



Universidad de Concepción
Dirección de postgrado
Facultad de ciencias Biológicas – Programa de Magister en Ciencias
mención Microbiología

**DELECIÓN DEL MARCO DE LECTURA ABIERTO (ORF)
BAB1_0260 AFECTA LA ADHESIÓN, INTERNALIZACIÓN Y
CRECIMIENTO INTRACELULAR DE *Brucella abortus* 2308 EN
MACRÓFAGOS RAW 264.7.**



Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias mención Microbiología

FRANCISCO IGNACIO ÁLVAREZ GONZÁLEZ

Julio-2020

Concepción-Chile

Profesor Guía: Dr. Ángel Oñate Contreras

Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dr. Ángel Oñate Contreras
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:



Dra. Coralia Rivas Rocco
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Carlos Smith Gallardo
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dr. Gerardo González Rocha
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

ÍNDICE

ÍNDICE	III
RESUMEN	VI
INTRODUCCIÓN	IX
HIPÓTESIS DE TRABAJO	15
OBJETIVOS	15
MATERIALES Y MÉTODO	16
RESULTADOS	23
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIÓN	41
REFERENCIAS	42



ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Ensayo de adhesión de cepas de <i>B. abortus</i> con macrófagos RAW 264.7. _____	26
Figura 2. Ensayo de absorción bacteriana. _____	28
Figura 3. Ensayo de internalización bacteriana. _____	30
Figura 4. Colocalización de cepas de <i>B. abortus</i> con endosoma temprano de macrófagos. _____	32
Figura 5. Colocalización de cepas de <i>B. abortus</i> con endosoma tardío de macrófagos. _____	34
Figura 6. Colocalización de cepas de <i>B. abortus</i> con retículo endoplasmático. _____	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados. _____17

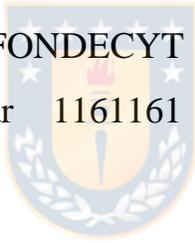


AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Ángel Oñate Contreras por todo el apoyo brindado durante la realización de esta tesis de magister.

A mis compañeros de laboratorio por la ayuda y colaboración en el desarrollo de esta tesis.

A los proyectos FONDECYT regular 1180122 y FONDECYT regular 1161161 por financiar esta investigación.



A mi familia, por su apoyo incondicional.

RESUMEN

Brucella abortus, bacteria Gram negativa y patógeno intracelular facultativo, es el agente causal de brucelosis bovina, una enfermedad infectocontagiosa que afecta a animales y humanos. Este microorganismo es capaz de utilizar como nicho replicativo el retículo endoplásmico para sobrevivir al interior de diversos tipos celulares, incluyendo macrófagos y células dendríticas. La infección de estas células por *Brucella abortus*, contribuye a la cronicidad de la enfermedad, permitiendo que este patógeno replique en su interior, llegando incluso a evadir la respuesta inmune del hospedero. Para conseguir esto, *B. abortus* ha desarrollado diversos factores de virulencia, tales como el sistema de secreción tipo IV (VirB), β 1,2 glucanos, entre otros. Estos factores le permiten adherir, proliferar y persistir dentro de células fagocíticas. Además, se ha descrito que ciertos marcos de lectura abiertos (ORFs), presentes en islas genómicas, estarían involucrados en la capacidad de replicación intracelular tanto en células fagocíticas profesionales como en células fagocíticas no profesionales. Uno de estos ORF es el BAB1_0260, presente en la IG3, que codifica para una proteína que actúa como hidrolasa

de peptidoglican (FlgJ), la cual permite ensamblar la estructura de la varilla flagelar en el espacio periplásmico, contribuyendo a la formación del flagelo. Considerando que la proteína FlgJ, al ser una proteína del flagelo podría estar relacionada con la motilidad y virulencia bacteriana, el objetivo de este estudio es determinar la contribución de ORF BAB1_0260, en la adherencia, invasión y sobrevivencia intracelular de *B. abortus* cepa 2308 en macrófagos murinos.



ABSTRACT

Brucella abortus, a Gram negative bacterium and a facultative intracellular pathogen, is the causative agent of bovine brucellosis, an infectious contagious disease that affects animals and humans. This microorganism is capable of using the endoplasmic reticulum as a replicative niche to survive inside various cell types, including macrophages and dendritic cells. Infection of these cells by *Brucella abortus* contributes to the chronicity of the disease, affecting this pathogen within it, even evading the host's immune response. To achieve this, *B. abortus* has developed various virulence factors such as the type IV secretion system (VirB), β 1,2 glucans, among others. These factors allow it to adhere, proliferate, and persist within phagocytic cells. Furthermore, certain open reading frames (ORFs), present on genomic islands, have been reported to be involved in intracellular replication capacity in both professional phagocytic and non-professional phagocytic cells. One of these ORFs is BAB1_0260, present in IG3, which codes for a protein that acts as a peptidoglycan hydrolase (FlgJ), allowing the assembly of the flagellar rod structure in the periplasmic space, contributing to the formation of the flagellum. Considering that the FlgJ protein, being a flagellum protein,

could be related to bacterial motility and virulence, the objective of this study is to determine the contribution of ORF BAB1_0260, in the adherence, invasion and intracellular survival of *B. abortus* strain 2308 in murine macrophages.



INTRODUCCIÓN

Brucelosis

La brucelosis es una de las zoonosis más importantes a nivel mundial, afectando principalmente a países del mediterráneo, África, Asia y países en vías de desarrollo (Corbel, 1997). La causante de esta enfermedad es una bacteria Gram negativa, cocobacilar, de crecimiento lento y patógeno intracelular facultativo perteneciente al género *Brucella* (Gorvel y Moreno, 2002). La infección con este microorganismo produce enfermedad crónica, aborto e infertilidad en los mamíferos que la padecen (Enright, 1990). En los humanos, la brucelosis se manifiesta por una fase aguda asociada a fiebre ondulante y una fase crónica, en donde *B. abortus* se hospeda en diferentes órganos llegando a producir severas complicaciones, tales como meningitis y endocarditis (Roop y col., 2004).

Actualmente, se han identificado diversas especies dentro del género *Brucella*, y cada una presenta una preferencia específica por su hospedero. Hasta el momento se ha descrito: *Brucella abortus* (ganado vacuno),

Brucella canis (perros), *Brucella melitensis* (ovejas y cabras), *Brucella neotomae* (roedores), *Brucella ovis* (ovejas), *Brucella suis* (cerdos, venados y liebres) y *Brucella microti* (ratones de campo) (Atluri y col., 2011; Whatmore y col., 2005). Además, se han identificado dos nuevas especies, *Brucella ceti* y *Brucella pinnipediae*, basados en sus hospederos preferenciales, los cetáceos y pinnípedos, respectivamente (Foster y col., 2007). Diversos estudios han descrito a *Brucella inopinata*, especie proveniente de un humano con brucelosis y con neumonía crónica (Scholz y col., 2010; Tiller y col., 2010).



Epidemiología

La brucelosis es una enfermedad zoonótica que afecta tanto a humanos como a animales, ya sean domésticos o salvajes. Las tres especies de *Brucella* con mayor virulencia son: *B. melitensis*, *B. suis* y *B. abortus* (Pappas y col., 2005).

La brucelosis bovina (causada por *B. abortus*), en los últimos años ha provocado pérdidas económicas importantes para la industria ganadera. Un

ejemplo claro de esto es India, donde la brucelosis es endémica, registrándose pérdidas de US\$ 3,4 billones anuales, debido principalmente a una disminución en la producción de leche y carne, disminución de animales nacidos, y al aumento de la eliminación de animales enfermos (Singh y col., 2015). La incidencia y prevalencia de esta enfermedad varía de país en país, siendo un problema importante en países del mediterráneo de Europa y África, el Oriente Medio y América del Sur (Gorvel, 1997). En Sudamérica, Uruguay es el país que tiene la menor prevalencia, con casos esporádicos; Argentina comenzó un programa de control, al igual que algunos estados de Brasil, mientras que en Chile el proceso de erradicación de brucelosis bovina comenzó gradualmente entre los años 1991 y 1996 (Martínez., 2013). En nuestro país, en el año 2003 la región de Magallanes fue declarada libre de brucelosis, lo que fue logrado mediante campañas de vacunación, reforzadas con vigilancias pasivas a mataderos y lecherías, además de vigilancia de predios fronterizos con Argentina (SAG, 2006).

Si bien cada país está centrado en generar estrategias sanitarias y de políticas públicas para el control y la erradicación de la brucelosis bovina, nuevos focos de brucelosis humana han surgido en los últimos años (Pappas y col.,

2005). La infección en humanos es causada por la manipulación de animales infectados o de sus productos, siendo una enfermedad de tipo ocupacional, donde las personas más expuestas son trabajadores de la industria ganadera, veterinarios, cuidadores de animales e investigadores de laboratorio (García, 2007). La infección se produce principalmente mediante el contacto directo con los animales que padecen brucelosis, o a través del consumo de alimentos contaminados (Godfroid y col., 2011; Seleem y col., 2010).



Inmunidad frente a *Brucella*

La inmunidad frente a microorganismos patógenos depende de la respuesta inmune innata y adaptativa. En el caso de *Brucella*, ambas respuestas trabajan en conjunto y de forma coordinada para su eliminación (Skendros y Boura, 2013).

