



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Doctorado en Ciencias Mención
Microbiología

**Contribución de una metaloproteinasasa dependiente de zinc en la
virulencia y adaptación intracelular de *Brucella abortus* en
macrófagos**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Mención
Microbiología

LEONARDO ANTONIO GÓMEZ ROA
CONCEPCIÓN-CHILE
2020

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.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dr. Ángel Oñate Contreras

Profesor Guía de Tesis

Facultad de Ciencias Biológicas

Dra. María Inés Barría

Facultad de Ciencias Biológicas



Dra. Estefanía Nova Lamperti

Facultad de Farmacia

Dra. María Rosa Bono

Profesor Evaluador Externo

Universidad de Chile

Dr. Víctor Campos A.

Director

Programa Doctorado en Ciencias, Mención
Microbiología

Agradecimientos

A mi profesor guía, Dr. Ángel Oñate C., por permitirme desarrollar mi programa de Doctorado en su Laboratorio, por confiar en mí y apoyar mis ideas durante el tiempo que he estado en su Laboratorio.

A los profesores del Departamento de Microbiología por contribuir en mi formación académica.

A mis compañeros del Laboratorio de Inmunología Molecular por ser parte de este trabajo de investigación.

A Conicyt, por financiar esta Tesis a través del proyecto 1180122 del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT) y por financiar mi programa de Doctorado a través de una Beca Doctorado Nacional 21161435

Al Dr. Ulrich von Andrian por permitirme realizar una pasantía doctoral en su Laboratorio en el Departamento de Inmunología en Harvard Medical School (Harvard University, USA), y al Dr. Rodrigo J. Gonzalez (Harvard Medical School, Harvard University, USA) por compartir sus conocimientos en Microscopia de dos fotones y Citometría de Flujo.

A mi familia, Constanza y a mis salchis por su apoyo incondicional.

Índice de contenidos

RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. PATOGÉNESIS POR <i>BRUCELLA ABORTUS</i>	15
1.2. ESTILO DE VIDA INTRACELULAR DE <i>B. ABORTUS</i> EN MACRÓFAGOS	17
1.3. ESTABLECIMIENTO INTRACELULAR Y EVASIÓN INMUNE POR <i>B. ABORTUS</i>	21
1.4. GENES DE LA ISLA GENÓMICA 3 (IG-3) EN LA VIRULENCIA DE <i>B. ABORTUS</i>	22
1.5. APLICACIÓN DE LA IG-3 EN EL DISEÑO DE VACUNAS CONTRA <i>B. ABORTUS</i>	28
1.6. ROLES DEL ORF BAB1_0270 EN LA VIRULENCIA DE <i>B. ABORTUS</i>	31
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	34
3. OBJETIVO GENERAL	35
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
4.1. CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	36
4.2. LÍNEA CELULAR Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	38
4.3. OBJETIVO 1. CARACTERIZAR UNA METALOPROTEINASA DEPENDIENTE DE ZINC (ZnMP) CODIFICADA EN EL ORF BAB1_0270 DE <i>B. ABORTUS</i>	39
4.3.1. Análisis <i>In silico</i> de la proteína ZnMP.....	39
4.3.2. Expresión y purificación de ZnMP en <i>E. coli</i>	40
4.3.3. Caracterización genómica de la proteína ZnMP.....	41
4.4. OBJETIVO 2. DETERMINAR LA IMPORTANCIA DE LA PROTEÍNA ZnMP EN LA SOBREVIVENCIA DE <i>B. ABORTUS</i> BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS ÁCIDO Y OXIDATIVO.	43
4.4.1. Rol de la ZnMP en la adaptación de <i>B. abortus</i> al estrés ácido y oxidativo.	43
4.4.2. Expresión génica de las cepas de <i>B. abortus</i> bajo estrés ácido y oxidativo.	44
4.5. OBJETIVO 3. EVALUAR EL ROL DE ESTA ZnMP EN LA ADAPTACIÓN INTRACELULAR DE <i>B. ABORTUS</i> EN MACRÓFAGOS.....	47
4.5.1. Ensayos de adhesión de <i>B. abortus</i> a macrófagos RAW264.7.	47
4.5.2. Ensayos de tráfico intracelular de <i>B. abortus</i> en macrófagos RAW264.7.	48
4.5.3. Ensayos de sobrevivencia intracelular de <i>B. abortus</i> en macrófagos RAW264.7.	49
4.5.4. Expresión génica de <i>B. abortus</i> desde macrófagos RAW264.7 infectados por RT-qPCR.	50
4.6. OBJETIVO 4. EVALUAR EL ROL DE ESTA ZnMP EN LA VIRULENCIA DE <i>B. ABORTUS</i> EN LA ACTIVACIÓN O SUPRESIÓN DE MACRÓFAGOS INFECTADOS.....	51
4.6.1. Producción de citoquinas por macrófagos infectados con las cepas de <i>B. abortus</i>	51
4.6.2. Expresión de proteínas co-estimuladoras en macrófagos infectados con cepas de <i>B. abortus</i>	52
4.6.2. Expresión de proteínas inmunoreguladoras en macrófagos infectados con cepas de <i>B. abortus</i>	53
4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	54
5. RESULTADOS.....	55
5.1. OBJETIVO 1. CARACTERIZAR UNA METALOPROTEINASA DEPENDIENTE DE ZINC (ZnMP) CODIFICADA EN EL ORF BAB1_0270 DE <i>B. ABORTUS</i>	55
5.1.1. Parámetros fisicoquímicos y modelamiento de la proteína ZnMP.	55
5.1.2. Expresión y purificación de la proteína ZnMP.	56
5.1.3. Caracterización genómica del ORF BAB1_0270 en <i>B. abortus</i>	58
5.2. OBJETIVO 2. DETERMINAR LA IMPORTANCIA DE LA PROTEÍNA ZnMP EN LA SOBREVIVENCIA DE <i>B. ABORTUS</i> BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS ÁCIDO Y OXIDATIVO.	61
5.2.1. Crecimiento de <i>B. abortus</i> Δ 270 bajo condiciones de estrés ácido.	61

5.2.2. Expresión relativa de genes de <i>B. abortus</i> Δ270 bajo condiciones de estrés ácido.	62
5.2.3. Resistencia de <i>B. abortus</i> Δ270 bajo condiciones de estrés oxidativo.....	64
5.2.4. Expresión relativa de genes de <i>B. abortus</i> Δ270 bajo condiciones de estrés oxidativo.	66
5.3. OBJETIVO 3. EVALUAR EL ROL DE ESTA ZNMP EN LA ADAPTACIÓN INTRACELULAR DE <i>B. ABORTUS</i> EN MACRÓFAGOS.....	68
5.3.1. Adhesión y tráfico intracelular de <i>B. abortus</i> Δ270 en macrófagos RAW 264.7.....	68
5.3.3. Expresión génica de <i>B. abortus</i> Δ270 durante la infección de macrófagos RAW264.7.	73
5.4. OBJETIVO 4. EVALUAR EL ROL DE ESTA ZNMP EN LA VIRULENCIA DE <i>B. ABORTUS</i> EN LA ACTIVACIÓN O SUPRESIÓN DE MACRÓFAGOS INFECTADOS.....	75
5.4.1. Respuesta de macrófagos infectados con <i>B. abortus</i> Δ270.....	75
5.4.2. Rol de hemooxigenasa 1 (HO-1) en la respuesta de macrófagos infectados con <i>B. abortus</i> Δ270.	79
6. DISCUSIÓN.....	81
6.1. Rol de ZnMP en la resistencia de <i>B. abortus</i> al estrés ácido y oxidativo.....	82
6.2. ZnMP: un nuevo de factor de virulencia requerido por <i>B. abortus</i> en su adaptación endosomal de macrófagos.....	86
6.3. Respuesta de macrófagos RAW264.7 infectados con <i>B. abortus</i> Δ270	89
6.4. Reflexiones finales acerca del rol de ZnMP en la virulencia de <i>B. abortus</i>	91
7. CONCLUSIONES.....	93
8. REFERENCIAS	95



Indice de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida intracelular de <i>B. abortus</i> en macrófagos.....	20
Figura 2. Organización genética de los marcos de lectura abiertos (ORFs) presentes en la isla genómica 3 de <i>B. abortus</i> 2308.	23
Figura 3. Modelo de la estructura de una vacuna de ADN basada en plásmidos codificantes de proteínas de fusión.	30
Figura 4. Modelamiento de la ZnMP codificada en el ORF BAB1_0270 de <i>B. abortus</i>	56
Figura 5. Expresión y Purificación de ZnMP codificado en el ORF BAB1_0270 de <i>B. abortus</i> 2308.....	57
Figura 6. Operón formado por ZnMP y un regulador transcripcional-Xre en <i>B. abortus</i>	59
Figura 7. Modelo hipotético de un sistema toxina-antitoxina tipo II constituido por la proteína ZnMP y el regulador transcripcional Xre.....	60
Figura 8. Crecimiento de <i>B. abortus</i> Δ 270 bajo condiciones de estrés ácido.	62
Figura 9. Expresión génica en <i>B. abortus</i> cultivadas bajo condiciones de estrés ácido.	63
Figura 10. Rol de la ZnMP en el crecimiento de <i>B. abortus</i> Δ 270 bajo condiciones de estrés oxidativo.....	65
Figura 11. Expresión relativa de los genes involucrados en la resistencia a peróxidos.....	67
Figura 12. Adhesión de <i>B. abortus</i> Δ 270 a macrófagos RAW264.7.....	69
Figura 13. Tráfico intracelular de cepas <i>B. abortus</i> en macrófagos RAW267.4.	70
Figura 14. Sobrevivencia intracelular de <i>B. abortus</i> en macrófagos.	72
Figura 15. Expresión génica de las cepas de <i>B. abortus</i> durante la infección de macrófagos.....	74
Figura 16. Producción de citoquinas en macrófagos infectados con <i>B. abortus</i>	77
Figura 17. Expresión de proteínas co-estimuladoras en macrófagos infectados con <i>B. abortus</i>	78
Figura 18. Expresión de HO-1 en macrófagos infectados con <i>B. abortus</i>	80
Figura 19. Respuesta de macrófagos (M Φ) durante el proceso de infección por <i>B. abortus</i>	80
Figura 20. Función hipotéticas ejercida por la proteína ZnMP en <i>B. abortus</i>	88

Indice de Tablas

Tabla 1. Especies y hospederos específicos descritos para el género <i>Brucella</i>	13
Tabla 2. Marcos de lectura abiertos codificados en la isla genómica 3 de <i>B. abortus</i> 2308.	26
Tabla 3. Cepas bacterianas, plásmidos y partidores usados en el desarrollo de las cepas mutantes .	37
Tabla 4. Partidores usados en la identificación del operón.....	42
Tabla 5. Partidores utilizados para cuantificar la expresión relativa de genes expresados por <i>B. abortus</i>	45
Tabla 6. Partidores utilizados para cuantificar la expresión relativa de genes expresados por <i>B. abortus</i> durante estrés oxidativo.....	46
Tabla 7. Partidores para el gen <i>hmox1</i> codificante de la enzima HO-1 en macrófagos.....	54



Resumen

La brucelosis es una zoonosis de distribución global que afecta a bovinos y humanos. El agente etiológico es *Brucella abortus*, una bacteria de vida intracelular que infecta a diversos tipos de células, incluyendo a los macrófagos. En su interior, esta bacteria desarrolla una vacuola contenedora de *Brucella* (BCV) que interactúa con endosomas tempranos, tardíos y lisosomas, exponiendo a *B. abortus* a un ambiente altamente microbicida. Bajo estas condiciones son activados los factores BvrR/BvrS, VjbR y HutC, los cuales regulan la expresión del sistema de secreción tipo IV (SST4) VirB y de diversas proteínas efectoras. Estos factores de virulencia son claves en la sobrevivencia intracelular y el control de las células hospederas por *B. abortus*. Marcos de lectura abiertos (ORFs) de la isla genómica 3 (IG-3) de *B. abortus* participan en estos procesos, siendo el ORF BAB1_0270, codificante de una metaloproteinasas dependiente de Zinc (ZnMP), requerido en la sobrevivencia intracelular de *B. abortus* 2308 y en la colonización del bazo de ratones BALB/c. Debido que esta ZnMP posee homología con la proteasa IrrE, un regulador global de *Deinococcus* que promueve su sobrevivencia frente a las condiciones de estrés ambiental, fue hipotetizado que esta ZnMP cumpliría una función similar durante la adaptación de *B. abortus* a los mecanismos microbicidas de macrófagos RAW264.7. Los resultados mostraron que esta ZnMP es un antígeno citoplasmático con un peso molecular de aproximadamente 22.5 kDa, la cual forma un operón con un regulador transcripcional de la familia Xre. Funcionalmente, su delección redujo la capacidad de *B. abortus* Δ 270 para adaptarse y crecer bajo condiciones de estrés ácido (pH 5.5) y oxidativo (peróxido de hidrógeno), un ambiente donde diversos genes involucrados en la virulencia y en la adaptación intracelular fueron reprimidos. Durante el proceso de infección, la delección de esta ZnMP promovió la co-localización de *B. abortus* Δ 270 con catepsina D fagolisosomal, mientras que redujo su capacidad para alcanzar el retículo endoplásmico (RE). En este ambiente intracelular, diversos genes de *B. abortus* Δ 270 involucrados en su virulencia (*vjbR*, *hutC*, *bvrR*, *virB1*) fueron sobreexpresados, sin embargo, no fue incrementada su replicación intracelular en niveles similares a la cepa *B. abortus* 2308. Finalmente, su delección atenuó significativamente la virulencia de *B. abortus* Δ 270, ya que macrófagos infectados mostraron un fenotipo M1 caracterizado por la producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6 y TNF- α) y proteínas co-estimuladoras (CD80 y CD86), señales requeridas en la activación de las células T protectoras contra este patógeno. En un

proceso independiente a los roles ejercidos por esta ZnMP, macrófagos infectados con ambas cepas expresaron niveles significativos de hemo-oxigenasa-1 (HO-1), una enzima con actividad anti-inflamatoria y antioxidante que puede estar involucrada en la sobrevivencia intracelular de este patógeno. Por lo tanto, los resultados demuestran que ZnMP participa en la resistencia de *B. abortus* al estrés ácido y oxidativo, lo cual estaría directamente relacionados en su adaptación al ambiente endosomal donde su delección reduciría su capacidad para escapar desde los fagolisosomas y alcanzar el RE. En base a la evidencia, se discute el rol de esta ZnMP como un regulador de la virulencia de *B. abortus* y se concluye que esta metaloproteinasa dependiente de Zinc codificada en la IG-3 es un nuevo factor de virulencia requerido en la adaptación a los mecanismos microbicidas intracelulares y en la virulencia de *B. abortus* durante la infección de macrófagos.



