiled from sources believed to be reliable, we accept no responsibility for the accuracy, sufficiency, or reliability or for any loss or injury resulting from the use of the information. Newly discovered hazards are frequent and this information may not be completely up to date.

Copyright © Health Canada, 2001

Anexo 3: Flujograma de trabajo



AGRADECIMIENTO ESPECIAL

Este proyecto de tesis ha sido posible gracias a una beca de estudio e investigación otorgada por el Programa Teasdale-Corti Honduras-Canadá, 2007-2012 *“Fortaleciendo Capacidades para Lograr la Meta No. 6 del Milenio en Honduras: Combatiendo las Enfermedades Infecciosas”*. Dicho proyecto opera con fondos del programa Teasdale-Corti para Alianzas para la Investigación en Salud Mundial de la agencia Canadiense **Iniciativa para la Investigación en Salud Mundial** (www.ghri.ca .)

This thesis project has been possible thanks to a study and research scholarship granted by the Honduras-Canada Teasdale-Corti Project 2007-2012 *“Increasing Capacity to Achieve Millennium Development Goal # 6 in Honduras: Combating Infectious Diseases”*, funded by the Teasdale-Corti Global Health Research Partnership Program of the **Global Health Research Initiative** (GHRI), Canada (www.ghri.ca .)

Este proyecto también es posible gracias a la beca para pasantía otorgada por la Red Centroamericana para la investigación y el entrenamiento en enfermedades Tropicales (**NeTropica**), los materiales e insumos serán financiados con “Fondos del Sistema, CONARE, Costa Rica” y la colaboración e instalaciones para la realización de los experimentos proporcionada por el Laboratorio de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, en Heredia, Costa Rica.