Algunas bacterias son capaces de multiplicarse dentro de células del sistema inmune como macrófagos y células dendríticas, creando un nicho de replicación inaccesible para los anticuerpos circulantes, haciendo que su

eliminación requiera de la inmunidad mediada por células. Este tipo de respuesta involucra la participación de las células T CD4+ de tipo Th1 que secretan interferón gama (INF- γ), una citoquina que estimula la actividad bactericida de los macrófagos y también incrementa la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+. Estos últimos son capaces de destruir las células infectadas por *Brucella* u otro patógeno intracelular (Oliveira y col., 2002; Skendros y Boura, 2013).

Para que ocurra una respuesta celular, es necesaria la activación de la respuesta inmune innata (como primera fase), la cual depende de las células fagocíticas, células NK y proteínas del sistema del complemento (Skendros y Boura, 2013). Las células fagocíticas, ingieren y destruyen a estos microorganismos, sin embargo, existen bacterias patógenas tales como *Brucella*, que resisten o escapan a la degradación intracelular (Celli y col., 2003; Celli y Gorvel, 2004; Roy y col., 2006; Skendros y Boura, 2013). Algunas bacterias intracelulares activan las células NK, induciendo la producción de IFN- γ , el cual a su vez activa macrófagos y promueve la muerte de las bacterias fagocitadas. Así, las células NK y los macrófagos

proveen una defensa temprana contra estos microorganismos, antes del desarrollo de la inmunidad adaptativa (Skendros y Boura, 2013).

La respuesta inmune adaptativa, como segunda fase, representa el principal mecanismo de protección frente a *Brucella*. En esta respuesta, las principales células encargadas de coordinar la defensa frente a este patógeno dependen de las células T CD4+, las que reclutan a macrófagos activándolos mediante moléculas co-estimuladoras (CD40 ligando) y citoquinas (IFN- γ).

La activación de los fagocitos da como resultado la muerte de los microorganismos fagocitados. Además, las células T CD4+ también activan a los linfocitos T citotóxicos CD8+ que lisan células infectadas (Oliveira y col, 2002; Skendros y Boura, 2013). Las células T CD4+, bajo la influencia de IL-12 (citoquina producida por macrófagos y células dendríticas) pueden diferenciarse a células T CD4+ Th1 efectores que secretan IFN- γ , molécula que activa a los macrófagos para producir sustancias microbicidas, incluyendo especies reactivas del oxígeno, óxido nítrico y enzimas lisosomales, que permiten eliminar a los microorganismos fagocitados (Skendros y Boura, 2013). A pesar del robusto arsenal utilizado por el hospedero para eliminar a los microorganismos patógenos, *Brucella* ha

desarrollado diversas estrategias y factores de virulencia que le permiten adherirse, invadir, proliferar y persistir dentro de diversos tipos celulares (Arellano-Reynoso y col., 2005).

Evasión de la respuesta inmune

Brucella presenta distintos mecanismos para evadir la respuesta inmune. Entre los factores de virulencia clásicos encontramos el lipopolisacárido (LPS), una molécula integral de la membrana externa que posee tres dominios, lípido A, un núcleo de oligosacáridos y antígeno O (Haag y col., 2010). Se ha demostrado que el lípido A confiere protección a la bacteria dentro de la célula huésped, debido al bajo número de grupos aniónicos presentes en este dominio, lo que lleva a una menor unión y penetración de péptidos catiónicos antibacterianos (Pei y col., 2008). Por otra parte, el antígeno O protege a la bacteria de los mecanismos de muerte intracelular, inhibiendo la fusión entre la vesícula contenedora de *Brucella* (BCV) y lisosomas durante las primeras horas de infección (Parent y col., 2007; Porte y col., 2003). Además del LPS, se han reportado otros factores de virulencia

que estarían involucrados en la replicación intracelular y en la evasión inmune. Entre estos factores de virulencia encontramos el sistema de secreción tipo IV (T4SS) VirB, el cual es un sistema que permite transferir proteínas efectoras capaces de reclutar y modular diversos componentes y procesos celulares del hospedero (Celli y col., 2003; Comerci y col., 2001; Llosa y col., 2009; Roop y col., 2004; Von Bargen y col., 2012). También se ha descrito un sistema regulatorio de dos componentes BvrR/BvrS, el que sería un sistema sensorial de transducción bacteriano necesario para la expresión de diversas proteínas de membrana externa. Este sistema está asociado al control de la invasión y sobrevivencia intracelular, además de participar en la resistencia y replicación celular (Viadas y col., 2010). Otros componentes importantes en la virulencia de *Brucella* son los β -1,2 glucanos cíclicos (C β G), sintetizados en el lado citoplasmático de la membrana interna y que permitirían evadir el sistema inmune del hospedero (Arellano-Reynoso y col., 2005). Estudios recientes han descrito que la proteína Host Factor I (HF-I), una proteína de unión a ARN, está involucrada en la regulación de algunos genes y/o proteínas relacionadas con la virulencia de *Brucella*, contribuyendo a la resistencia al estrés durante

la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, y a la sobrevida al interior de macrófagos murinos (Lei y col., 2016).

Por medio de estos factores de virulencia, *Brucella* puede invadir distintos tipos celulares, escapar a los mecanismos de degradación, y proliferar (Arellano-Reynoso y col., 2005).

Internalización y sobrevida intracelular

Para que ocurra infección por *Brucella*, es necesario que este patógeno penetre el epitelio mucoso (posterior al contacto con su hospedero), llegando así al torrente sanguíneo y linfático, lugar donde infectará a macrófagos y células dendríticas (Skendros y Boura, 2013; Salcedo y col., 2008). La capacidad de este patógeno para sobrevivir y replicarse dentro de estas células es esencial en la cronicidad de la enfermedad (Pappas y col., 2005; Smith y Fitch, 1990). Por otro lado, los mecanismos de internalización de *Brucella* en la célula huésped están en estrecha relación con la célula a la que infectará, ya sea células fagocíticas o células no fagocíticas (Skendros y Boura, 2013).

Internalización de *Brucella* en células fagocíticas

Una vez que *Brucella* invade las mucosas, los fagocitos profesionales (macrófagos y células dendríticas) se extienden por el tejido submucosal para la ingestión de la bacteria (Ackermann y col., 1988).

La internalización de *Brucella* en células fagocíticas ocurre mediante un proceso de fagocitosis clásico, con la formación de fagosomas denominados “*Brucella*-containing vacuole” (BCV) (Ackermann y col., 1988). Esta internalización está mediada por enzimas con actividad GTPasa correspondientes a la subfamilia Rho. Estas proteínas traducen la señal provocada por el contacto entre *Brucella* y la célula huésped, a través de la activación de la cascada de tirosina quinasa vía MAPK. La activación de este sistema enzimático es necesario para la remodelación del citoesqueleto, en el punto de contacto entre la membrana de la célula y la bacteria (Guzmán-Veri y col., 2001). Este proceso comienza cuando los microtúbulos dirigen su crecimiento empujando la membrana celular para la formación de lamelipodios, los que rodean a la bacteria. Posteriormente, los filamentos de actina retraen la membrana celular, la que se ha extendido

para rodear a la bacteria, generando una invaginación y formando un fagosoma (Contreras Garcia y col., 2004). Se ha reportado que, si *Brucella* se encuentra opsonizada, el mecanismo de internalización es vía complemento y receptores Fc, mientras que, cuando *Brucella* no está opsonizada, parece penetrar vía lectinas o receptores de fibronectina (Campbell y col., 1994).

Tráfico intracelular de *Brucella*



Una vez que *Brucella* es internalizada, la bacteria redirige su tráfico intracelular hasta alcanzar su nicho replicativo, sin embargo, este tráfico no es igual en todas las células (Pizarro-Cerda y col., 1999). Antecedentes previos demuestran que, en células fagocíticas profesionales, las bacterias internalizadas son más propensas a su destrucción dentro de fagolisosomas, a diferencia de lo que ocurre en células no fagocíticas, en donde el porcentaje de bacterias eliminadas es menor. (Young y col., 1985).

Cuando *Brucella* ingresa a la célula huésped, se encuentra dentro de BCV, las cuales sufren procesos de maduración caracterizados por la fusión

secuencial con compartimentos endocíticos. Durante los primeros 15 minutos post infección (pi), las BCV interactúan de manera transitoria con compartimientos del sistema endocítico temprano, adquiriendo marcadores tales como early endosome antigen 1 (EEA1) y Rab5. Posteriormente, desde los 40 minutos hasta las 4 horas pi, las BCV adquieren glicoproteínas lisosomales, como lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1) y lysosomal-associated membrane protein 2 (LAMP 2). Es en este punto donde *Brucella* es capaz de evitar la formación de un fagolisosoma maduro y escapar de la vía endocítica clásica, esto se evidencia debido a que la BCV carece de la proteína catepsina D, una hidrolasa lisosomal característica de la formación del fagolisosoma (Pizarro-Cerdá y coll., 1998; Celli y col., 2003; Starr y col., 2008). Además, se ha registrado que entre las 12 y las 24 horas pi *Brucella* utiliza al retículo endoplásmico (RE) como un nicho en donde comienza un período de replicación exponencial (Pizarro-Cérda y col., 1998; Celli y col., 2003).

Se ha descrito que la capacidad de *Brucella* para persistir y replicarse al interior de diversas células estaría mediada, en parte, por productos génicos codificados en diversas islas genómicas.