Abstract

Brucellosis is a globally distributed zoonosis affecting bovines and humans. Its etiological agent is *Brucella abortus*, an intracellular bacterium capable to infect various types of cells, including macrophages. Once inside cells, this bacterium develops a *Brucella* containing vacuole (BCV) which interact with early and late endosomes and lysosomes, subjecting *B. abortus* to a highly microbicidal environment. Nevertheless, these conditions activates transcriptional factors BvrR/BvrS, VjbR and HutC, which regulate the expression of VirB type IV secretion system (T4SS) and of the translocation of several effector proteins. These virulence factors are fundamental for the intracellular survival and the control of host cells by *B. abortus*. Open reading frames (ORFs) of the genomic island 3 (GI-3) of *B. abortus* also participate in these processes, being the BAB1_0270 ORF, codifying a Zinc dependent metalloproteinase (ZnMP), required for the intracellular survival of *B. abortus* 2308 and for colonizing the spleen of BALB/c mice. Since *B. abortus* ZnMP possesses homology with the IrrE protease, a global regulator in *Deinococcus* promoting its survival when subjected to stressing environmental conditions, it was hypothesized that *B. abortus* ZnMP might accomplish a similar function during the adaptation of *B. abortus* to the microbicidal conditions present within RAW264.7 macrophages. Results showed that *B. abortus* ZnMP is a cytoplasmatic antigen of approximately 22.5 kDa which forms an operon with the Xre-transcriptional regulator. Its deletion reduced the capability of *B. abortus* Δ 270 to adapt itself and to grow under acidic stress (pH 5.5) or oxidative (hydrogen peroxide) conditions, an environment where several genes involved in virulence and intracellular adaptation were repressed. During the infection process, the deletion of this ZnMP promoted the co-localization of *B. abortus* Δ 270 with phagolysosomal cathepsin D and reduced its capability to reach the endoplasmic reticulum (ER). In the phagolysosomal environment, several *B. abortus* Δ 270 genes involved in its virulence (*bvrR*, *vjbR*, *hutC* and *virB1*) were overexpressed; nevertheless, its capacity to replicate intracellularly was significantly reduced when compared to that of the *B. abortus* 2308 strain. Finally, its deletion significantly attenuated the virulence of *B. abortus* Δ 270 because infected macrophages showed a M1 phenotype characterized by the production of cytokines (IL-6 and TNF- α) and macrophagic co-stimulating proteins (CD80 and CD86) required to activate protecting T cells against this pathogen. In a process independent to the roles exerted by *B. abortus* ZnMP, macrophages

infected with either one of the strains expressed significant levels of heme-oxygenase-1 (HO-1), an enzyme with anti-inflammatory and antioxidant activity that might be involved in the intracellular survival of this pathogen. Therefore, these results demonstrated that *B. abortus* ZnMP participates in the resistance of this pathogen to acidic and oxidative stresses, which may be directly related to the adaptation to the endosomal environment where this bacterium would have a low ability to escape from phagolysosomes and to reach the ER. Based on the evidence, the role of *B. abortus* ZnMP as a regulator of the virulence of *B. abortus* is discussed and it is concluded that this Zinc-dependent metalloproteinase codified in the GI-3 is a new virulence factor required during the adaptation to the intracellular microbicidal mechanisms and for the virulence of *B. abortus* during the infection of macrophages.



1. Introducción

La brucelosis es una enfermedad zoonótica de distribución global que afecta a mamíferos acuáticos y terrestres. Los agentes etiológicos son bacterias Gram negativas del género *Brucella*, las cuales han desarrollado un estilo de vida intracelular en diversos tipos de células (Corbel, 1997). Todas las bacterias de este género se clasifican como patógenos de hospederos mamíferos específicos (**Tabla 1**); sin embargo, se ha demostrado que algunas de ellas pueden sobrevivir en otros hospederos tales como son los peces (por ej. *Clarias gariepinus*) e incluso algunos parásitos (por ej. *Pseudalius inflexus*) de mamíferos acuáticos (pinnípedos y cetáceos) (Salem y Mohsen, 1997; El-Tras *et al.*, 2010; Hernández-Mora *et al.*, 2013). De las doce especies descritas para este género (**Tabla 1**), las más virulentas y que presentan el mayor potencial zoonótico son *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*, las cuales infectan a animales domésticos como cabras, bovinos y cerdos, respectivamente (Franco *et al.*, 2007). Debido a la cercanía de estos animales con los humanos, se ha postulado que el origen de esta enfermedad en los humanos se remontaría a miles de años, siendo el consumo de carne por los humanos y/o el proceso de la domesticación de algunos animales, el comienzo de esta interacción ecológica (Moreno, 2014). Pruebas de esto, han sido descritas por D'Anastasio *et al.* (2009), quienes estudiaron signos de brucelosis en un esqueleto del homínido *Australopithecus africanus* de hace 2,5 millones de años. Además, diversos registros de brucelosis han sido descritos a través de la historia humana, siendo las civilizaciones del antiguo Egipto, Roma, Pompeya, China o India azotadas por esta enfermedad (Moreno, 2014). Se ha planteado que la brucelosis es la quinta (de diez) plaga bíblica que hace unos 1600 años antes de cristo (AC), habría afectado al ganado en el antiguo Egipto (Seleem *et al.*, 2010).

Tabla 1. Especies y hospederos específicos descritos para el género *Brucella*.

Especie	Hospedero (s)	Referencias
<i>Brucella abortus</i>	Bovinos (<i>Bos taurus</i>)	Meyer y Shaw (1920)
<i>Brucella melitensis</i>	Cabras (<i>Capra aegagrus hircus</i>) y ovejas (<i>Ovis aries</i>)	Meyer y Shaw (1920)
<i>Brucella suis</i>	Cerdos (<i>Sus scrofa domestica</i>)	Huddleson (1931)
<i>Brucella ovis</i>	Ovejas (<i>Ovis aries</i>)	Buddle (1956)
<i>Brucella neotomae</i>	Rata del desierto (<i>Neotoma lepida</i>)	Stoenner y Lackman (1957)
<i>Brucella canis</i>	Perros (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Carmichael y Bruner (1968)
<i>Brucella pinnipedialis</i>	Pinnípedos (lobos marinos, focas)	Foster <i>et al.</i> (2007), esp. nueva
<i>Brucella ceti</i>	Cetáceos (delfines, marsopas, ballenas)	Foster <i>et al.</i> (2007), esp. nueva
<i>Brucella microti</i>	Topillo agreste (<i>Microtus arvalis</i>)	Scholz <i>et al.</i> (2008), esp. nueva
<i>Brucella inopinata</i>	Humanos (aislado de un implante de mama)	Scholz <i>et al.</i> (2010), esp. Nueva
<i>Brucella papionis</i>	Babuinos (<i>Papio spp.</i>)	Whatmore <i>et al.</i> (2014), esp. Nueva
<i>Brucella vulpis</i>	Zorros (<i>Vulpes vulpes</i>)	Scholz <i>et al.</i> (2016), esp. Nueva

* Numerosos aislados procedentes de anfibios han sido descritos; sin embargo, estas cepas no han sido agregados a esta tabla ya que ha sido descritos como especies atípicas de *Brucella* (Al Dahouk *et al.* 2017).

En la actualidad, la brucelosis es considerada una zoonosis re-emergente de distribución global (Pappas *et al.*, 2006a), la cual ha sido controlada en los países desarrollados a través de la inmunización del ganado bovino y caprino con las respectivas vacunas *B. abortus* (cepas RB51 o S19) o *B. melitensis* (cepa Rev-1) (Olsen y Stoffregen, 2014). Sin embargo, a pesar del uso de estas vacunas, su erradicación no ha sido completa, debido a reservorios naturales (manadas de bisontes y alces salvajes) y a la baja cobertura de la inmunización en países en desarrollo, razón por la cual, sigue siendo común en países del Medio Oriente, Asia, África,

América Central, el Caribe y América del Sur (Pappas *et al.*, 2006). Además, cabe mencionar que las vacunas vivas atenuadas presentan problemas de seguridad en los animales y son patógenas para los humanos, haciendo de la brucelosis una enfermedad con altas tasas de morbilidad que generan un fuerte impacto socioeconómico en salud y en la producción animal (Corbel, 2006). Anualmente, se registran unos 500.000 casos humanos con esta enfermedad en todo el mundo, donde las principales vías de contagio se producen a través del consumo de alimentos lácteos no pasteurizados o por el contacto directo con los animales enfermos (Corbel, 1997; 2006; Pappas *et al.*, 2006a; Seleem *et al.*, 2010). En menor proporción, la infección puede producirse a través de la inhalación de partículas aerosolizadas contaminadas o por accidentes en la manipulación durante trabajos de laboratorio (Moreno, 2014). Debido a su naturaleza infecciosa y a su fácil diseminación mediante la formación de micro aerosoles, las especies *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* son consideradas potenciales armas biológicas por los Centros para el control y prevención de enfermedades (CDC, Centers for Disease Control and Prevention) y el Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (NIAID, National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) (Pappas *et al.*, 2006b).

En Chile, la brucelosis humana es considerada una enfermedad de notificación inmediata por el Instituto de Salud Pública (ISP) (Ministerio de Salud, 2004). La incidencia de esta enfermedad es baja, presentando un promedio de 0.55 casos por 100 mil habitantes (Martínez, 2013). Sin embargo, algunos autores consideran que este valor es subestimado, ya que esta enfermedad tendría una incidencia de 10 a 25 veces más alta de la reportada a nivel nacional (Aranis *et al.*, 2008). En los últimos años se han reportado casos esporádicos

de brucelosis humana y desde el año 1990 no se registra mortalidad asociada a la infección por este patógeno (Ministerio de Salud, 2015). Esta disminución se asocia a las políticas iniciadas en el año 1975 para controlar la brucelosis en los animales, las cuales dieron como resultado una disminución en la prevalencia de la brucelosis en el ganado bovino desde un 7% en ese año, hasta un 2.9% en el año 1982. A partir del año 1991, se inició un programa de erradicación de la brucelosis bovina en Chile, dando como resultado tasas de incidencia de brucelosis en el ganado bovino de 0.4% (SAG, 2015). Además, desde el año 1987 se logró erradicar de Chile las infecciones por *B. melitensis* en el ganado caprino y en el ganado ovino, mientras que tampoco han sido descritas infecciones en cerdos por *B. suis* (Ministerio de Salud, 2015). Interesantemente, así como se ha mejorado la vigilancia de la brucelosis en bovinos, caprinos y ovinos, varios estudios han encontrado una positividad del 15% al 30% para *B. canis* en perros de zonas urbanas del país (Ministerio de Salud, 2015) lo cual sería un importante foco de brucelosis para los humanos.

1.1. Patogénesis por *Brucella abortus*

B. abortus es el agente etiológico de la brucelosis bovina y humana (Franco *et al.*, 2007). Es un patógeno que ha desarrollado una estrategia sigilosa para infectar a sus hospederos mamíferos (de Figueiredo *et al.*, 2015; Ahmed *et al.*, 2016). Este proceso requiere de pequeñas dosis infectivas, de 10-100 microorganismos, para sobrepasar las barreras fisicoquímicas y los componentes humorales presentes en las mucosas del hospedero (Kaden *et al.*, 2018). En estos tejidos, las bacterias son capturadas por monocitos/macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, células que son utilizadas por estas bacterias como “caballos de Troya” ya que las transportan por el sistema linfático y sanguíneo hasta alcanzar el bazo,

hígado o médula ósea, donde desarrolla una infección sistémica (Barquero-Calvo *et al.*, 2007; de Figueiredo *et al.*, 2015; Ahmed *et al.*, 2016). Además de infectar el sistema fagocítico mononuclear, este patógeno puede ser encontrado en el tejido óseo y en las articulaciones de los humanos, mientras que en los bovinos, presenta un tropismo por los órganos reproductores masculinos, la placenta y el feto de las hembras preñadas (Atluri *et al.*, 2011; Martirosyan *et al.*, 2011). En estos tejidos, *B. abortus* se establece intracelularmente en diversos tipos de células incluyendo macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células B, fibroblastos, células epiteliales y trofoblastos placentarios (de Figueiredo *et al.*, 2015; Ahmed *et al.*, 2016). Su establecimiento intracelular es clave para el desarrollo de la brucelosis, la cual se manifiesta en una fase aguda por fiebre ondulante, fatiga, pérdida de peso, dolores de cabeza y artralgia; mientras que su cronicidad se asocia a la localización de este patógeno en órganos y tejidos tales como hígado, corazón y meninges, que puede producir hepatitis, endocarditis o neurobrucellosis (Pappas *et al.*, 2006; Franco *et al.*, 2007). Si esta infección no es tratada a tiempo con los antibióticos doxiciclina más rifampicina, puede ser fatal para quienes la padecen (Franco *et al.*, 2007). Por otro lado, el contagio en los animales se produce a través del contacto entre animales enfermos o por la ingesta de restos de animales infectados, siendo el aborto en las hembras preñadas y la infertilidad en los machos, las principales consecuencias de esta enfermedad (de Figueiredo *et al.*, 2015).

Para resistir a los mecanismos microbicidas humorales y celulares del hospedero, *B. abortus* expresa una batería de factores de virulencia. Uno de los principales componentes involucrados en la patogenicidad de esta bacteria corresponde a su lipopolisacárido (Br-LPS) no clásico presente en su envoltura celular (Lapaque *et al.*, 2005). El Br-LPS está constituido

por un lípido A, un core de oligosacáridos y el antígeno O, regiones que le confiere a *B. abortus* un fenotipo resistente a la inmunidad innata del hospedero, específicamente a los péptidos antimicrobianos catiónicos y es un débil activador del complemento (Lapaque *et al.*, 2005). En este contexto, se ha demostrado que el lípido A es hasta cientos de veces menos endotóxico que el LPS de las enterobacterias (por ej. de *Escherichia coli*), lo cual le permite a *B. abortus* reducir su reconocimiento por los Receptores tipo Toll 4 (Toll like receptor 4, TLR4) presentes en las células fagocíticas e induce en estas células bajos niveles de citoquinas pro-inflamatorias y de péptidos antimicrobianos (Casabuono *et al.*, 2017). Por otra parte, el antígeno O es clave en la adhesión de *B. abortus* a los receptores presentes en las balsas lipídicas de las células hospederas. Esta interacción le permite a *B. abortus* ingresar a las células por una vía alternativa que evade los mecanismos de muerte intracelular (Lapaque *et al.*, 2005). Además, en este proceso de adhesión celular, también participan diversos componentes de la envoltura celular de *B. abortus* tales como β -1,2 glucanos cíclicos (C β G), la proteína de shock térmico Hsp60 o la proteína 41 de la superficie de *Brucella* (Bsp41) que interactúan directamente con receptores presentes en balsas lipídicas (proteína priónica celular (PrP^c), receptores scavenger clase A y ácido siálico) (Porte *et al.*, 2003; Haag *et al.*, 2010). Esta interacción entre componentes bacterianos y los receptores del hospedero representa al paso inicial en el proceso de invasión celular, que continuará con el establecimiento de *B. abortus* en el interior de las células hospederas.

1.2. Estilo de vida intracelular de *B. abortus* en macrófagos

B. abortus es un patógeno bien adaptado para sobrevivir y replicarse en el interior de los macrófagos (von Bargen *et al.*, 2012; Celli, 2019). En su interior, este patógeno desarrolla

una vacuola contenedora de *Brucella* endosomal (eBCV) que le permite transitar por la vía endosomal/lisosomal. Este tráfico intracelular comienza con la interacción de la eBCV con endosomas tempranos (ET) donde adquiere marcadores EEA1 y Rab5 (von Bargen *et al.*, 2012; de Figueiredo *et al.*, 2015). Posteriormente, esta eBCV interactúa con endosomas tardíos (ET), en un proceso donde adquiere marcadores LAMP-1 y 2, CD63, Rab7, enzimas hidrolíticas y una acidificación del lumen de esta vacuola a valores de pH 5.5 (Celli, 2019). Subsecuentemente, las eBCVs que contienen bacterias atenuadas, se fusionan rápidamente con los lisosomas donde proteasas catépsina D, especies reactivas del oxígeno producidas por el estallido respiratorio (anión superóxido, O₂⁻, peróxido de hidrógeno, H₂O₂) y una acidificación de la eBCV con valores de pH 4.5-5.0, exponen a estas bacterias a un ambiente intracelular altamente microbicida (Starr *et al.*, 2008; Celli, 2019). Sin embargo, aunque este ambiente hostil elimina a un elevado porcentaje de cepas virulentas y atenuadas de *B. abortus*; este microorganismo ha desarrollado la capacidad de detectar los cambios oxidativos y ácidos del ambiente endosomal/lisosomal. Bajo estas condiciones son expresadas diversas enzimas con actividad antioxidante tales como superóxido dismutasa (SodC) que transforma el O₂⁻ a H₂O₂ y O₂, mientras que las enzimas catalasa (KatE) y alquil hidropoxidasa C (AhpC) participan en la remoción del H₂O₂, protegiendo a estas bacterias del estallido respiratorio de los macrófagos (Gee *et al.*, 2005). En paralelo, se ha demostrado que la acidificación de la eBCV a valores de pH 5.5, durante su interacción con los endosomas tardíos, es clave en la adaptación de *B. abortus* al ambiente intracelular ya que induce la expresión de BvrR/BvrS, VjbR y HutC, reguladores transcripcionales que controlan la expresión del operón *virB*, un grupo de genes codificantes del sistema de secreción tipo 4 VirB (SST4) (Boschiroli *et al.*, 2002; Arocena *et al.*, 2010; Martínez-Núñez *et al.*, 2010; Arocena *et al.*, 2012; Altamirano-Silva *et al.*, 2018). La síntesis del sistema SST4 VirB le

permite a *B. abortus* liberar diversas proteínas hasta el citoplasma de las células infectadas, permitiéndole escapar de los lisosomas y redirigir el tráfico intracelular de las BCVs hasta las vesículas derivadas del retículo endoplásmico (RE) donde desarrolla su nicho replicativo (**Figura 1**) (von Bargen *et al.*, 2012; Myeni *et al.*, 2013; de Figueiredo *et al.*, 2015; Ke *et al.*, 2015; Celli, 2019).

Factores de virulencia claves en el tráfico intracelular de *B. abortus* en macrófagos corresponde a las proteínas efectoras liberadas a través del sistema SST4 VirB. Al menos 15 proteínas efectoras han sido descritas como sustrato de este sistema (Ke *et al.*, 2015). Sin embargo, se desconoce si estas proteínas son liberados en conjunto al citoplasma de las células infectadas o su expresión depende de los cambios ambientales presentes en las distintas zonas presentes en el interior de las células infectadas. En este sentido, *B. abortus* translocaría inicialmente la proteína RicA hasta el citoplasma de las células hospedera donde recluta proteínas Rab2 del hospedero, lo cual le permite desarrollar la eBCV y regular el tráfico retrógrado de estas células (de Barsy *et al.*, 2011). Posteriormente, *B. abortus* libera al citoplasma de las células infectadas las proteínas BtpA y/o BtpB, que a través de sus dominios TIR inhiben la señalización intracelular dependiente de MyD88, la activación del factor de transcripción nuclear- κ B (NF- κ B) y reducen la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Cirl *et al.*, 2008; Salcedo *et al.*, 2008; Atluri *et al.*, 2011; Alaidarous *et al.*, 2014). La secreción de estas proteínas le permiten escapar de la vía endosomal/lisosomal y redirigir su tránsito hasta el RE, donde *B. abortus* mediante la liberación de las proteínas BspA, BspB y BspF, que en conjunto con proteínas Sar1, IRE1a, Yip1A, WIP11 y el complejo COG del hospedero, participan en la biogénesis de las BCVs replicativas (rBCVs)

en el RE y le permiten controlar el transporte vesicular desde el RE hasta el aparato de Golgi (Celli *et al.*, 2003; Skendros y Boura, 2013; Miller *et al.*, 2017). Finalmente, mediante la translocación de la proteína VceA, *B. abortus* inhibe la apoptosis de las células infectadas para mantener su nicho replicativo y participaría, a través de la modulación de los procesos de autofagia, en la creación de BCVs autofágicas (aBCVs). El desarrollo de aBCVs le permite a *B. abortus* utilizar las vías de secreción de la célula hospedera para salir de estas y poder infectar otras células donde desarrollar nuevos nichos replicativos.

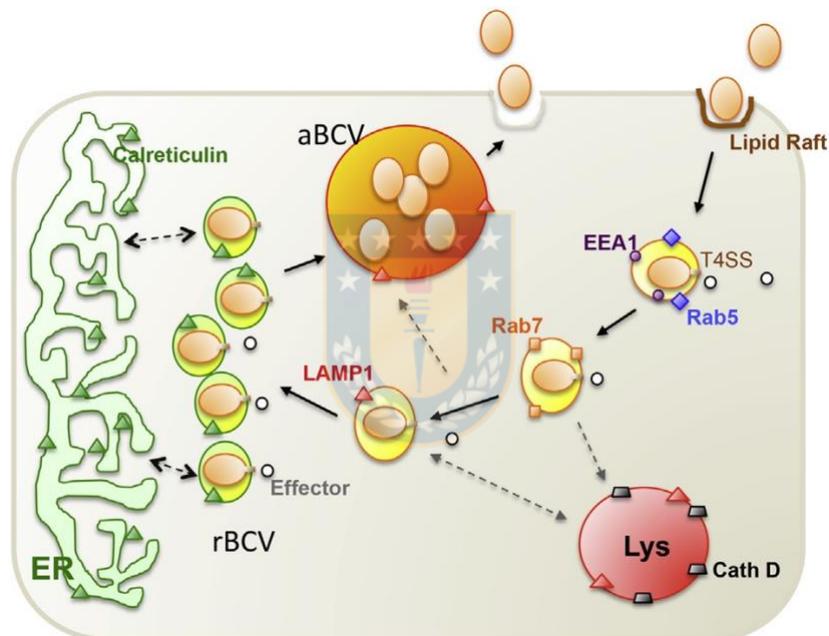


Figura 1. Ciclo de vida intracelular de *B. abortus* en macrófagos. Tráfico intracelular de *B. abortus* en macrófagos descrito por de Figueiredo *et al.* (2015). *B. abortus* ingresa a través de balsas lipídicas y desarrolla eBCVs que adquieren marcadores de endosomas tempranos (EEA1, círculo púrpura; Rab5, diamante azul) y tardíos (Rab7, cuadrado naranja). La biogénesis y tráfico de las BCVs es regulada por proteínas efectoras (círculos blancos), translocadas por el sistema VirB SST4. Las BCVs que contienen bacterias virulentas no se fusionan con los lisosomas (catepsina D, trapecioide gris), aunque si muestran una asociación transitoria con membranas que contienen LAMP1 (triángulos naranjos). Este patógeno se replica en rBCVs decorados con calreticulina (triángulos verdes), un marcador de RE. Posteriormente, desde las 48 a 72 h, el patógeno es observado en aBCVs LAMP1-positivas. La biogénesis de las aBCVs depende de la actividad de las proteínas autofágicas.

1.3. Establecimiento intracelular y evasión inmune por *B. abortus*

Establecerse en el interior de los macrófagos es clave en la patogénesis de esta patógeno ya que le permite inhibir diversos aspectos de la respuesta inmune del hospedero tales como la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α o IL-12) y la expresión de las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II en la superficie de estas células (Skendros y Boura, 2013; Martirosyan y Gorvel, 2013; Ahmed *et al.*, 2016). Controlar la expresión de estas proteínas es fundamental en el proceso de evasión de la respuesta protectora del hospedero que depende de la activación de las células T CD4+ helper tipo 1 (Th1) y T CD8+ citotóxicas (Vitry *et al.*, 2012; Skendros y Boura, 2013; Martirosyan y Gorvel, 2013; Ahmed *et al.*, 2016). Además, durante la infección crónica con *B. abortus* se produce un incremento en la expresión de factores regulatorios endógenos tales como IL-10 y/o el factor de crecimiento tumoral-beta (TGF- β), asociados a un aumento en el número de células T reguladoras (CD4+CD25+Foxp3+), una respuesta que limitan la respuesta de las células T efectoras contra este patógeno (Pasquali, 2010). Aunque esta respuesta regulatoria contribuye a controlar el proceso inflamatorio excesivo que puede dañar los tejidos sanos, indirectamente, promovería la sobrevivencia y el establecimiento de este patógeno en los tejidos del hospedero (Sanjabi *et al.*, 2009; Corsetti *et al.*, 2013; Xabier *et al.*, 2013). Sumado a los mecanismos de evasión inmune dependientes de los diversos factores de virulencia expresados por *B. abortus*, se ha demostrado que derivados del ácido araquidónico (AA) tales como ciclooxigenasa-2 (COX-2) y 5-lipoxigenasa (5-LO) también participan en la infección con *B. abortus*, los cuales regulan negativamente la respuesta inmune dependiente de las células Th1 y por ende, la respuesta protectora del hospedero (Fahel *et al.*, 2015; Gagnaire *et al.*, 2016). Esta evidencia demostraría que *B. abortus*, al igual

que otros patógenos bacterianos, pueden explotar los mecanismos regulatorios del hospedero para controlar la respuesta inmune (Mills, 2004). Estas observaciones demuestran que *B. abortus* utiliza múltiples estrategias para modular la fisiología de las células hospederas, inhibiendo en primera instancia la inmunidad innata y posteriormente, previniendo la formación de inmunidad adaptativa protectora de larga duración, en un proceso que contribuye en el desarrollo de una infección crónica (Gorvel, 2008).