Islas Genómicas en *Brucella abortus*

Las bacterias pueden adquirir fragmentos de ADN mediante transferencia horizontal de genes, un mecanismo importante en la evolución de sus genomas. Dentro del material genético transferido están las islas genómicas, las que acarrean genes que incrementan la adaptabilidad y la versatilidad de la bacteria a su entorno (Dobrindt y col., 2004). En *Brucella* se han identificado nueve islas genómicas (IGs), de las cuales IG-1, IG-5 e IG-6 no contribuyen a la virulencia del género (Rajashekara y col., 2004). La IG3, compartida por *B. abortus*, *B. melitensis*, y *B. suis*, contiene 29 marcos de lectura abiertos (ORFs), que van desde el BAB1_0250 a BAB1_0279, muchos de estos sin una función conocida (Rajashekara y col., 2008). Pese a esto, se ha descrito que el ORF BAB1_0274 codifica para la proteína Btp1, con homología a la región TIR de los receptores tipo Toll (TLR), lo que le permite inhibir las vías de señalización intracelular de los macrófagos y de las células dendríticas, suprimiendo la activación de la inmunidad innata (Salcedo y col., 2008). Además, se ha documentado que algunos productos génicos de estos ORFs cumplirían roles importantes en la sobrevivencia

intracelular de esta bacteria (Ortiz-Román y col., 2014). Uno de los ORF encontrado en la IG3, importante en la sobrevivencia intracelular de la bacteria es BAB1_0260 (Li X y col., 2012). Este marco de lectura codifica para la proteína FlgJ, la que actúa como hidrolasa de peptidoglicano, permitiendo ensamblar la estructura de la varilla flagelar en el espacio periplásmico, contribuyendo así a la formación del flagelo (Hirano, 2001). Esta proteína podría estar potencialmente involucrada en la virulencia bacteriana, ya que la vacunación utilizando una proteína recombinante de FlgJ confirió niveles de protección significativos en ratones infectados con la bacteria (Li y col., 2012). Dado lo anterior, el papel de la proteína FlgJ ha sido objeto de diversas preguntas sobre su función biológica en motilidad y adherencia bacteriana.

Considerando que FlgJ podría estar relacionada con la virulencia bacteriana, el objetivo de este estudio es determinar la contribución de ORF BAB1_0260, en la adherencia, invasión y sobrevivencia intracelular de *B. abortus* cepa 2308 en macrófagos murinos.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La hipótesis de este estudio es la siguiente: La delección del ORF BAB1_0260 de *Brucella abortus* 2308 afecta negativamente la capacidad de invasión intracelular en macrófagos Raw 264.7.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar el rol de ORF BAB1_0260 en la adherencia, invasión y proliferación intracelular de *B. abortus* 2308 en células fagocíticas usando un modelo *in vitro*.

Objetivos específicos:

1. Determinar el efecto de la delección del ORF BAB1_0260 en la adhesión de *Brucella abortus* a macrófagos RAW 264.7.
2. Evaluar el papel del ORF BAB1_0260 en los primeros eventos de internalización de *Brucella abortus* en macrófagos RAW 264.7.
3. Determinar la contribución del ORF BAB1_0260 en el tráfico intracelular en células fagocíticas.

MATERIALES Y MÉTODO

Cepas bacterianas y plásmidos

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados.

Cepas	Características	Fuente
<i>B. abortus</i> 2308	Cepa silvestre, lisa y patógena.	Laboratorio Inmunología Molecular UdeC.
<i>B. abortus</i> Δ 260	<i>B. abortus</i> 2308 mutante para BAB1_0260.	Laboratorio Inmunología Molecular UdeC.
<i>B. abortus</i> 2308-GFP	Cepa silvestre, lisa y patógena que expresa GFP.	Laboratorio Inmunología Molecular UdeC.
<i>B. abortus</i> Δ 260-GFP	<i>B. abortus</i> 2308 mutante para BAB1_0260 que expresa GFP.	En este trabajo.
<i>B. abortus</i> Δ 260c-GFP	<i>B. abortus</i> 2308 mutante para BAB1_0260 que expresa GFP.	En este trabajo.
RAW 264.7	Línea celular macrofágica.	Laboratorio Inmunología Molecular UdeC.
Plásmidos	Características	Fuente
pAKgfp1	Vector de amplio rango de huésped, posee gen que codifica para proteína fluorescente verde (GFP). Confiere resistencia a ampicilina.	Laboratorio Inmunología Molecular UdeC.

Medios y condiciones de cultivo

La cepa patogénica *Brucella abortus* 2308 (silvestre), la cepa mutante para el ORF BAB1_0260 (*B. abortus* Δ 260), y la cepa complementada *B. abortus* Δ 260c, fueron cultivadas durante 48 h en caldo brucella (difco) a 37°C en agitador rotatorio (100 rpm). El cultivo bacteriano fue suplementado con ampicilina (30 ug/ml) cuando fue necesario. Los macrófagos RAW 264.7 fueron cultivados en el medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suplementado con suero bovino fetal al 10%, a 37°C en una atmósfera con un 5% CO₂. Todos los experimentos que involucraron a la cepa *B. abortus* 2308 y sus derivados se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos establecidos por el Comité de Bioseguridad de la Universidad de Concepción.

Expresión de proteína fluorescente verde (GFP) en cepas *B. abortus* 2308, *B. abortus* Δ 260 y *B. abortus* Δ 260c.

Con el fin de visualizar el tráfico intracelular de las distintas cepas en estudio mediante técnicas de inmunofluorescencia, las cepas de *B. abortus*, fueron transformadas con el plásmido pAKgfp1 que contiene el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP). Para esto, se utilizó un total de 10^8 UFC/ml de cada cepa, a los que se agregó 200 ng de ADN plasmidial pAKgfp1, pulsadas con 2500 kV por 5 ms e incubadas en 1 ml de caldo brucella durante una hora, en agitación a 30 °C. Posteriormente, 100 µl de esta suspensión fue sembrada en placas con agar brucella suplementado con 30 µg/ml de ampicilina, e incubadas a 37 °C durante 72 h. Pasado este tiempo, todas las colonias fueron sembradas en caldo brucella durante 72 h, y se confirmó la expresión de la proteína fluorescente verde, mediante microscopia de fluorescencia utilizando el láser de 488 nm del microscopio EVOS®FLoid® Cell Imaging Station.

Ensayo de adhesión bacteriana.

Las células RAW 264.7 fueron cultivadas en placas de 12 pocillos con cubreobjetos de vidrio de 18 mm de diámetro (Fisher Scientific, EE. UU.) (1

x 10^5 células por pocillo). Posteriormente, las células fueron tratadas con Citocalasina D (0,5 mg / ml) para inhibir la internalización bacteriana. Las células fueron infectadas con las cepas bacterianas GFP positivas a una MOI de 1:10, centrifugadas a 150 x g durante 10 min, e incubadas a 37 °C con un 5% de CO₂ durante 30 min. Las células fueron lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído al 4%. Luego, las muestras fueron permeabilizadas utilizando Triton x-100 durante 15 min a temperatura ambiente. Las preparaciones fueron teñidas con faloidina Alexa fluor 633 (1: 500) durante 1 hora a 37 °C. Finalmente, las muestras fueron lavadas y montadas con medio de montaje fluorescente (Dako North America, Inc., EE. UU.) sobre los cubreobjetos. Todas las imágenes se recolectaron utilizando un microscopio (Zeiss LSM 780). Se seleccionaron 5 campos escogidos al azar, y se contó el número de bacterias adheridas en las células macrofágicas.

Internalización bacteriana.

Los macrófagos RAW 264.7 fueron cultivados en placas de 24 pocillos (10^5 células por pocillo) durante toda la noche en medio de cultivo DMEM.

Posteriormente, se removió el medio de cultivo y se les agregó 1 mL de las células bacterianas a una multiplicidad de infección (MOI) de 1:50 en medio DMEM. Para asegurar un contacto estrecho entre las células y las bacterias, las placas fueron centrifugadas por 10 min a $141 \times g$ a temperatura ambiente. Las células infectadas fueron lavadas con PBS, y luego incubadas a distintos tiempos (5 min, 15 min y 30 min), a 37 °C en DMEM suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10%. Finalmente, las células infectadas fueron lavadas con PBS y lisadas con 1 mL agua destilada. Las UFC bacterianas fueron cuantificadas como UFC/mL, utilizando diluciones seriadas en placas de agar brucella en triplicado.



Ensayo de absorción bacteriana.

Las células bacterianas de *B. abortus* fueron recolectadas, y se ajustó su número a una concentración 1×10^8 CFU/mL. Las bacterias fueron depositadas (1 mL) sobre las células y luego incubadas a 37°C durante 30 min. Las células infectadas fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 1 hora a 37 °C, permeabilizadas con Triton X-100 al 0,1% en PBS durante 10

minutos a 22 °C, y finalmente incubadas con tampón de bloqueo (albumina sérica de bovino (BSA) al 2% en PBS) durante 30 minutos a 37 °C. El contenido de actina se cuantificó como histogramas de fluorescencia utilizando un BD LSR Fortessa X-20 (FONDEQUIP EQM150061). El contenido promedio de actina de una población se expresó como la media de la intensidad de fluorescencia. Este experimento se realizó por duplicado.

Tráfico Intracelular.