1.4. Genes de la isla genómica 3 (IG-3) en la virulencia de *B. abortus*

Diversos factores de virulencia son expresados por *B. abortus* para completar su ciclo de vida intracelular en macrófagos donde sobrevive y modular la fisiología de estas células (de Figueiredo *et al.*, 2015; Ke *et al.*, 2015). Estos factores de virulencia están codificados en los cromosomas I y II, y algunos de ellos, como la proteína BtpA, se encuentra codificada en una isla genómica (IG). Las islas genómicas son segmentos discretos de ADN de unos 10 a 200 kb que contribuyen en la adaptación de las bacterias a su ambiente (Juhás *et al.*, 2009; Mancilla, 2011). De acuerdo a la función de los genes que las constituyen, las IGs son descritas como islas de patogenicidad, de simbiosis, metabólicas, fitness o de resistencia (Dobrindt *et al.*, 2004; Schmidt y Hensel, 2004). En el cromosoma I de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. ovis* hay nueve islas genómicas (IG 1-9), de las cuales la IG-3 ha sido estudiada por varios autores que indican que este segmento de ADN habría sido adquirido por estas especies mediante un proceso de transferencia horizontal de genes ocurrido durante los eventos de especiación (Rajashekara *et al.*, 2004; Ratushna *et al.*, 2006; Mancilla, 2011; Céspedes *et al.*, 2012). La IG-3 se caracteriza por tener un tamaño de 20.9 kb y un contenido

de guanina-citosina (GC) del 52.3%. Esta IG está inserta dentro de un tRNA-phe y se encuentra flanqueada por secuencias directas repetidas (DR1 y DR2) (Rajashekara *et al.*, 2004; Ratushna *et al.*, 2006; Mancilla, 2011; Céspedes *et al.*, 2012). En su interior, la IG-3 está constituida por diversos marcos de lectura abiertos (ORFs, del inglés Open Reading Frames) descritos consecutivamente desde el BAB1_0250 codificante de una integrasa P4 (Int) hasta el BAB 1_0279 codificante de la proteína BtpA (**Figura 2**).

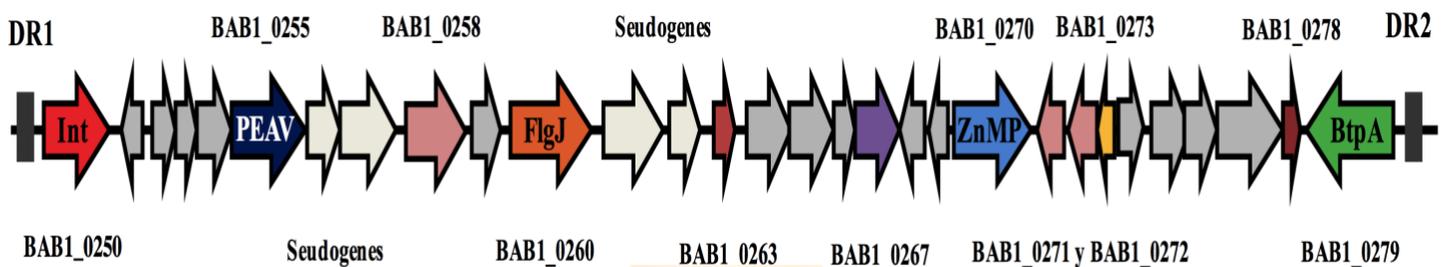


Figura 2. Organización genética de los marcos de lectura abiertos (ORFs) presentes en la isla genómica 3 de *B. abortus* 2308. Esta IG está flanqueada por secuencias repetidas directas (DR1 y DR2) y contiene ORFs desde el BAB1_0250 codificante de una integrasa de bacteriófago tipo-P4 (Int) hasta el BAB1_0279 codificante de del factor de virulencia BtpA (Modificado desde Gómez *et al.*, 2018)

Varios ORFs codificados en la IG-3 han demostrado ser importantes en la sobrevivencia intracelular de *B. abortus* en macrófagos (Céspedes *et al.*, 2012; Ortiz-Román *et al.*, 2014; Gómez *et al.*, 2018; Coloma-Rivero *et al.*, 2020). La mayoría de los ORFs de la IG-3 han sido estudiados mediante predicciones bioinformáticas analizando su homología de secuencia para conocer su función potencial como se describe en la **Tabla 2**.

Experimentalmente, el rol de los ORFs BAB1_0260, BAB1_0263, BAB1_0267 y BAB1_0278 en la patogenicidad de *B. abortus* ha sido estudiada mediante su delección por recombinación sitio específico (Céspedes *et al.*, 2012; Ortiz-Román *et al.*, 2014; Coloma-Rivero *et al.*, 2020). Los resultados demostraron que el BAB1_0260, codificante de una proteína flagelar FlgJ con actividad peptidoglican hidrolasa, es requerido en el crecimiento de *B. abortus* en cultivo, y en la sobrevivencia intracelular en macrófagos donde la cepa mutante *B. abortus* Δ flgJ para el ORF BAB1_0260 muestra una capacidad reducida para alcanzar el RE de estas células. Además, esta cepa mutante mostró una reducción significativa para replicarse en el bazo de ratones BALB/c (Coloma-Rivero *et al.*, 2020). El estudio del ORF BAB1_0263, codificante de una proteína hipotética sin una función conocida, mostró que su delección no afecta el comportamiento de *B. abortus* en ensayos *In vitro* ni *In vivo* (Céspedes *et al.*, 2012). Por otro lado, el ORF BAB1_0267 codifica una proteína hipotética con un dominio tipo Src Homology 3 (SH3), dominios presentes en algunas proteínas asociadas a la invasión celular y modulación inmune del hospedero. La delección de este ORF en *B. abortus* redujo su capacidad para sobrevivir y replicarse intracelularmente, siendo completamente eliminada desde el bazo de ratones BALB/c (Ortiz-Román *et al.*, 2014). Diversas proteínas eucariontes que participan en la señalización intracelular contienen dominios SH3 (Whisstock y Lesk A, 1999; Marino *et al.*, 2002; Bakal y Davies, 2010), y aunque no ha sido identificado una secuencia señal en la proteína hipotética codificada en el ORF BAB1_0267, que indique su liberación desde *B. abortus* hasta el citoplasma de las células infectadas, es posible que proteínas con dominios SH3 puedan ser utilizadas por estas bacterias para inhibir o secuestrar las vías de señalización del hospedero. Esta función hipotética podría explicar por qué su ausencia en *B. abortus* reduce su sobrevivencia en el bazo de ratones BALB/c (Ortiz-Román *et al.*, 2014).

El estudio del ORF BAB1_0278 mostró que codifica la proteína GcrA, la cual está involucrada en el control del ciclo celular y morfogénesis asimétrica en *B. abortus* y *Caulobacter crescentus* (Holtzendorff *et al.*, 2004; De Bolle *et al.*, 2015). La delección de esta proteína en *C. crescentus* resultó ser letal, mientras que en *B. abortus* la delección del ORF BAB1_0278 no afectó su crecimiento en medio de cultivo (Céspedes *et al.*, 2012). Estas observaciones demostrarían que *B. abortus* tendría más de un gen codificante de una proteína GcrA o que la proteína codificada en el ORF BAB1_0278 no ejercería la función hipotética postulada (**Tabla 2**). Sin embargo, durante el proceso de infección *In vivo*, la delección de este ORF redujo significativamente la capacidad de *B. abortus* para replicarse intracelularmente en macrófagos y para colonizar el bazo de ratones BALB/c (Céspedes *et al.*, 2012). Finalmente, el ORF BAB1_0279 codifica la proteína efectora BtpA/Btp1 del sistema de secreción SST4 VirB, la cual ha sido estudiada extensamente por diversos investigadores (Salcedo *et al.*, 2008; Cirl *et al.*, 2008; Atluri *et al.*, 2011; Alaidarous *et al.*, 2014). Esta proteína, junto a BtpB (BAB1_0756), contienen un dominio de la familia de receptores Toll/IL-1 (TIR), que en el citoplasma de las células infectadas inhiben vías de señalización dependientes del TLR-2 y -4 vía MyD88, la activación del factor de transcripción NF- κ B, la producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-12 y TNF- α) y la maduración de las células dendríticas infectadas (Salcedo *et al.*, 2008; Atluri *et al.*, 2011).

Tabla 2. Marcos de lectura abiertos codificados en la isla genómica 3 de *B. abortus* 2308.

ORFs	Proteína	Función potencial	Acceso
BAB1_0250	Integrasa P4 de bacteriófago	Proteína unida covalentemente al ADN a través de un residuo catalítico de tirosina.	cd00801
BAB1_0251	Proteína hipotética	Dominios conservados putativos no detectados.	
BAB1_0252	Regulador transcripcional AlpA	Dominio de unión al AND Hélice-giro-Hélice de reguladores transcripcionales de la superfamilia MerR que median respuestas al estrés inducido por metales pesados, drogas o radicales oxidativos.	COG3311
BAB1_0253	Proteína hipotética	Dominios conservados putativos no detectados.	
BAB1_0254	Proteína hipotética	Dominios conservados putativos no detectados.	
BAB1_0255	Proteínas que contienen dominios TraI y Toprim_3	TraI es una proteína bifuncional que cataliza la relajación del DNA, provee el sitio específico requerido para iniciar la transferencia del ADN. Dominio Toprim es encontrado en una amplia variedad de enzimas involucradas en la manipulación de ácido nucleico.	cl26921 pfam13362
BAB1_0256	Seudogen		
BAB1_0257	Seudogen		
BAB1_0258	Proteína hipotética con dominios Hélice-giro-Hélice	Muchas proteínas con este dominio funcionan como secuencias específicas de unión a ADN, tal como los reguladores transcripcionales.	pfam13412
BAB1_0259	Proteína hipotética	Dominios conservados putativos no detectados.	
BAB1_0260†#	Proteína flagelar FlgJ	Hidrolasa del peptidoglican específica del flagelo y de ensamblaje del rod flagelar.	COG1705
BAB1_0261	Seudogen		
BAB1_0262	Seudogen		
BAB1_0263†	Proteína hipotética	Dominios conservados putativos no detectados.	
BAB1_0264	Proteína hipotética	Dominios conservados putativos no detectados.	
BAB1_0265	Proteína hipotética con dominio SANT	Dominio de unión al ADN SANT (SWI3, ADA2, N-CoR y TFIIB) es encontrado en complejos de represores transcripcionales.	cd00167
BAB1_0266	Proteína hipotética	Dominios conservados putativos no detectados.	
BAB1_0267†*#	Proteína hipotética	Dominios conservados putativos no detectados.	Q2YPA6

BAB1_0268	Proteína hipotética	Dominios conservados putativos no detectados.	
BAB1_0269	Proteína hipotética	Dominios conservados putativos no detectados.	
BAB1_0270†#	Metaloproteínasa dependiente de Zinc	Metaloendopeptidasa de la familia ImmA/IrrE	COG2856
BAB1_0271	Proteína de infección abortiva AbiH	Esta familia de proteínas que confiere resistencia a bacteriófagos.	pfam14253
BAB1_0272	Proteína de infección abortiva AbiH	Esta familia de proteínas que confiere resistencia a bacteriófagos.	pfam14253
BAB1_0273#	Regulador transcripcional	Regulador transcripcional de la familia Xre (Xenobiotic response element) que controla la expresión de genes involucrados en la respuesta a estrés.	cd00093
BAB1_0274	Proteína hipotética	Dominios conservados putativos no detectados.	
BAB1_0275	Proteína hipotética	Dominios conservados putativos no detectados.	
BAB1_0276	Proteína hipotética	Dominios conservados putativos no detectados.	
BAB1_0277	Proteína hipotética	Dominios conservados putativos no detectados.	
BAB1_0278†#	Proteína hipotética codificante de una proteína GcrA.	GcrA es un regulador maestro del ciclo celular involucrada en el control de la progresión del ciclo celular y morfogénesis polar asimétrica. GcrA actúa como un activador de los componentes de los replisomas y de la maquinaria de segregación.	pfam07750
BAB1_0279†	Proteína con dominio del receptor Toll/interleuquina-1 (Tir).	El dominio Tir es responsable de la transducción de señales en todos los receptores tipo-Toll (TLR); similar a Mal de humanos (adaptador tipo MyD88) el cual es requerido para transducción de señales por TLR4.	pfam13676

ORFs de la IG-3 fueron analizados usando Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGGs), NCBI y UniprotBlast.

* El ORF BAB1_0267 codifica una proteína que contiene un dominio tipo Src Homology 3 (SH3) que posee 100% de identidad a *B. abortus* (WP_002968149.1, pfam08239) y 99.1% de identidad con las cepas *B. suis* bv. 5 str. 513 (D0PAU5), *B. neotomae* 5K33 (C9V8E3) y *B. abortus* NCTC 8038 (A0A0M1WE22).

† Función de estos ORFs fue estudiada mediante delección por recombinación sitio específica en la sobrevivencia intracelular de *B. abortus*.

ORFs utilizados en el diseño y evaluación de vacunas de ADN y proteicas.

1.5. Aplicación de la IG-3 en el diseño de vacunas contra *B. abortus*

En base a los roles descritos para los ORFs codificados en la IG-3, algunos de ellos fueron utilizados para desarrollar vacunas contra *B. abortus* (**Tabla 2**). Los resultados mostraron que la proteína FlgJ codificada en el ORF BAB1_0260, en una formulación con adyuvante completo e incompleto de Freund (CFA or IFA), fue inmunogénica (IgG e IFN- γ) y confirió niveles significativos de protección (1.63 unidades de protección) en ratones BALB/c desafiados con *B. abortus* cepa 544 (Li *et al.*, 2012). En base a su seguridad y eficacia protectora, esta proteína FlgJ puede ser considerada un buen candidato vacunal como alternativa a las cepas vivas atenuadas *B. abortus* cepas S19 y RB51. Por otro lado, los ORFs BAB1_0263, BAB1_0267 y BAB1_0278 fueron utilizados en el diseño de vacunas de ADN como se describe en la **Figura 3**. Los resultados más alentadores fueron observados a través de la administración intramuscular de dos vacunas de ADN diseñadas a partir del ORF BAB1_0278 (Sislema-Egas *et al.*, 2012; Riquelme-Neira *et al.*, 2013). Aunque ambas vacunas fueron evaluadas independientemente, indujeron niveles significativos de anticuerpos IgG2a y una respuesta linfoproliferativa de los esplenocitos secretores de citoquinas TNF- α y/o IFN- γ en el modelo de ratones BALB/c. Esta inmunogenicidad asociada a una respuesta del tipo Th1 fue capaz de conferir niveles de protección significativos en ratones BALB/c (Sislema-Egas *et al.*, 2012; Riquelme-Neira *et al.*, 2013). En otros estudios, los ORF BAB1_0263 y BAB1_0267 fueron utilizados en el diseño de vacunas de ADN, sin embargo, ninguna de las dos lograron conferir niveles significativos de protección en los ratones BALB/c. Interesantemente, la vacuna pV263 (ORF BAB1_0263) generó niveles significativos de IgG2a, una respuesta linfoproliferativa de esplenocitos productores de IFN- γ , pero no de TNF- α ; mientras que la vacuna basada en el ORF

BAB1_0267 indujo niveles significativos de anticuerpos IgG1 y una respuesta proliferativa de esplenocitos asociada a una baja producción de IFN- γ y TNF- α (Sislema-Egas *et al.*, 2012; Gómez *et al.*, 2016).

En base a los resultados de inmunogenicidad descritos para estos ORFs de la IG-3, vacunas multi-epitope y multivalentes fueron desarrolladas utilizando partes de la secuencia o a partir de sus epítopes inmunodominantes (Escalona *et al.*, 2017; Gómez *et al.*, 2017). En este contexto, Escalona *et al.* (2017) construyó una vacuna de ADN diseñada con epítopes inmunodominantes para MHC de clase I y II presentes en los ORFs BAB1_0260, BAB1_0270, BAB1_0273, BAB1_0278 y de la proteína SodC (superóxido dismutasa) de *B. abortus* 2308. Esta vacuna fue evaluada inmunizando ratones BALB/c, animales que mostraron un incremento significativo en la producción de IgG2a, en la respuesta linfoproliferativa de los esplenocitos y en la producción de IFN- γ . Además, la inmunización confirió niveles de protección capaces de reducir significativamente la carga de *B. abortus* en el bazo de los ratones BALB/c infectados (Escalona *et al.*, 2017). En paralelo, tres vacunas de ADN multivalentes fueron diseñadas fusionando los ORFs BAB1_0273-*sodC*, BAB1_0278-*sodC* y BAB1_0273-BAB1_0278-*sodC* (Gómez *et al.*, 2017). Estas vacunas fueron administradas vía intramuscular en ratones BALB/c, las cuales generaron inmunidad del tipo Th1, similar a la vacuna multiepítope descrita por Escalona *et al.* (2017), lo cual incluyó una producción significativa de IgG2a, de la respuesta linfoproliferativa de los esplenocitos y del IFN- γ . Sin embargo, a diferencia de aquellas vacunas que al polarizar la respuesta inmune hacia un fenotipo del tipo Th1 contra *B. abortus* indujeron protección (Sislema-Egas *et al.*, 2012; Riquelme-Neira *et al.*, 2013; Escalona *et al.*, 2017), ninguna de

estas vacunas confirieron niveles de protección efectiva en los ratones inmunizados. Estos resultados demostrarían que la inmunogenicidad inducida por estas vacunas de ADN por sí sola no es un parámetro que permita predecir la respuesta protectora contra este patógeno. Sin embargo, aunque estas vacunas de ADN multivalentes no fueron lo suficientemente efectivas contra *B. abortus*, los resultados basados en los ORFs de la IG-3 sugieren que algunos de los antígenos codificados en ellos pueden ser candidatos interesantes en la protección contra este patógeno.

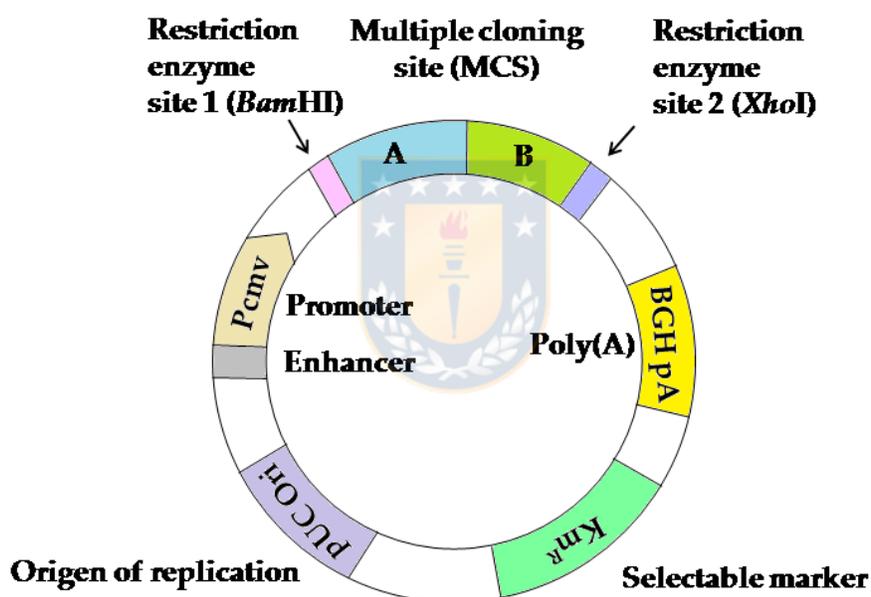


Figura 3. Modelo de la estructura de una vacuna de ADN basada en plásmidos codificantes de proteínas de fusión. El diseño de vacunas de ADN basadas en los ORFs presentes en la IG-3 fue realizado insertando una o varias secuencias en el sitio de múltiple clonaje usando enzimas de restricción. En el ejemplo se indica que los genes A y B fueron clonados en el MCS usando las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I (Gómez y Oñate, 2018).

1.6. Roles del ORF BAB1_0270 en la virulencia de *B. abortus*

La evidencia descrita demuestra que algunos de los ORFs codificados en la IG-3 son importantes en la virulencia de *B. abortus* durante el proceso de infección. En este contexto, el ORF BAB1_0270 de *B. abortus* ha generado interés debido que participa en la sobrevivencia y replicación intracelular de *B. abortus* 2308 en macrófagos y células epiteliales. Su delección desde *B. abortus* atenuó significativamente a esta cepa, la cual fue completamente eliminada desde el bazo de los ratones BALB/c a las dos semanas post-infección (Ortiz-Román *et al.*, 2014). Posteriormente, la secuencia del ORF BAB1_0270 fue utilizado para diseñar una vacuna de ADN que fue administrada por vía intramuscular en ratones BALB/c. Los resultados mostraron que esta vacuna de ADN indujo en estos animales niveles significativos de anticuerpos IgG2a séricos y una respuesta significativa en la proliferación de los esplenocitos secretores de citoquinas TNF- α e IFN- γ (Gómez *et al.*, 2016). Esta inmunogenicidad asociada a una respuesta inmune del tipo Th1, confirió niveles significativos de protección en ratones BALB/c desafiados con la cepa virulenta *B. abortus* 2308 (Gómez *et al.*, 2016). Esta evidencia reforzó la idea de que la proteína codificada en el ORF BAB1_0270 es importante para *B. abortus* durante el proceso de infección (Ortiz-Román *et al.*, 2014). Sin embargo, debido que su función en la fisiología y virulencia de este patógeno es desconocida, se han realizado análisis *in silico* de su secuencia para identificar su función potencial (**Tabla 2**). Estos análisis demuestran que el ORF BAB1_0270 codifica una metaloproteinasa dependiente de Zinc (de aquí en adelante llamada ZnMP, por el Zinc-dependent metalloproteinase) la cual posee una secuencia homóloga con las proteasas de la familia ImmA e IrrE presentes en *Bacillus subtilis* y en algunas especies del género *Deinococcus* (*D. radiodurans* y *D. deserti*), respectivamente (Earl *et al.*, 2002; Bose *et al.*,

2008; Ludanyi *et al.*, 2014). La función de estas metaloproteinasas ImmA/IrrE es romper proteínas represoras (ImmR/Ddro, respectivamente). En el caso de ImmA, esta actúa sobre ImmR, un represor que impide la transferencia horizontal de elementos genéticos móviles (por ej. ICEBs1), mientras que IrrE, rompe el represor Ddro que suprime la transcripción de genes requeridos en la reparación del ADN y en la sobrevivencia bacteriana al estrés abiótico: radiación ionizante y ultravioleta, así como también, a las mutaciones inducidas por mitomicina C (Earl *et al.*, 2002; Bose *et al.*, 2008; Ludanyi *et al.*, 2014).

Adicionalmente, se ha demostrado que la proteasa IrrE es un regulador global en bacterias del género *Deinococcus*, que a través de su actividad proteolítica ejercida sobre proteínas represoras, promueve la transcripción de diversos genes requeridos en la sobrevivencia bacteriana a las condiciones ambientales adversas (Earl *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2011; Ludanyi *et al.*, 2014; Lim *et al.*, 2019). Esta función reguladora de IrrE ha sido utilizada, clonando su secuencia en plásmidos, para mejorar la tolerancia al estrés abiótico: irradiación, cambios osmóticos, calor, sales y estrés oxidativo, en hospederos heterólogos como es *E. coli*. En *Zymomonas mobilis* la expresión de la proteína IrrE recombinante promovió la tolerancia al etanol y al estrés ácido (Ma *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2015). Lo novedoso de la función de esta proteína fue descrito por Pan *et al.* (2009), quienes demostraron que la planta *Brassica napus*, en la cual fue expresada la IrrE de *D. radiodurans* R1, también incrementó su capacidad para tolerar el estrés salino. Estos resultados indicarían que proteínas similares a IrrE podrían ser importantes en la resistencia bacteriana a las condiciones ambientales adversas. En este sentido, *B. abortus* es un patógeno intracelular facultativo que durante su tránsito por la vía endosomal/lisosomal debe adaptarse a un

microambiente altamente hostil mediante mecanismos que aún no entendemos completamente, pero que le permiten activar todo su arsenal de factores de virulencia involucrados en la expresión de enzimas con actividad antioxidantes y en la síntesis de un sistema de secreción y de proteínas efectoras que modulan su tráfico intracelular y la fisiología de las células infectadas.

Entonces, si esta ZnMP de *B. abortus* 2308 posee una función similar a IrrE, podría ser un importante factor de virulencia que participa en la resistencia de este patógeno a los mecanismos microbicidas de las células eucariotas y por lo tanto, podría desempeñar una función relevante en la adaptación intracelular y en la virulencia de este patógeno durante su interacción con las células hospederas.



2. Hipótesis de trabajo

Brucella abortus es un patógeno bacteriano que sobrevive a los mecanismos microbicidas intracelulares de los macrófagos. En el interior de estas células, inhibe vías de señalización, inactiva factores de transcripción y suprime la secreción de proteínas, lo cual le permite inhibir la respuesta inflamatoria y generar una estimulación deficiente de las células T. Algunas proteínas codificadas en la isla genómica 3 de *B. abortus* contribuyen en el establecimiento intracelular y en los mecanismos de evasión inmune. La función de la proteína ZnMP ha sido estudiada a través de la cepa mutante *B. abortus* $\Delta 270$, demostrando que su delección reduce significativamente la sobrevivencia intracelular de *B. abortus* en macrófagos y células epiteliales. Esta proteína presenta homología con las proteasas ImmA/IrrE, las cuales ejercen una función proteolítica, clivando proteínas represoras que impiden la expresión de genes involucrados en la transferencia horizontal de genes o en la sobrevivencia bacteriana frente a condiciones de estrés inducidas por la radiación ultravioleta o ionizante. Diversos trabajos demuestran que la proteína IrrE incrementa la tolerancia bacteriana al estrés abiótico, es factible que suponer que la proteína ZnMP ejerza una función similar en la tolerancia de *B. abortus* durante su ciclo de vida intracelular, específicamente durante su tráfico en los endosomas y lisosomas de los macrófagos.