Para determinar el tráfico intracelular de cepas en estudio, se cuantificó la colocalización de estas cepas con los endosomas tempranos y tardíos a los 15 minutos, y 4 h post infección (pi) respectivamente, mientras que el tráfico de estas cepas en el retículo endoplasmático (RE) fue medido a las 12 h pi. Después de su tiempo de cultivo, los macrófagos fueron fijados con paraformaldehído al 4% en PBS y lavados con PBS (pH 7,4). Posteriormente, las células fueron incubadas con anticuerpos policlonales de cabra anti-EEA1 (Early Endosome Antigen 1), un marcador endosomal temprano (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EE. UU.), anticuerpos de conejo anti-LAMP1

(proteína de membrana asociada a lisosomas 1), un marcador endosomal tardío (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EE. UU.), y con un anticuerpo de conejo anti-calnexina como marcador de RE (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Todos los anticuerpos fueron diluidos 1:200 en tampón PBS (pH 7,4) con albúmina de suero bovino al 1,5% (BSA) e incubados en una cámara húmeda durante 3 h. Transcurrido ese período, los cubreobjetos fueron lavados con PBS (pH 7,4) e incubados con IgG anti-cabra hecho en burro marcado con Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, MA, EE. UU.) o IgG anti-conejo hecho en burro Alexa Fluor 647 como anticuerpo secundario (Abcam, Cambridge, Reino Unido) diluido 1:500 según corresponda. Finalmente, las muestras fueron montadas en portaobjetos utilizando medio de montaje fluorescente Dako Cytomation (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Todas las muestras fueron observadas con un microscopio confocal de barrido láser Zeiss LSM 780 para adquisición de imágenes (Zeiss, Oberkochen, Alemania). Los datos se obtuvieron contando más de 30 células por experimento.

Análisis estadístico.

Los datos correspondientes a la colocalización de las cepas *B. abortus* Δ 260-GFP, *B. abortus* Δ 260c-GFP y *B. abortus* 2308-GFP con organelos intracelulares fueron obtenidos usando el programa ImageJ y analizados estadísticamente mediante un ANOVA de una vía usando el programa GraphPad Prism 6.0.



Ensayo de adhesión bacteriana.

Para determinar el efecto de la delección del ORF BAB1_0260 en la adhesión de *Brucella*, se determinó la capacidad que tiene la cepa mutante *B. abortus* Δ 260 de adherirse a macrófagos RAW 264.7 y se comparó con la adhesión de la cepa silvestre *B. abortus* 2308. Para esto, fue necesario cultivar los macrófagos en presencia de citocalasina D 0,5 mg/ml durante 30 min, con el

fin de inhibir la polimerización de activa en las células, e impedir la fagocitosis bacteriana. A continuación, las células fueron infectadas con las cepas en estudio, se evaluó la proximidad de cada bacteria a las células, y se determinó el porcentaje de bacterias adheridas. Se clasificaron las bacterias de acuerdo a su proximidad con los macrófagos, en donde si la distancia entre una bacteria y una célula es mayor a 5 μm las bacterias se observan de color magenta, mientras que si la distancia es menor a 5 μm , se observan las bacterias de color cyan. Las bacterias adheridas a las células se observan de color amarillo. En la **Fig. 1** se observa que el $48 \pm 4,5$ por ciento ($48 \pm 4,5$ %) de las bacterias mutantes están adheridas a los macrófagos RAW 264.7 luego de 30 min pi. Un porcentaje similar de la cepa silvestre se encuentran adherida a los macrófagos ($57 \pm 4,5$ %) a igual tiempo de infección. Lo anterior indica que no existe una diferencia en la capacidad de adhesión de la cepa mutante a pesar de la delección del ORF BAB1_0260, concluyendo que este ORF no está involucrado en la adhesión de la bacteria a células fagocíticas profesionales.

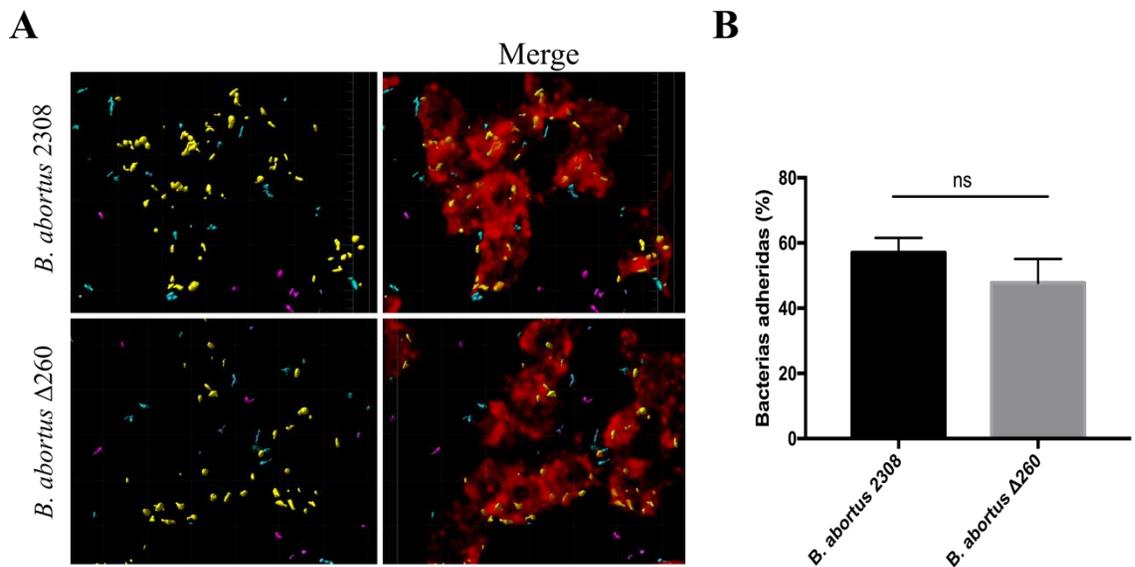


Figura 1. Ensayo de adhesión de cepas de *B. abortus* con macrófagos RAW 264.7. A) Se clasificaron las bacterias de acuerdo a su proximidad con los macrófagos. Cuando la distancia entre una bacteria y una célula es mayor a 5 μ m, la bacteria es de color magenta, mientras que cuando la distancia es menor a 5 μ m, las bacterias se observan color cyan. Las bacterias que están adheridas a las células se observan de color amarillo. B) Porcentaje de bacterias adheridas a macrófagos RAW 264.7. Los datos representan la media más la desviación estándar de dos experimentos independientes. “Ns” corresponde a no significativo.

Ensayo de absorción bacteriana.

Con el fin de determinar si la delección del ORF BAB1_0260 afecta el proceso de fagocitosis bacteriana, se observó el grado de polimerización de actina de macrófagos RAW 264.7 infectados con las distintas cepas en estudio. La comparación del grado de polimerización de actina de las células fagocíticas se determinó mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo. Posterior a 30 min pi, mediante inmunofluorescencia, se observó que las células infectadas con la cepa mutante *B. abortus* $\Delta 260$ presentan una mayor prolongación de los filamentos de actina, en comparación con las células que fueron infectadas con la cepa silvestre y la cepa complementada (**Fig. 2A**). Resultado similar se obtuvo cuando se cuantificó el contenido de f-actina en macrófagos infectados (**Fig. 2B y 2C**): Se observó que la intensidad de fluorescencia media de f-actina aumenta significativamente cuando las células son infectadas con la cepa mutante *B. abortus* $\Delta 260$ ($11694 \pm 303,3$ MFI $P < 0,01$), en comparación con células que fueron infectadas con la cepa silvestre, y con la cepa complementada ($8971 \pm 39,6$ y $8970 \pm 121,6$ MFI respectivamente). Esto confirma el resultado obtenido por

inmunofluorescencia, concluyendo que la cepa mutante *B. abortus* $\Delta 260$ provoca un aumento en el grado de polimerización de f-actina en macrófagos RAW 264.7.

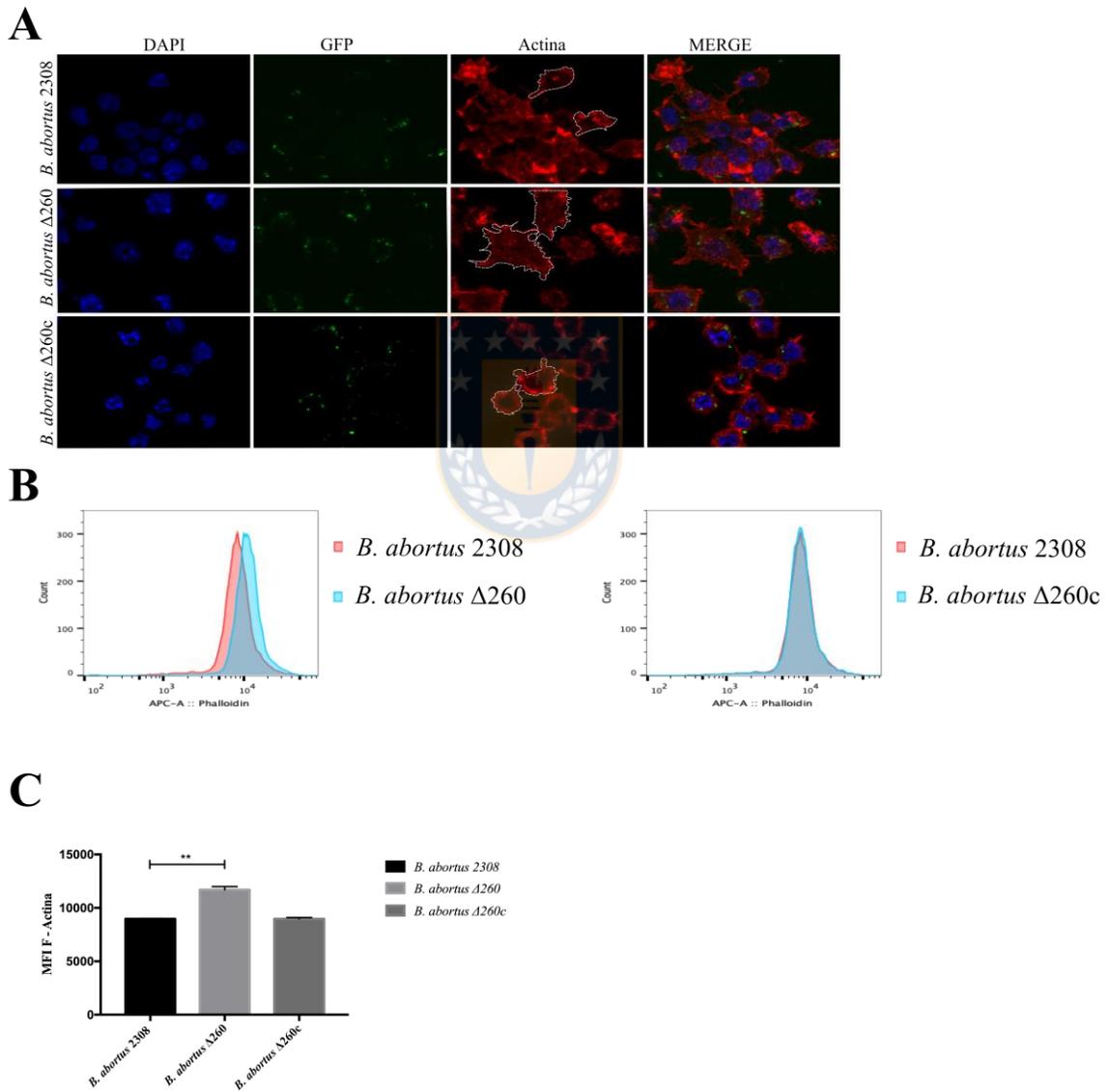


Figura 2. Ensayo de absorción bacteriana. A) En la imagen se observa, mediante inmunofluorescencia, el grado de polimerización de actina de macrófagos RAW 264.7 infectados con las distintas cepas en estudio. B) Determinación del grado de polimerización de actina de macrófagos RAW 264.7 mediante cartometría de flujo. C) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media (MFI). Los datos representan la media más la desviación estándar de dos experimentos independientes. Diferencias significativas: ** $P < 0.01$.



Ensayo de internalización bacteriana.

Para determinar si la delección de ORF BAB1_0260 está involucrada en la internalización de *Brucella* a células fagocíticas profesionales, se comparó el número de bacterias al interior de la célula RAW 264.7 en distintos tiempos de infección. Mediante recuento en placa, se observó (**Fig. 3**) que a los 5 min pi, no existe diferencia significativa entre el número de UFC/mL entre bacterias silvestres ($8 \times 10^5 \pm 1 \times 10^5$ UFC/mL) y bacterias mutantes ($6 \times 10^5 \pm 1 \times 10^5$ UFC/mL) al interior de los macrófagos. A los 15 min pi, tampoco se

observó diferencia significativa entre bacterias silvestres ($1,1 \times 10^6 \pm 2,9 \times 10^5$ UFC/mL) y bacterias mutantes ($1,1 \times 10^6 \pm 2,6 \times 10^5$ UFC/mL) al interior de macrófagos RAW 264.7 Sin embargo, a los 30 min pi, se observan diferencias significativas ($P < 0,05$) en la cantidad de UFC/mL al interior de los macrófagos, obteniendo una cantidad menor de bacterias mutantes al interior de la célula huésped ($1,2 \times 10^6 \pm 1,51 \times 10^5$ UFC/mL), en comparación con la cantidad de bacterias silvestres encontradas dentro de las células RAW 264.7 ($1,81 \times 10^6 \pm 2,1 \times 10^5$ UFC/mL). A partir de esto, se concluye que la delección del ORF BAB1_0260 afecta la internalización de las bacterias a los macrófagos.

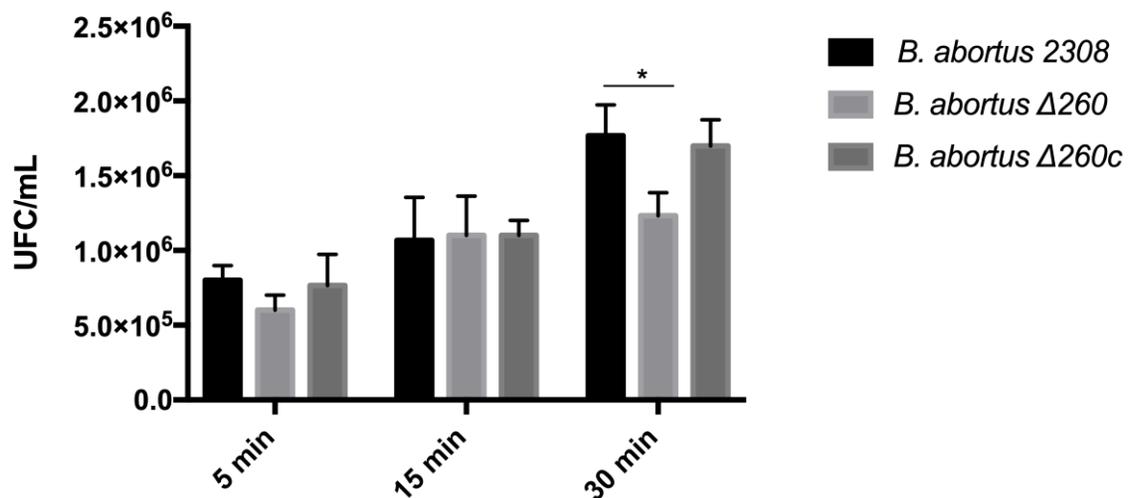


Figura 3. Ensayo de internalización bacteriana. Macrófagos RAW 264.7 fueron infectados con *B. abortus* 2308, *B. abortus* Δ 260 y *B. abortus* Δ 260c con un MOI de 1:50. Se cuantificó el número de bacterias al interior de las células fagocíticas a distintos tiempos de infección (5 min, 15 min y 30 min). Los datos representan la media más la desviación estándar de dos experimentos independientes. Diferencias significativas: * $P < 0.05$.

Tráfico intracelular.



Análisis de colocación de cepas *B. abortus* Δ 0260-GFP con endosomas tempranos en macrófagos RAW 264.7.

Se analizó el tráfico intracelular de la cepa *B. abortus* 2308-GFP y la cepa mutante con endosomas tempranos de macrófago RAW 264.7 y se determinó su colocación con el marcador EEA1. A los 15 min pi, no se observó diferencias entre el porcentaje de colocación de la cepa *B. abortus* 2308-GFP con la proteína EEA1 ($30 \pm 1,4$ %) y el porcentaje de colocación de la cepa mutante con el marcador de endosomal temprano ($30 \pm 2,8$ %) (**Fig**

4). Por otro lado, la cepa completada *B. abortus* Δ 260c-GFP mostró resultados similares a la cepa salvaje ($29 \pm 2,1$ %). Estos resultados indican que la eliminación del ORF BAB1_0260 no afecta el tráfico intracelular de este patógeno en las etapas endosomales tempranas.

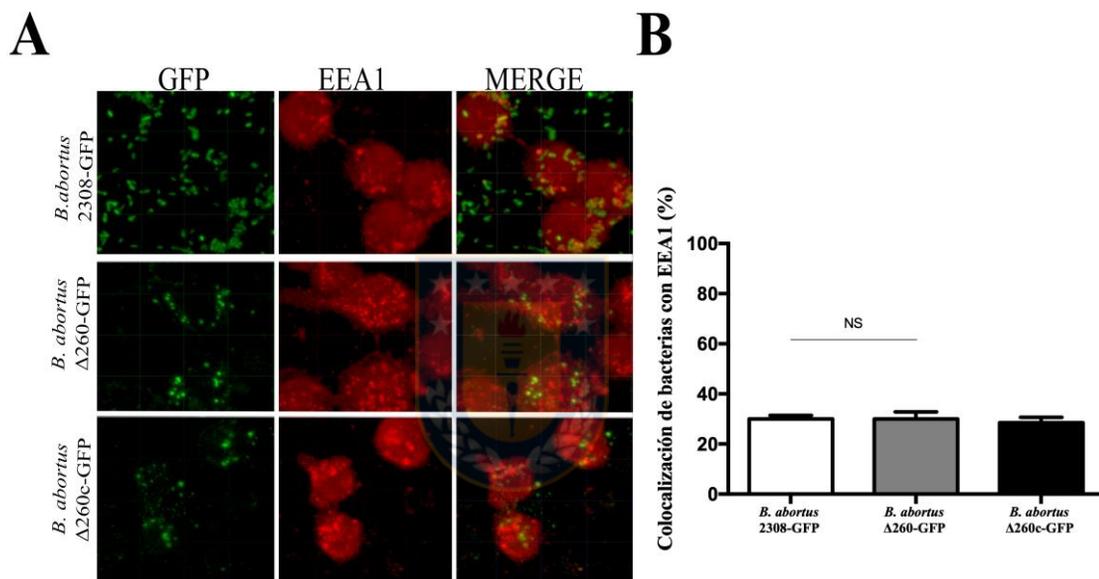


Figura 4. Colocalización de cepas de *B. abortus* con endosomas tempranos de macrófagos. A) Imagen confocal representativa que muestra la colocalización de cepas *B. abortus* 2308-GFP, *B. abortus* Δ 260-GFP y *B. abortus* Δ 260c-GFP con EEA1. B) Porcentaje de bacterias colocalizadas con EEA1. Los datos representan la media más la desviación estándar de dos experimentos independientes. “Ns” corresponde a no significativo.