Por lo tanto, en base a esta evidencia se plantea la siguiente hipótesis:

La proteína ZnMP codificada en el ORF BAB1_0270 le confiere resistencia a *Brucella abortus* 2308 a las condiciones de estrés ácido y oxidativas, siendo requerida en la virulencia y adaptación de este patógeno al ambiente microbicida presente en los endosomas y lisosomas de los macrófagos.

3. Objetivo general

Estudiar el rol de una metaloproteinasas dependiente de zinc (ZnMP) codificada en el ORF BAB1_0270 de la isla genómica 3 (IG-3) en la virulencia y adaptación intracelular de *Brucella abortus* durante el proceso de infección de macrófagos.

3.1. Objetivos específicos

Objetivo 1. Caracterizar una metaloproteinasas dependiente de zinc (ZnMP) codificada en el ORF BAB1_0270 de *B. abortus*.



Objetivo 2. Determinar la importancia de la proteína ZnMP en la sobrevivencia de *B. abortus* bajo condiciones de estrés ácido y oxidativo.

Objetivo 3. Evaluar el rol de esta ZnMP en la adaptación intracelular de *B. abortus* en macrófagos.

Objetivo 4. Evaluar el rol de esta ZnMP en la virulencia de *B. abortus* en la activación o supresión de macrófagos infectados.

4. Materiales y Métodos

4.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas usadas en este estudio fueron *Brucella abortus* 2308 (wild type, wt), *B. abortus* Δ 270 (mutante para el ORF BAB1_0270) y *B. abortus* Δ 270C (cepa complementada) (Ortiz-Román *et al.*, 2014). En algunos ensayos, estas bacterias fueron transformadas con el vector de amplio rango de huésped pAKgfp1 (Addgene plasmid #14076) codificante de una proteína verde fluorescente (GFP) (Karsi y Lawrence, 2007), para estudiar la adhesión y tráfico intracelular de *B. abortus* en macrófagos RAW264.7. Además, la cepa *B. abortus* 2308 fue inactivada usando una solución de metanol-acetona al 70% (cepa denominada *B. abortus* 2308i) para usarla como control en algunos experimentos. Las cepas de *Escherichia coli* DH5 α y *E. coli* BL21 fueron utilizadas para expresar y purificar la proteína ZnMP. Las cepas de *B. abortus* y *E. coli* fueron cultivadas en caldo Brucella (Difco) y Luria Bertani (LB), respectivamente, e incubadas a 37°C con agitación (120 rpm) por el tiempo necesario de acuerdo a cada experimento. Los cultivos para las cepas mutantes y transformantes de *B. abortus* y *E. coli* fueron suplementados con antibióticos (50 μ g/ml kanamicina y/o 30 μ g/ml ampicilina). Las características de cada cepa bacteriana, plásmidos y partidores usados en el diseño de las cepas mutantes y transformantes son descritos en la **Tabla 3**. Todos los ensayos y experimentos fueron realizados siguiendo los procedimientos establecidos por el comité de bioseguridad y bioética de la Universidad de Concepción.

Tabla 3. Cepas bacterianas, plásmidos y partidores usados en el desarrollo de las cepas mutantes

Cepas bacterianas	Características	Referencia
<i>B. abortus</i> 2308	wt (cepa silvestre), lisa y virulenta	Stock Lab. Inmunología Molecular, UdeC.
<i>B. abortus</i> Δ270	<i>B. abortus</i> 2308 mutante para el ORF BAB1_0270 (K _{mr})	Ortiz-Román <i>et al.</i> (2014)
<i>B. abortus</i> Δ270C	<i>B. abortus</i> Δ270 (K _{mr}) complementada con el plásmido pBV1 codificante del ORF BAB1_0270	Ortiz-Román <i>et al.</i> (2014)
<i>B. abortus</i> 2308- <i>gfp</i>	Cepa silvestre, lisa y virulenta transformada con el plásmido pAKgfp1 codificante para la proteína fluorescente verde (GFP), (Amp _r).	Este trabajo
<i>B. abortus</i> Δ270- <i>gfp</i>	<i>B. abortus</i> 2308 mutante para el ORF BAB1_0270 (K _{mr}) y transformada con el plásmido pAKgfp1 codificante para la proteína fluorescente verde (GFP) (Amp _r).	Este trabajo
<i>B. abortus</i> 2308i	Cepa silvestre inactivada con metanol-acetona al 70%.	Este trabajo
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Cepa usada para la purificación de la proteína recombinante. DE3 es un fago recombinante que porta el gen para la polimerasa ARN T7.	Studier y Moffatt (1986)
Plásmidos	Características	Referencia
pSIM7/pSIM9	Vector de clonamiento de amplio rango de hospedero (C _{mr}) que contiene una recombinasa Lambda Red (λ-Red).	Sharan (2009)
pKD4	Vector que contiene la secuencia para el casete de resistencia a Kanamicina (K _{mr})	Datsenko y Wanner (2000)
pVB1	Vector de clonación para los productos de PCR (Amp _r)	Ortiz-Román <i>et al.</i> (2014)
pVB1-BAB1_0270	Plásmido recombinante (Amp _r) que contiene el ORF BAB1_0270.	Ortiz-Román <i>et al.</i> (2014)
pAKgfp1	Vector de clonamiento de amplio rango de hospedero pBBR1MCS4 (Amp _r) codificante para la proteína fluorescente verde (GFP).	Karsi y Lawrence (2007)
pColdII	Vector derivado desde un plásmido pUC118 usado en la expresión de proteínas inducidas por shock-frío en <i>E. coli</i> . Incorpora en las proteínas una etiqueta de 6xHis.	Qing <i>et al.</i> (2004)

K_{mr}: Resistencia a kanamicina; Amp_r: Resistencia a ampicilina; C_{mr}: Resistencia a cloranfenicol.

6xHis: secuencia de 6 histidinas.

4.2. Línea celular y condiciones de cultivo

Los macrófagos RAW264.7 son una línea celular derivada de ratones BALB/c (*Mus musculus*), la cual fue establecida desde un tumor inducido por virus de leucemia murina de Abelson (Raschke *et al.* 1978). Esta línea celular fue obtenida desde ATCC (American Type Culture Collection, USA) y ha sido comúnmente utilizada para estudiar la interacción entre *B. abortus* y macrófagos de mamíferos en cultivo (Hu *et al.*, 2020). Esta línea celular fue cultivada en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) más 100 UI de penicilina, 100 µg/ml estreptomicina y 0.25 µg/ml amfotericina B (solución antibiótica-antimicótica, ThermoFisher Scientific, MA, USA). De acuerdo a los requerimientos de cada experimento, los macrófagos fueron sembrados en placas de 6, 12 ó 24 pocillos (Nunclon Delta Surface plates, ThermoFisher Scientific, MA, USA) e incubados en un ambiente con 37°C y un 5% CO₂ por el tiempo requerido para cada ensayo.



4.3. Objetivo 1. Caracterizar una metaloproteinasa dependiente de zinc (ZnMP) codificada en el ORF BAB1_0270 de *B. abortus*.

4.3.1. Análisis *In silico* de la proteína ZnMP.

Parámetros fisicoquímicos tales como peso molecular, punto isoelectrico, tiempo de vida media en *E. coli*, estabilidad a temperaturas, hidrofobicidad y estructura en 3D de la proteína ZnMP codificada en el ORF BAB1_0270 fueron analizados mediante análisis *in silico*. El modelamiento de esta proteína hipotética fue realizado usando el servidor I-TASSER (Iterative threading assembly refinement) <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/> (Yang *et al.*, 2014), el cual emplea una aproximación jerárquica que predice la estructura de esta proteína mediante un método que realiza simulaciones de alineamientos múltiples y ensamblaje de fragmentos. I-Tasser expresa un valor de C (C-score) del modelamiento que varía desde -5 a 2, donde un valor C elevado está relacionado con un mayor grado de confianza. Para refinar la predicción de esta proteína hipotética, el mejor modelo de la estructura obtenida desde I-TASSER, fue realizada en el servidor GalaxyRefine (<http://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE>). Este servidor usa métodos de relajación moderados y agresivos para la reconstrucción de cadenas laterales (Heo *et al.*, 2013). Posteriormente, el refinamiento final del modelo fue usado para minimizar la energía con el servidor KobaMIN (<http://chopra-modules.science.purdue.edu/modules/kobamin/html/>) (Rodríguez *et al.*, 2012). Para reconocer errores potenciales en la estructura tridimensional inicial y final de la proteína hipotética, el formato PDB fue cargado en el servidor ProSA-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) (Wiederstein y Sippl, 2007). ProSA-web está basada en la distribución de la energía y la comparación de la proteína hipotética con

estructuras nativas similares presentes en una base de datos. La visualización de la estructura 3D fue hecha con PyMOL. La calidad de la proteína predicha en 3D se muestra como un valor Z (Z-score), el cual indica posibles errores comparando la estructura de la proteína ZnMP con una base de datos de proteínas nativas determinadas experimentalmente. La localización subcelular de la proteína ZnMP en *B. abortus* fue analizada usando el software CELLO v2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>)-(Yu *et al.*, 2004).

4.3.2. Expresión y purificación de ZnMP en *E. coli*.

A partir de las características fisicoquímicas obtenidas *in silico* para ZnMP, se procedió a expresar y purificar la proteína recombinante en *E. coli*. Para esto, la secuencia del ORF BAB1_0270 de *B. abortus* (GenBank AM040264.1) fue clonada en el vector de expresión pColdII (pColdII-ZnMP) usando las enzimas de restricción *Nde*I y *Hind*III (New England Biolabs, MA, USA). El vector recombinante fue introducido en la cepa *E. coli* BL21(DE3) por electroporación usando el electroporador MicroPulser (BioRad, CA, USA). Las bacterias fueron cultivadas en agar LB suplementado con ampicilina, las colonias aisladas fueron cultivadas en caldo LB y las bacterias transformantes confirmadas mediante la extracción del plásmido recombinante usando el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega Corporation, WI, USA). Las bacterias recombinantes fueron cultivadas en caldo LB hasta una densidad óptica (OD₆₀₀) de 1 y la expresión de la proteína ZnMP fue inducida agregando 1 mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) al caldo LB. Las bacterias fueron incubadas en agitación (120 rpm) por 3 h a 37°C. Pasado este tiempo, las bacterias fueron colectadas centrifugando el cultivo a 10.000 xg por 10 min y el pellet fue resuspendido en buffer Tris-EDTA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM) con 1 mM del inhibidor de proteasa

fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Las bacterias fueron lisadas exponiéndolas a 10 segundos (10s) de sonicación seguido por intervalos de 30s usando el sonicador Q125 (Qsonica, CT, USA). Luego, las fracciones bacterianas fueron centrifugadas, obteniéndose una fase soluble correspondiente al sobrenadante y una fase insoluble correspondiente a la precipitación de los fragmentos bacterianos. La expresión de la proteína ZnMP fue visualizada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12% a partir las fases obtenidas previamente bajo distintas condiciones de expresión. Este gel fue realizado en dos fases (gel discontinuo), es decir, un gel de carga que está compuesto por H₂O destilada (dd), acrilamida bisacrilamida al 30%, Tris 1 M (pH 6,8), SDS al 10%, persulfato de amonio y Temed, mientras que el gel separador fue realizado mezclando H₂O dd, acrilamida bisacrilamida al 30%, Tris 1,5 M (pH 8,8), SDS al 10%, persulfato de amonio y Temed. Las proteínas fueron teñidas con una solución de azul de Coomassie (Sigma-Aldrich Co., MO, USA). Finalmente, la proteína fue purificada mediante cromatografía por afinidad a histidina usando columnas HisTrap HP (GE Healthcare Life Sciences, USA) y la confirmación de su purificación fue realizada mediante western blot usando anticuerpos anti-6xHis Tag (Abcam, Cambridge, UK).

4.3.3. Caracterización genómica de la proteína ZnMP.

El contexto genómico del ORF BAB1_0270 codificante de la proteína ZnMP fue analizado mediante predicciones bioinformáticas y experimentales. Estas metaloproteinasas contienen dominios COG2856 (**Tabla 2**) que usualmente forman parte de operones junto a proteínas que contienen dominios Helix-turn-Helix (HTH) de la familia Xre. Para demostrar si esta proteína forma parte de un operón, la secuencia del ORF BAB1_0270 y del gen adyacente

rio abajo fueron analizadas a través de alineamientos de secuencias con BLASTp (protein-protein Basic Local Alignment Search Tool). Los promotores bacterianos fueron analizados con el servidor BPROM (Solovyev y Salamov, 2011) para identificar si esta ZnMP es expresada junto a un regulador transcripcional dentro de la IG-3 de *B. abortus* 2308. Posteriormente, las predicciones bioinformáticas fueron confirmados extrayendo el ADN genómico (DNAg) usando un kit de purificación de ADN genómico Wizard® (Promega, WI, USA) y el ARN total usando TRIzol (ThermoFisher Scientific Inc, MA, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. A partir del ARN total fue obtenido cDNA mediante RT-PCR usando la enzima Maxima First Strand cDNA Synthesis (ThermoFisher Scientific Inc, MA, USA). Finalmente, la expresión del operón constituido por los genes que codifican para el regulador transcripcional-Xre y el ORF BAB1_0270 fue analizada a través de un ensayo de PCR convencional donde ambos genes fueron amplificados desde el ADN genómico (DNAg) y desde el cDNA, usando partidores específicos (**Tabla 4**). Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Tabla 4. Partidores usados en la identificación del operón

Nombre de partidores	Secuencia nucleotídica	Tamaño (bp)
BAB1_0270 F	ATGAGCAGTCAGAATTACGT	549
BAB1_0270 R	TCAGATCCCTTTTTTATTGA	
Regulator F	ATGACCACGGAAGCTCGGGAA	357
Regulator R	TCATTCCTCTTTACCTCGCC	
Operon F	ATGACCACGGAAGCTCGGGAA	906
Operon R	TCAGATCCCTTTTTTATTGA	

4.4. Objetivo 2. Determinar la importancia de la proteína ZnMP en la sobrevivencia de *B. abortus* bajo condiciones de estrés ácido y oxidativo.