Análisis de colocalización de cepas *B. abortus* Δ 0260-GFP con endosomas tardíos en macrófagos RAW 264.7

Se evaluó la interacción de *B. abortus* con compartimientos membranosos tardíos mediante la incubación de las cepas en estudio con macrófagos RAW 264.7. Se determinó su porcentaje de colocalización con LAMP1, marcador característico endosomal tardío. De la **Fig. 5**, se observa que un $22 \pm 3,5\%$ de las bacterias de la cepa salvaje se encuentran colocalizando con endosomas tardíos a las 4 h pi. A pesar de que el porcentaje de *B. abortus* Δ 260-GFP que colocalizan con LAMP1 disminuyó ($13\% \pm 2,8\%$), no se observan diferencias significativas. La cepa completada *B. abortus* Δ 260c mostró resultados similares ($23 \pm 3,6\%$) a la cepa silvestre. Estos resultados sugieren que el ORF BAB1_0260 no está participando en la interacción entre *Brucella abortus* y endosomas tardíos.

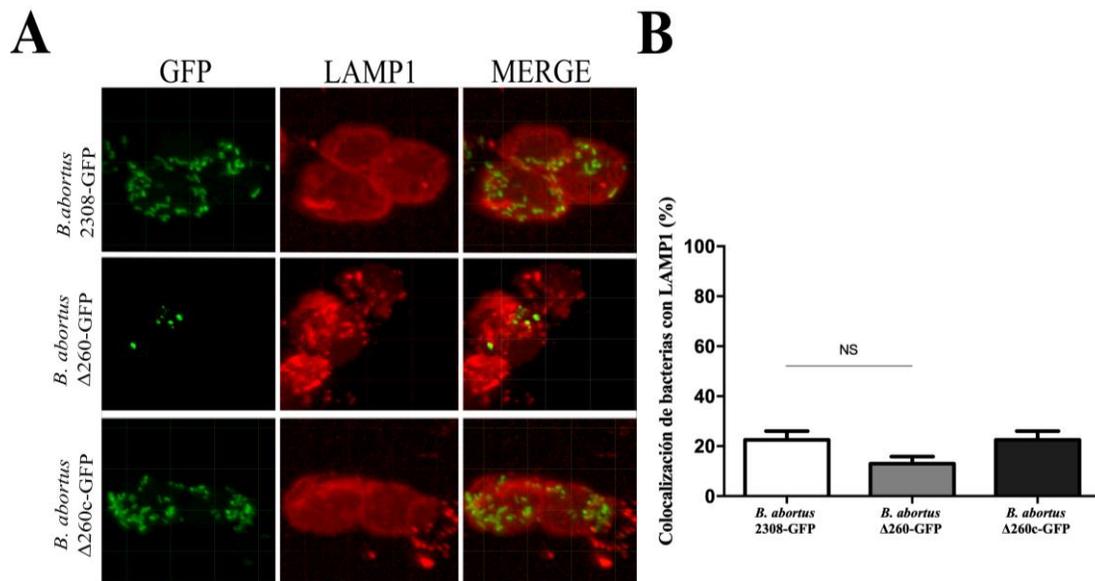


Figura 5. Colocalización de cepas de *B. abortus* con endosomas tardíos de macrófagos. A) Imagen confocal representativa que muestra la colocalización de cepas *B. abortus* 2308-GFP, *B. abortus* Δ260-GFP y *B. abortus* Δ260c-GFP con LAMP1. B). Porcentaje de bacterias colocalizadas con LAMP1. Los datos representan la media más la desviación estándar de dos experimentos independientes.

Colocalización de cepas *B. abortus* Δ 0260-GFP con retículo endoplasmático en macrófagos RAW 264.7

La presencia de las cepas bacterianas en el retículo endoplasmático se evaluó al ubicar conjuntamente estas cepas con la proteína calnexina. Los análisis de imágenes mostraron que *B. abortus* 2308-GFP colocaliza con la proteína calnexina a las 12 h. ($79,5 \pm 6,36$ %), sin embargo, se observó una fuerte disminución de las bacterias mutantes interaccionando con el retículo endoplasmático ($8,5 \pm 4,96$ %). (**Fig. 6**). Por otro lado, la cepa completada *B. abortus* Δ 260c mostró resultados similares a la cepa silvestre ($75 \pm 7,1$ %). Estos resultados indican que la ausencia del ORF BAB1_0260 afecta el establecimiento de un nicho replicativo competente para la proliferación.

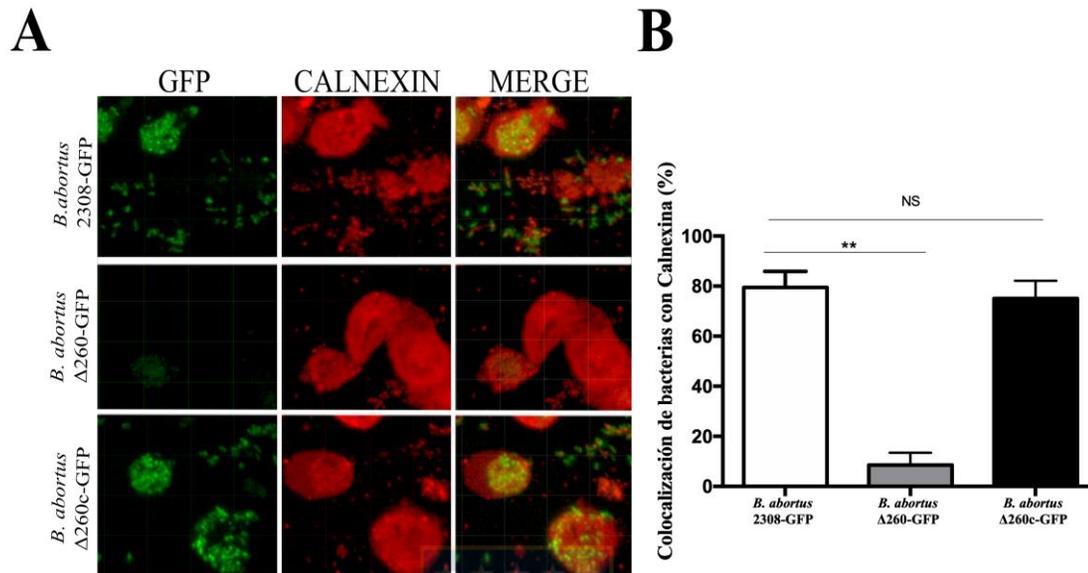


Figura 6. Colocalización de cepas de *B. abortus* con retículo endoplasmático de macrófagos. A) Imagen confocal representativa que muestra la colocalización de cepas *B. abortus* 2308-GFP, *B. abortus* Δ260-GFP y *B. abortus* Δ260c-GFP con calnexina. B) Porcentaje de bacterias colocalizadas con calnexina. Los datos representan la media más la desviación estándar de dos experimentos independientes. Diferencias significativas: ** $P < 0.01$.

DISCUSIÓN

B. abortus es el agente causal de brucelosis bovina, una enfermedad infectocontagiosa que afecta a animales y humanos. Esta bacteria se caracteriza por ser un patógeno intracelular facultativo, capaz de sobrevivir y replicar dentro de diversas clases de células, incluyendo trofoblastos placentarios, macrófagos y células dendríticas (Roop y col., 2009). Se ha descrito que la capacidad de *Brucella* para persistir y replicar al interior de diversas células estaría mediada, en parte, por productos génicos codificados en diversas islas genómicas (Ortiz-Román y col., 2014). Uno de estos productos genómicos es el ORF BAB1_0260, el cual se encuentra presente en la isla genómica 3, y que codifica para la proteína FlgJ (Li y col., 2012). Esta proteína es una hidrolasa del peptidoglican, que ayuda a la formación del flagelo (Hirano y col., 2001).

Brucella abortus es descrita como una bacteria no móvil, pese a tener todos los genes para la formación del flagelo, no obstante, se ha observado que *Brucella melitensis* es capaz de formar flagelo bajo condiciones de infección específicas, siendo necesario para establecer una infección crónica en modelo

murino (Fretin y col., 2005). Diversos estudios indican que la expresión transcripcional de la proteína flagelar está relacionada y regulada por el sistema regulador de dos componentes BvrR / BvrS celular (Viadas y col., 2010), un factor de virulencia importante para esta especie, involucrado en mecanismos de adhesión, invasión y la replicación intracelular (López-Goñi y col., 2002). Considerando que el flagelo puede estar implicado en diferentes funciones, ya sea motilidad, adherencia, invasión intracelular, e incluso en la exportación de proteínas, es necesario estudiar el rol del ORF BAB1_0260 en la interacción hospedero-patógeno, enfocándose en la adhesión, internalización y tráfico intracelular bacteriano.

La capacidad de un microorganismo de colonizar y replicar en un tejido específico es un prerequisite para establecer una enfermedad infecciosa. La internalización a células de mamíferos es una estrategia común utilizada por muchas bacterias patógenas, ya que les permite colonizar (Finlay y Cossart.1997). Los patógenos intracelulares deben primero adherirse a la superficie celular, y mantener esa asociación con la célula huésped. Para adherirse, las bacterias patógenas expresan moléculas asociadas a la superficie llamadas adhesinas, las que en muchos casos reconocen

directamente proteínas de la superficie del hospedero (Dersch, 2003). En cambio, otras adhesinas se adhieren de modo indirecto a la célula hospedera al unirse a productos de secreción de ésta u otra célula, como por ejemplo, proteínas de la matriz extracelular. Debido a que *Brucella* es capaz de invadir distintos tipos celulares y tejidos, se ha sugerido que la bacteria es capaz de expresar moléculas de superficie (adhesinas) capaces de reconocer receptores generales, así como también receptores específicos de determinados tejidos (Hernandez-Castro y col. 2008). El flagelo ha sido reconocido típicamente como un órgano de movilidad, aunque se ha demostrado que presenta diversas funciones biológicas, una de ellas es la de adhesión (Haiko y Westerlund-Wikström, 2013). Por ejemplo, en *E. Coli*, algunas proteínas que forman parte del flagelo actúan como adhesinas ayudando a la adhesión bacteriana (Girón y col., 2013). Pese a esto, en este estudio no se observó diferencia en la adhesión bacteriana a macrófagos Raw 264.7 cuando el ORF BAB1_0260 estaba mutado. Lo anterior implicaría que, pese a que algunas proteínas que forman parte del flagelo pueden cumplir funciones de adhesión, en *B. abortus*, la proteína FlgJ no estaría involucrada en estos procesos.

Otra etapa esencial en el mecanismo de entrada de *B. abortus* en células fagocíticas es la polimerización de los filamentos de actina. El contacto entre *B. abortus* y los macrófagos inducen el reclutamiento local transitorio de estos filamentos (Guzman-Verri y col., 2001). Para evaluar el rol del ORF BAB1_0260 de *B. abortus* en la invasión a patógenos, se determinó el grado de polimerización de los filamentos de actina de los macrófagos RAW 264.7 y posteriormente, se cuantificó el número de bacterias internalizadas a distintos tiempos.

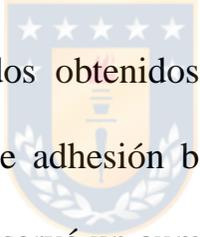
A los 30 min pi, mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo, se observó un aumento en el grado de polimerización de actina por parte de los macrófagos infectados con la cepa mutante, sin embargo, el número de bacterias al interior de las células fagocíticas fue menor. Este aumento en el grado de polimerización observado en macrófagos infectados con la cepa mutante, sugiere que la delección del ORF BAB1_0260 no afecta a los reguladores del citoesqueleto que activan la nucleación de los filamentos de actina que generan la polimerización de ésta, pero si estaría afectando la entrada de la bacteria a las células fagocíticas.

Con respecto al tráfico intracelular, los resultados mostraron que la supresión de BAB1_0260 no afecta el tráfico intracelular en las etapas iniciales de vía endosomal, caracterizado por la presencia de las proteínas EEA1, marcador adquirido por la “Vacuola contenedora de *Brucella*” (BCV) de manera transitoria. Una vez que *B. abortus* interacciona con endosomas tardíos, se genera una acidificación de la BCV, además de la adquisición de enzimas proteolíticas y de la transcripción de varios factores de virulencia, incluido el SST4 codificado en el operón virB. Este sistema está involucrado en la secreción de factores de virulencia y en la maduración del BCV, que finalmente determina la supervivencia intracelular de *Brucella* (Gorvel y Moreno, 2002). De acuerdo a los resultados obtenidos, el ORF BAB1_0260 no estaría implicado en la resistencia a la pH ácidos ni en la acción de enzimas proteolíticas presentes en la BVC a los 15 min pi, no viéndose afectado el tráfico intracelular tardío de *B. abortus*.

Luego de analizar el tráfico temprano y tardío, se determinó la colocalización de la cepa mutante con el retículo endoplásmico, lugar donde se establece y crea un nicho replicativo. Al realizar el análisis de colocalización con retículo endoplasmático a las 12 h pi, se observó que la cepa mutante no logró persistir

dentro de la célula fagocítica, lo que sugiere que el ORF BAB1_0260 juega un papel importante la formación de un nicho replicativo competente, en la sobrevivencia intracelular, y por ende, en la cronicidad de la enfermedad. Finalmente, se debe tener en cuenta que se requieren estudios adicionales para establecer los mecanismos regulatorios de este ORF de *B. abortus*.

CONCLUSIÓN



De acuerdo a los resultados obtenidos, el ORF BAB1_0260 no estaría implicado en el proceso de adhesión bacteriana hacia células fagocíticas profesionales. Si bien se observó un aumento en la polimerización de actina en macrófagos infectados con la cepa mutante, el número de bacterias dentro de las células fagocíticas fue menor, demostrando que la delección del ORF BAB1_0260 sólo afecta la internalización de *B. abortus*. Además, se observó que la supresión de este ORF estaría afectando la formación del nicho replicativo y la sobrevivencia intracelular del patógeno al interior del hospedero.

REFERENCIAS

Al-Mariri A., Tibor A., Mertens P., De Bolle X., Michel P., Godfroid J., Walravens K., y Letesson J. (2001) Induction of immune response in BALB/c mice with a DNA vaccine encoding bacterioferritin or P39 of *Brucella* spp. *Infection and Immunity* 69, 6264-70.

Arellano-Reynoso B., Lapaque N., Salcedo S., Briones G., Ciocchini A.E., Ugalde R., Moreno E., Moriyón I., Gorvel J.-P. (2005). Cyclic β -1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol.* 6(6): 618-625.

Atluri V., Xavier M., deJong M., den Hartigh A., Tsolis R. (2011) Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts. *Annu Rev Microbiol* 65, 523–541.

Cassataro J., Velikovsky C., de la Barrera S., Estein S., Bruno L., Bowden R., Pasquevich R., Fossati C., Giambartolomei G. (2005) A DNA vaccine coding for the *Brucella* outer membrane protein 31 confers protection against *B. melitensis* and *B. ovis* infection by eliciting a specific cytotoxic response. *Infection and Immunity* 73, 6537-46.

Cheville N., Stevens M., Jensen A., Tatum F., Halling S. (1993) Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. *American journal of veterinary research* 54, 1591-1597.

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

Celli J. y Gorvel J. (2004) Organelle robbery: Brucella interactions with the endoplasmic reticulum. *Current Opinion in Microbiology* 7, 93–9.

Céspedes S., Salgado P., Retamal A., Vidal R. y Oñate A. (2011) Roles of genomic island 3 (GI-3) BAB1_0278 and BAB1_0263 open reading frames (ORFs) in the virulence of Brucella abortus in BALB/c mice. *Veterinary Microbiology* 156, 1-7.

Comerci D., Martinez-Lorenzo M., Sieira R., Gorvel J., Ugalde R. (2001) Essential role of the VirB machinery in the maturation of the Brucella abortus-containing vacuole. *Cell Microbiol* 3, 159-168.

Corbel M. (1997) Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect Dis* 3, 213-221.

Dersch P. (2003) Host Response Mechanisms in Infectious Diseases, ed. H. H. Vol. 10. 183- 209.

Desjardins M., Huber L., Parton R. y Griffiths G. (1994) Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol* 124, 677–688.

Dobrindt U., Hochhut B., Hentschel U. y Hacker J. (2004) Genomic island in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Rev Microbiol* 2, 414-424.

Enright F. M. (1990). The pathogenesis and pathobiology of Brucella infection in domestic animals, p. 301-320. In K. Nielsen and J. R. Duncan (ed.), *Animal brucellosis*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

Foster G., Osterman B., Godfroid J., Jacques I. y Cloeckaert A. (2007) *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microl* 57, 2688-2693.

Fretin D., Fauconnier A., Köhler S., Halling S., Léonard S., Nijskens C., et al. (2005). The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cell. Microbiol.* 7, 687–698. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00502.x

Finlay B. y P Cossart. (1997) Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science.* 276(5313): p. 718-25.

García Z. (2007). Factores de riesgo para Brucelosis como enfermedad ocupacional. Trabajo de grado para optar por el título de especialista en salud ocupacional, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de enfermería y Facultad de medicina.

Girón J., Torres A., Freer E., y Kaper B. (2002). The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Molecular microbiology*, 44(2), 361–379. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02899.x>

Gobierno de Chile. Ministerio de Agricultura. Servicio Agrícola y Ganadero. Subdepartamento de Vigilancia Epidemiológica. División de Protección Pecuaria. Etapas y Resultados de los Proyectos de Control y Erradicación de Brucelosis Bovina, 1975-2006. pp 11.

Godfroid J., Scholz H., Barbier T., Nicolas C., Wattiau P., Fretin D. (2011) Brucellosis at the animal /ecosystem /human interface at the beginning of the 21 st century. *Prev Vet Med* 102, 118–131.

Gomez G., Adams L., Rice-Ficht A., Ficht T. (2013). Host-Brucella interactions and the Brucella genome as tools for subunit antigen discovery and immunization against brucellosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3, 1-15.

Gorvel J. y Moreno E. (2002). Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol* 90, 281–297.

Guzmán-Verri C., Chaves-Olarte E., von Eichel-Streiber C. (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. doi:10.1074/jbc.M105606200

Haag A., Myka K., Arnold M., Caro-Hernandez P. y Ferguson G. (2010). Importance of Lipopolysaccharide and Cyclic beta-1,2-Glucans in Brucella Mammalian Infections. *Int J Microbiol* 124509. doi: 10.1155/2010/124509

Haiko, J. y Westerlund-Wikström B. (2013). The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology*, 2(4), 1242–1267. <https://doi.org/10.3390/biology2041242>

Hartigan P. (1997). Human brucellosis: epidemiology and clinical manifestations. *Irish Vet J* 50, 179-80.

Hernández-Castro R., Verdugo-Rodríguez A., Puente JL., Suárez-Güemes F. (2008). The BMEI0216 gene of Brucella melitensis is required for

internalization in HeLa cells. *Microb Pathog* 44(1):28-33.
doi:10.1016/j.micpath.2007.08.008

Hirano, T., Minamino, T., Macnab, R. (2001). The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of Salmonella FlgJ, a flagellum specific muramidase. *J Mol Biol.* 312, 359-369.