4.4.1. Rol de la ZnMP en la adaptación de *B. abortus* al estrés ácido y oxidativo.

La contribución del ORF BAB1_0270 (ZnMP) en la resistencia de *B. abortus* al estrés ácido y oxidativo fue estudiada. Por un lado, la resistencia al pH ácido fue evaluada cultivando las cepas *B. abortus* 2308, *B. abortus* Δ 270 y *B. abortus* Δ 270C en matraces con 50 ml de caldo Brucella ajustado a un pH 5.5. Estos matraces fueron incubados a 37°C con agitación (120 rpm) durante 96 h. A los tiempos 6, 24, 48, 72 y 96 h, fueron extraídas alícuotas de 1 ml para realizar recuentos bacterianos mediante diluciones seriadas. Microgotas de 10 μ l fueron sembradas en agar Brucella, las cuales fueron incubadas a 37 °C por 72 h. Los recuentos de colonias fueron expresados como unidades formadoras de colonia (UFC) por ml⁻¹ (UFC/ml). En paralelo, los cambios en el pH de los sobrenadantes derivados de los cultivos de cada cepa bacteriana fueron cuantificados con un pH-metro digital. Por otro lado, el rol de la ZnMP en la adaptación de *B. abortus* al estrés oxidativo fue analizado exponiendo a las cepas *B. abortus* 2308, *B. abortus* Δ 270 y *B. abortus* Δ 270C por 20 min a concentraciones de 0 (PBS), 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 ó 1.2 molar (M) de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (MerK Millipore, Darmstadt, Alemania). La viabilidad de estas bacterias fue cuantificada a través de ensayos colorimétricos basados en el uso del reactivo PrestoBlue™ (ThermoFisher Scientific Inc., MA, USA) y cuantificada en el lector de microplacas VictorX3 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) a 590 nm. Los resultados de resistencia de las cepas *B. abortus* frente al pH ácido y su tolerancia al estrés oxidativo son presentados como el promedio \pm la desviación estándar. Todos los ensayos fueron realizados en triplicado.

4.4.2. Expresión génica de las cepas de *B. abortus* bajo estrés ácido y oxidativo.

La expresión relativa de genes de las cepas *B. abortus* 2308 y *B. abortus* Δ 270 cultivadas por 24 h en caldo Brucella ajustado a un pH 5.5 o expuestas a una concentración de 50 mM de H₂O₂ fue analizada por RT-qPCR. Para estos ensayos, las bacterias cultivadas por 24 h bajo condiciones ácidas y oxidativas fueron cosechadas centrifugándolas a 10.000 x g por 10 min y el pellet bacteriano fue resuspendido en 0.5 ml de TriZol (ThermoFisher Scientific Inc, MA, USA) por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, fue adicionado 0.2 ml de cloroformo, y la mezcla fue incubada a temperatura ambiente por 2-3 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 12.000 × g por 15 min a 4°C. La fase superior incolora, la cual contiene el ARN total, fue transferida a tubos Eppendorf libres de ARNasas, siendo el ARN precipitado con 0.5 ml de isopropanol frío. Luego, el ARN fue lavado con 1 ml de etanol al 80%, secado y resuspendido en H₂O DEPC (dietil pirocarbonato). El ARN total extraído, fue cuantificado usando Tecan infinite m200 (Tecan Trading AG, Suiza) y transformado a ADN complementario (ADNc) mediante transcripción reversa usando el kit para RT-PCR Maxima First Strand cDNA Synthesis (ThermoFisher Scientific Inc, MA, USA). La expresión relativa de los genes de interés para la resistencia al estrés ácido y oxidativo de *B. abortus* fue analizada usando los partidores específicos descritos en las **Tablas 5 y 6** y el reactivo Takyon para ensayos SYBR. La expresión relativa fue cuantificada en el equipo AriaMx Real Time PCR system (Agilent Technologies, CA, USA). El ARN total procedente de *B. abortus* 2308 cultivadas bajo condiciones de pH 7.2 fue utilizado como un control. Los genes *gyrA* y *16s* fueron usados como genes de referencia para todos los ensayos. Todos los ensayos fueron realizados en triplicado.

Tabla 5. Partidores utilizados para cuantificar la expresión relativa de genes expresados por *B. abortus*.

Funciones	Nombre del gen u ORF	Sentido del partidor	Secuencia de 5' a 3'
Genes control	<i>gyrA</i> (BAB1_1121)	Forward	cgcaattctatcggtgtgc
		Reverse	atcgccatcgaaatgacct
	<i>16s</i>	Forward	agctagtgggtgggtaaagg
		Reverse	gctgatcatcctctcagacca
Regulador de virulencia	<i>vjbR</i> (BAB2_0118)	Forward	ttgcgggtgttacggttt
		Reverse	caaggaattgcgtacggctt
	<i>hutC</i> (BAB2_0308)	Forward	ctggaaatccacgatatacgc
		Reverse	cggttcatcagttcaaaacg
	<i>bvrR</i> (BAB1_2092)	Forward	gatgaactctcggcctcaa
		Reverse	aagacgctgcgaaaaagg
Componentes del sistema de secreción tipo IV VirB	<i>virB1</i> (BAB2_0068)	Forward	catccatcatcgcagtcg
		Reverse	gtgctctgtcttcagcctta
	<i>virB5</i> (BAB2_0064)	Forward	gccttcgtctctaccagca
		Reverse	ctaattcgtgctggcgcttc
Proteínas efectoras	<i>btpA</i> (BAB1_0279)	Forward	aagctcctatcaggctaagcaa
		Reverse	tctgcgcgaccttttta
	<i>vceA</i> (BAB1_1652)	Forward	acccaatgcgatgcaaag
		Reverse	cgacaactgtaccaaggcatc
	<i>vceC</i> (BAB1_1058)	Forward	aaatatggaggagttggacacg
		Reverse	tgaaatatcaagcgagctgagt
Regulador transcripcional	BAB1_0273	Forward	caatatatcgaagcgcttattgc
		Reverse	cacctgtccatcttcgagaaa
Función desconocida	BAB1_0627	Forward	ggttagtgctggcctgttg
		Reverse	cagaaggtgggcttctgc

Tabla 6. Partidores utilizados para cuantificar la expresión relativa de genes expresados por *B. abortus* durante estrés oxidativo.

Funciones	<i>B. abortus</i> 2308 ORFs	Partidores	Secuencias
Genes control	<i>gyrA</i> (BAB1_1121)	Forward	cgcaattctatcggtgtgc
		Reverse	atgccatcgaaatgacct
	<i>16s</i>	Forward	agctagtgtggggtaaagg
		Reverse	gctgatcatcctctcagacca
Enzimas antioxidantes	<i>katE</i> (BAB2_0848)	Forward	accatgggtgacgttcctc
		Reverse	gatgagcttcagggtcagca
	<i>ahpC</i> (BAB2_0531)	Forward	cgatctggtcgttgctgata
		Reverse	caacgaaggtgtagcgatagg
	<i>sodC</i> (BAB2_0535)	Forward	gggcattatgatccgggta
		Reverse	atgcccatatgtccatcac
Reguladores Transcripcionales	<i>oxyR</i> (Regulador de <i>katE</i>), (BAB2_0849)	Forward	cttttcgacgaccgtttct
		Reverse	cgaggcgagaaccgtatg
	<i>lysR</i> (Regulador de <i>ahpC</i>) (BAB2_0530)	Forward	tactcgaaacgggcatt
		Reverse	ctcatttgcgcaggettt



4.5. Objetivo 3. Evaluar el rol de esta ZnMP en la adaptación intracelular de *B. abortus* en macrófagos.

4.5.1. Ensayos de adhesión de *B. abortus* a macrófagos RAW264.7.

El rol del ORF BAB1_0270 en la adhesión de *B. abortus* a los macrófagos RAW264.7 fue examinada usando las cepas *B. abortus* 2308-GFP y *B. abortus* Δ 270-GFP mediante el protocolo descrito por Arayan *et al.* (2015). La adhesión bacteriana fue cuantificada cultivando 1×10^5 macrófagos RAW264.7 sobre cubreobjetos redondos de vidrio (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA). Estos macrófagos fueron tratados con 0.5 mg/ml de citocalasina D, un inhibidor de la fagocitosis que impide la internalización de las bacterias. Luego, las células fueron infectadas con las cepas *Brucella*-GFP a una multiplicidad de infección (MOI) de 1:10 por 30 min a 37°C en 5% CO₂. Pasado este tiempo, las células fueron lavadas con PBS, fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% y permeabilizadas con metanol frío (almacenado a -20°C) por 10 segundos. Los filamentos de actina fueron marcados con faloidina conjugada a Alexa Fluor 633 (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) diluido en 1:500 por 1 h a 37°C. Finalmente, las muestras fueron montadas en portaobjetos usando medio de montaje fluorescente DakoCytomation (Dako North America, Inc., USA). Todas las muestras fueron observadas usando el microscopio confocal Zeiss LSM 700 (Zeiss, Oberkochen, Germany). Las imágenes fueron adquiridas y ensambladas usando el software IMARIS. Todos los ensayos fueron realizados en triplicado.

4.5.2. Ensayos de tráfico intracelular de *B. abortus* en macrófagos RAW264.7.

La contribución del ORF BAB1_0270 en el tráfico intracelular de *B. abortus* en macrófagos fue evaluado mediante ensayos de co-localización entre las cepas *B. abortus* 2308-GFP y *B. abortus* Δ 270-GFP, con la proteína de endosomas tempranos EEA1 (del inglés Early Endosome Antigen 1), la proteasa catepsina D de los fagolisosomas y la chaperona calnexina del RE. Para esto, los macrófagos fueron adheridos a cubreobjetos de vidrio e infectados con una MOI de 1:10 de *B. abortus*-GFP por tiempos de 5, 10 o 15 min para el marcador EEA1, y 1 o 12 h para los marcadores catepsina D y calnexina. Pasado este tiempo de infección, los macrófagos fueron fijados con PFA al 4%, permeabilizados con Tritón X-100 al 0.1% e incubados con anticuerpos policlonales primarios de cabra anti-EEA1 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), anti-catepsina D (Abcam, Cambridge, UK) o anticuerpos primarios de conejo anti-calnexina (Abcam, Cambridge, UK) en una dilución de 1:200 por 3 h en cámara húmeda. Todos los anticuerpos fueron diluidos en PBS (7.4 pH) suplementado con albúmina de suero bovino (ASB) 0.5%. Después de la incubación, los cubreobjetos fueron lavados con PBS (pH 7.4) e incubados con anticuerpos IgG secundario conjugado con AF594 anti-IgG de cabra (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) o anticuerpo IgG secundario conjugado a Alexa Fluor 647 anti-IgG de conejo (Abcam, Cambridge, UK) diluido 1:500. Finalmente, las muestras fueron montadas en portaobjetos usando medio de montaje DakoCytomation fluorescent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Todas las muestras fueron observadas usando el microscopio confocal Zeiss LSM 700 (Zeiss, Oberkochen, Germany). Las imágenes fueron adquiridas y ensambladas con el software ImageJ a partir de los datos obtenidos (porcentajes de co-localización) de dos experimentos independientes. Todos los ensayos fueron realizados en triplicado.

4.5.3. Ensayos de sobrevivencia intracelular de *B. abortus* en macrófagos RAW264.7.

El rol del ORF BAB1_0270 en la supervivencia y replicación intracelular de *B. abortus* fue estudiado infectando macrófagos RAW264.7 con las cepas *B. abortus* 2308, *B. abortus* Δ 270 y *B. abortus* Δ 270C. Para esto, 2.5×10^5 macrófagos RAW264.7/pocillo fueron sembrados en placas de 24-pocillos (Nunclon Delta, Denmark) con medio de cultivo DMEM incompleto e incubados por 2 h a 37°C para permitir su adhesión a las placas. En paralelo, las cepas de *B. abortus*, cultivadas por 48 h a 37°C, fueron cosechas en la fase de crecimiento logarítmico por centrifugación (4000 xg por 10 min), resuspendidas en medio DMEM incompleto a una concentración de 2.5×10^6 UFC/ml y adicionadas a los macrófagos adheridos en una MOI de 1:10. Luego, las placas fueron centrifugadas a 500 x g por 10 min para facilitar el contacto entre bacterias y macrófagos, y luego incubadas por 1 h a 37°C en una atmosfera con 5% CO₂. Posteriormente, las bacterias extracelulares fueron eliminadas reemplazando el medio incompleto por DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal más 100 µg/ml de gentamicina y 50 µg/ml de estreptomycin. Las células infectadas fueron incubadas adicionalmente por 6 o 24 h a 37°C en 5% CO₂. La sobrevivencia y replicación intracelular de las cepas *B. abortus* fue cuantificada, colectando los macrófagos infectados en PBS-EDTA (PBS, pH 7.4; EDTA 2 mM) por centrifugación a 160 x g por 10 min y las células posteriormente lisadas agregando una solución de PBS-Tritón X-100 al 0.1% por 5 min a 37°C. El recuento bacteriano fue determinado sembrando las bacterias recuperadas desde los macrófagos lisados en agar Brucella por 72 h a 37°C. Todos los ensayos fueron realizados en triplicados.