Ivory C. y Chadee K. (2004) DNA vaccines: designing strategies against parasitic infections. *Genetic Vaccines and Therapy*, 2:17 doi:10.1186/1479-0556-2-17.

Kutzler M. y Weiner D. (2008) DNA vaccines: ready for prime time. *Nature reviews* 9, 776-788.

Lei S., Zhong Z., Ke Y., Yang M., Xu X., Ren H., Chen Z. (2015). Deletion of the Small RNA Chaperone Protein Hfq down Regulates Genes Related to Virulence and Confers Protection against Wild-Type Brucella Challenge in Mice. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1570.
<http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01570>

Li X., Xu J., Xie Y., et al. (2012). Vaccination with recombinant flagellar proteins FlgJ and FliN induce protection against Brucella abortus 544 infection in BALB/c mice. *Vet Microbiol.* 161(1-2), 137-44.

Llosa M., Roy C. y Dehio C. (2009) Bacterial type IV secretion systems in human disease. *Mol Microbiol* 73, 141–151.

López-Goñi I., Guzmán-Verri C., Manterola L., Sola-Landa A., Moriyón I., Moreno E. (2002) Regulation of Brucella virulence by the two-component

system BvrR/BvrS. *Vet Microbiol.*;90(1-4):329-339. doi:10.1016/s0378-1135(02)00218-3

Moreno E. (2002). Brucellosis in Central America. *Vet Microbiol.* 90(1): 31-38.

Martínez P. (2013) Brucelosis humana: situación epidemiológica en Chile, 2001- 2010 *Rev Chilena Infectol* 30(6):653-659.

Nathan C., Gabay J. (1992) Antimicrobial mechanisms of macrophages, p. 259–267. In R. van Furth (ed.), *Mononuclear phagocytes: biology of monocytes and macrophages*. Kluwer Academic Publishers, Boston, Mass.

Neefjes J., Jongsma M., Paul P. y Bakke O. (2011). Towards a Systems Understanding of MHC Class I and MHC Class II Antigen Presentation. *Nature Reviews* 11, 823-836.

Oliveira S., Soeurt N. y Splitter G. (2002) Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. *Vet Microbiol* 90, 417–24.

Oliveira S., Zhu Y. y Splitter G. (1994). Recombinant L7/L12 ribosomal protein and gamma-irradiated *Brucella abortus* induce a T-helper 1 subset response from murine CD4+ T cells. *Immunology* 83, 659-64.

Oñate A. y Folch H. (1995) Proteína de 18.5 kDa: un antígeno interesante en *Brucella*. *Archivos de Medicina Veterinaria* 27, 93-102.

Oñate A., Céspedes S., Cabrera A., Rivers R., González A., Muñoz C., Folch H., y Andrews E. (2003) A DNA vaccine encoding Cu,Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infection and Immunity* 71, 4857-61.

Ortiz-Román L., Riquelme-Neira R., Vidal R. y Oñate A. (2014) Roles of Genomic Island 3 (GI-3) BAB1_0267 and BAB1_0270 open reading frames (ORFs) in the Virulence of *Brucella abortus* 2308. *Vet Microbiol.*

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

Parent M., Goenka R., Murphy E., Levier K., Carreiro N., Golding B., (2007). *Brucella abortus* bacA mutant induces greater pro-inflammatory cytokines than the wild-type parent strain. *Microbes Infect* 9, 55–62.

Pei J., Turse J. y Ficht T. (2008) Evidence of *Brucella abortus* OPS dictating uptake and restricting NF-kappa B activation in murine macrophages. *Microbes Infect* 10, 582–590.

Pizarro-Cerdá J., Desjardins M., Moreno E., y Gorvel J-P. (1997). When intracellular pathogens invade the frontiers of cell biology and immunology. *Histol. Histopathol.* 12:1027- 1038.

Porte F., Naroeni A., Ouahrani-Bettache S. y Liautard J. (2003). Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect Immun* 71, 1481–1490.

Rabinowitz S., Horstmann H., Gordon S. y Griffiths G. (1992) Immunocytochemical characterization of the endocytic and phagolysosomal compartments in peritoneal macrophages. *J Cell Biol* 116, 95–112.

Rajashekara G., Glasner J., Glover D. y Splitter G. (2004). Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. *J Bacteriol* 186, 5040–5051.

Rajashekara G., Covert J., Petersen E., Eskra L. y Splitter G. (2008) Genomic island 2 of *Brucella melitensis* is a major virulence determinant: functional analyses of genomic islands. *Journal of Bacteriology* 190, 6243-6252.

Riquelme-Neira R., Retamal-Díaz A., Acuña F., Riquelme P., Rivera A., Sáez D. y Oñate A. (2013) Protective effect of a DNA vaccine containing an open reading frame with homology to an ABC-type transporter present in the genomic island 3 of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Vaccine* 31, 3663–3667.

Rivera S., Ramirez M. y Lopetegui I. (2002) Eradication of bovine brucellosis in the 10th Region de Los Lagos, Chile. *Veterinary Microbiology* 90, 45-53.

Roop R., Bellaire B., Valderas M. y Cardelli J. (2004) Adaptation of the brucellae to their intracellular niche. *Mol Microbiol* 52, 621–630.

Roop, R., Gaines, J., Anderson, E., et al. (2009). Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med Microbiol Immun.* 198(4), 1-28.

Roy C., Salcedo S. y Gorvel J. (2006) Pathogen–endoplasmic-reticulum interactions: in through the out door. *Nature reviews immunology* 6, 136-147.

Saitz W. (2012) Rol de los potenciales marcos de lectura abierta (ORFs) BruAb1_0255 y BruAb1_0272 en virulencia de *Brucella abortus* 2308. Tesis de pregrado para optar al título profesional de Bioingeniero, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción, Chile.

Salcedo S., Marchesini M., Lelouard H., Fugier E. (2008) *Brucella* Control of Dendritic Cell Maturation Is Dependent on the TIR-Containing Protein Btp1. *PLoS Pathog* 4, 1-16.

Salcedo S., Marchesini M., Degos C., Terwagne M., Von Bargen K., Lepidi H., Herrmann C., Santos T., Imbert P., Pierre P., Alexopoulou L., Letesson J., Comerci D. y Gorvel J. (2013) BtpB, a novel *Brucella* TIR-containing effector protein with immune modulatory functions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3 (28), 1-13.

Sangari F., Garcia-Lobo J. y Agüero J. (1994) The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. *FEMS Microbiology Letters* 121, 337-342.

Scholz H., Nockler K., Gollner C., Bahn P., Vergnaud G., Tomaso H., Al Dahouk S., Kampfer P., Cloeckert A., Maquart M. (2010) *Brucella inopinata* sp nov, isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 801–808.

Schurig G. y Roop I. (1991) Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Veterinary Microbiology* 28, 171-188.

Schurig G., Sriranganathan N. y Corbel J. (2002) Brucellosis vaccines: past, present and future. *Veterinary Microbiology* 90, 479-96.

Scian R., Barrionuevo P., Rodriguez A., Arriola P., Samartino C., Fossati C., Giambartolomei G. y Delpinoa M. (2013) *Brucella abortus* Invasion of Synoviocytes Inhibits Apoptosis and Induces Bone Resorption through RANKL Expression. *Infection and Immunity* 81, 1940–1951.

Schiffner T., Sattentau Q. y Dorrell L. (2013) Development of prophylactic vaccines against HIV-1. *Retrovirology*, 10:72.

Seleem M., Boyle S. y Sriranganathan N. (2010) Brucellosis: A re-emerging zoonosis. *Vet Microbiol* 140, 392-8.

Singh BB., Dhand NK., Gill JP. (2015) Economic losses occurring due to brucellosis in Indian livestock populations. *Prev Vet Med.* 2015;119(3-4):211-215. doi: 10.1016/j.prevetmed.2015.03.013

Sislema-Egas F., Céspedes S., Fernández P., Retamal-Díaz A., Sáez D. y Oñate A. (2012) Evaluation of protective effect of DNA vaccines encoding the BAB1_0263 and BAB1_0278 open reading frames of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Vaccine* 30, 7286-91.

Skendros P. y Boura P. (2013) Immunity to brucellosis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 32 (1), 137-147.

Smith L. y Ficht T. (1990) Pathogenesis of *Brucella*. *Crit Rev Microbiol* 17, 209–230.

Tiller R., Gee J., Lonsway D., Gribble S., Bell S., Jennison A., Bates J., Coulter C., Hoffmaster A. y De BK. (2010) Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52-year-old patient with chronic destructive pneumonia. *BMC Microbiol* 10: 23.

Viadas C., Rodriguez M., Sangari F., Gorvel J., Garcia-Lobo J. y Lopez-Goni I. (2010). Transcriptome analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS two-component regulatory system. *PLoS ONE* 5, 1-8.

Von Bargen K., Gorvel J. y Salcedo S. (2012). Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular life style. *FEMS Microbiol Rev* 36, 533–562.

Watarai M., Makino S., Fujii Y., Okamoto K. y Shirahata T. (2002) Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cellular Microbiology* 4(6), 341–355.

Whatmore A., Murphy T., Shankster S., Young E., Cutler S. y Macmillan A. (2005). Use of amplified fragment length polymorphism to identify and type *Brucella* isolates of medical and veterinary interest. *J Clin Microbiol* 43, 761-769.

Young E. J., Borchert M., Kreutzer F. L., y Musher D. M. (1985). Phagocytosis and killing of *Brucella* by human polymorphonuclear leukocytes. *J. Inf. Dis.* 151:682-690.