4.5.4. Expresión génica de *B. abortus* desde macrófagos RAW264.7 infectados por RT-qPCR.

A partir de los macrófagos infectados con las cepas de *B. abortus* se procedió a evaluar la expresión relativa de diversos genes codificantes de factores de virulencia, tales como el sistema de secreción VirB SST4, las proteínas efectoras translocadas por este sistema de secreción y los factores de transcripción involucrados en la virulencia y la sobrevivencia intracelular de *B. abortus* a las 24 h post-infección (pi) mediante RT-qPCR. Para esto, 1×10^6 macrófagos RAW264.7/pocillo fueron infectados a una MOI de 1:10 por 24 h con las cepas *B. abortus* 2308 y *B. abortus* Δ 270. Luego, el ARN total de bacterias y macrófagos fue extraído con TRIzol de acuerdo a las indicaciones descritas previamente. El ARN total extraído fue cuantificado usando Tecan infinite m200 (Tecan Trading AG, Suiza) y transformado a ADNc mediante transcripción reversa usando el kit Maxima First Strand cDNA Synthesis para RT-PCR (ThermoFisher Scientific Inc, MA, USA). La expresión relativa de los genes de interés fue analizada usando los partidores específicos descritos en la **Tabla 5** y cuantificados usando el kit Takyon q-PCR para ensayos de SYBR por medio de equipo de PCR en tiempo real AriaMx (Agilent Technologies, CA, USA). Los genes *gyrA* y *16s* fueron usados como genes de referencia para todos los ensayos. Todos los ensayos fueron realizados en triplicados.

4.6. Objetivo 4. Evaluar el rol de esta ZnMP en la virulencia de *B. abortus* en la activación o supresión de macrófagos infectados.

4.6.1. Producción de citoquinas por macrófagos infectados con las cepas de *B. abortus*.

La contribución del ORF BAB1_0270 en la atenuación de la virulencia de *B. abortus* dentro de los macrófagos fue analizada mediante la producción de citoquinas pro-inflamatorias TNF- α y IL-6 por ELISA. Para esto, 5×10^5 macrófagos RAW264.7 por pocillo fueron sembrados en placas de 24-pocillos (Nunclon Delta, Denmark) e infectados con las *B. abortus* 2308, *B. abortus* Δ 270 y *B. abortus* 2308i a una MOI de 1:10 bajo las condiciones del cultivo celular descritas en la sección 4.5.3. La secreción de estas citoquinas desde los macrófagos infectados fue cuantificada desde los sobrenadantes de los cultivos celulares tomados a las 6 y 24 h pi. La producción de TNF- α y de IL-6 fue cuantificada mediante ELISA, usando los kits comerciales de eBioscience Mouse TNF alpha y Mouse IL-6 ELISA Ready-SET-Go! (Fisher Scientific, MA, USA). La concentración final de las citoquinas fue cuantificada usando una curva estándar basada en la concentración de las citoquinas TNF- α y IL-6 recombinantes de ratón. Los resultados finales fueron obtenidos usando un lector de ELISA VictorX3 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) a una longitud de onda de 450 nm. Todos los ensayos fueron realizados en triplicados.

4.6.2. Expresión de proteínas co-estimuladoras en macrófagos infectados con cepas de *B. abortus*.

La contribución del ORF BAB1_0270 en la atenuación de la virulencia de *B. abortus* fue estudiada mediante la expresión de proteínas co-estimuladoras CD80 y CD86 desde los macrófagos infectados. Para esto, 5×10^5 macrófagos RAW264.7 por pocillo fueron sembrados en placas de 24-pocillos (Nunc Delta, Denmark) e infectados con las cepas wt, mutante e inactivada a una MOI de 1:10 bajo las condiciones de cultivo descritas previamente. Los grupos controles fueron macrófagos no-infectados (no-estimulados) y estimulados con 5 ug/ml de lipopolisacárido (LPS) derivado de *E. coli* cepa O26:B6 (Sigma-Aldrich). A las 6 h y a las 24 h pi, los macrófagos fueron colectados desde los pocillos, lavados usando PBS-EDTA e incubados con la sonda de viabilidad Zombie Violet (BioLegend, CA, USA) por 30 min. Las células fueron lavadas con PBS-EDTA-BSA y teñidas con anticuerpos anti-CD11b (clone M1/70) conjugados a APC/Cy7, anti-CD80 (clone 16-10A1) conjugado a FITC y anti-CD86 (clone GL-1) conjugado a APC (BioLegend, CA, USA). Todos los anticuerpos fueron diluidos 1:500. Las muestras fueron incubadas por 30 min en oscuridad, lavadas y fijadas con paraformaldehído al 0.5%. Para la adquisición de datos, las células fueron resuspendidas en PBS y analizadas en el citómetro de flujo BD LSR Fortessa X-20 (BD Biosciences, NJ, USA). Los datos fueron analizados usando el software FlowJo (BD Biosciences, NJ, USA). Todos los ensayos fueron realizados en triplicados.

4.6.2. Expresión de proteínas inmunoregulatoras en macrófagos infectados con cepas de *B. abortus*.

El rol del ORF BAB1_0270 en la capacidad de *B. abortus* para modular la fisiología de las células hospederas fue analizada evaluando la sobreexpresión de diversos genes desde los macrófagos infectados mediante RT-qPCR. A partir de esta búsqueda, la expresión del gen *hmx1* codificante de la enzima hemo-oxigenasa-1 (HO-1) desde macrófagos RAW264.7 infectados fue seleccionado debido que es una enzima que participa en la protección celular y en la actividad reguladora de estas células. Para esto, se procedió a infectar 1×10^6 macrófagos con las cepas de *Brucella* en una MOI de 1:10 de acuerdo a lo descrito en la actividad 4.5.3. La extracción del ARN total fue realizada con TriZol de acuerdo a lo descrito en 4.5.4. Este ARN fue transformado a ADNc y la expresión relativa cuantificada usando partidores específicos (**Tabla 7**) por medio de PCR en tiempo real AriaMx (Agilent Technologies, CA, USA). El gen *gapdh* fue usado como referencia para todos los ensayos. Todos los ensayos fueron realizados en triplicado. Posteriormente, para evaluar el rol de la enzima HO-1 en la infección de macrófagos por cepas de *B. abortus*, los macrófagos fueron pre-tratados por 1 h con $10 \mu\text{M}$ de cloruro de hemina, un agonista de esta enzima o con $10 \mu\text{M}$ de zinc protoporfirina, un inhibidor de HO-1. Pasado este tiempo, los macrófagos fueron lavados tres veces e infectados con *B. abortus* 2308 y *B. abortus* Δ 270 a una MOI de 1:10 y la sobrevivencia intracelular de estas cepas fue cuantificada mediante un recuento de UFC/ml de acuerdo a la metodología descrita en 4.5.3. Todos los ensayos fueron realizados en triplicados.

Tabla 7. Partidores para hmox1 codificante de la enzima HO-1 en macrófagos.

Funciones	Gen	Partidores	Secuencias
Control	<i>β-tubulina</i>	Forward	GATCGGTGCTAAGTTCTGGGA
		Reverse	AGGGACATACTTGCCACCTGT
Proteína inmunoreguladora	<i>Hmox-1</i> (HO-1)	Forward	CAGAGCCGTCTCGAGCATAG
		Reverse	AAATCCTGGGGCATGCTGTC

4.7. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos desde los ensayos de adhesión y co-localización intracelular fueron analizados con un T-test. La sobrevivencia intracelular de las bacterias, la producción de citoquinas, la expresión de proteínas co-estimuladoras, el crecimiento bacteriano bajo condiciones de estrés ácido y oxidativo fueron analizadas por medio de un análisis de varianza de dos vías (ANOVA). Los cambios en el pH de los cultivos de las cepas *B. abortus* fue analizada mediante una regresión lineal simple. La expresión de genes de las cepas de *B. abortus* y de los macrófagos infectados fue analizada por un test no paramétrico Mann-Whitney U. Todos los análisis fueron realizados en el software GraphPad Prism 8. Los resultados fueron expresados como el promedio \pm desviación estándar. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

5. Resultados

5.1. Objetivo 1. Caracterizar una metaloproteinasa dependiente de zinc (ZnMP) codificada en el ORF BAB1_0270 de *B. abortus*.

5.1.1. Parámetros fisicoquímicos y modelamiento de la proteína ZnMP.

Los análisis *in silico* muestran que el ORF BAB1_0270 de *B. abortus* 2308 posee una secuencia nucleotídica de 549 pb, el cual codifica la proteína ZnMP de 182 aminoácidos (aa). Esta proteína posee un peso molecular de 21.023,04 Da y un punto isoelectrico (pI) de 6.01. El tiempo de vida media de esta proteína en *E. coli* fue mayor a las 10 h (*in vivo*), mientras que el índice alifático y el valor GRAVY presentaron valores de 73.96 y -0.423, respectivamente, indicando que esta ZnMP posee una estabilidad a un amplio rango de temperaturas para su expresión y es clasificada como una proteína hidrofílica. La predicción de su estructura 3D fue desarrollada a través de modelos comparativos usando el servidor I-TASSERs, demostrando que la estructura secundaria de la proteína ZnMP contiene 7 α -hélices, 4 láminas- β y 12 coils. El modelo final fue validado mediante un análisis con el software ProSa-web, mostrando que esta ZnMP posee un Z-score de -4.52 (**Figura 4A**), lo cual ubica a esta proteína en la categoría de las proteínas nativas que son expresada principalmente en el citoplasma de *B. abortus* (4.018 de confiabilidad). El modelo 3D final se muestra en la **Figura 4B**.

Overall model quality

Z-Score: **-4.52**

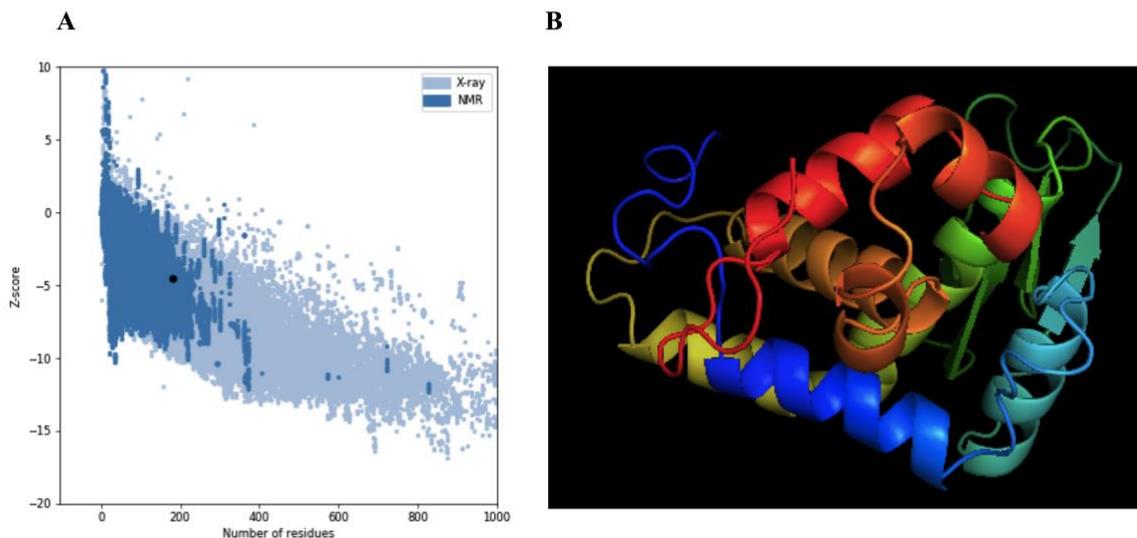


Figura 4. Modelamiento de la ZnMP codificada en el ORF BAB1_0270 de *B. abortus*.

A) El Z-score del modelo final de la estructura 3D de la proteína ZnMP después de su refinamiento fue de -4.52, representado por el punto negro. B) Estructura 3D de acuerdo al servidor I-TASSER después de ser refinado y visualizado mediante el software Chimera PyMOL.

5.1.2. Expresión y purificación de la proteína ZnMP.

En base a las predicciones fisicoquímicas, la proteína ZnMP de *B. abortus* fue expresada y purificada, transformando la cepa *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido recombinante pColdII-ZnMP (Figura 5A). Los resultados mostraron que la expresión esta proteína fue inducida con 1 mM de IPTG, encontrándose en los cuerpos de inclusión de la fase insoluble (Figura 5B). Estos agregados proteicos fueron solubilizados exitosamente con un buffer que contiene el agente caotrópico urea (buffer 50 mM Tris-HCl, Urea 8M, 10 mM DTT, pH 8.0). Las proteínas solubilizadas fueron purificadas con columnas HisTrap y recuperadas en buffer Tris-EDTA-PMSF. La visualización de esta proteína fue realizada mediante Western Blot, demostrando que esta proteína ZnMP posee una masa molecular aproximada de 22.500 Da,

un valor similar al descrito por las predicciones *in silico*, lo cual indica que esta ZnMP es una proteína nativa en *B. abortus* (Figura 5C).

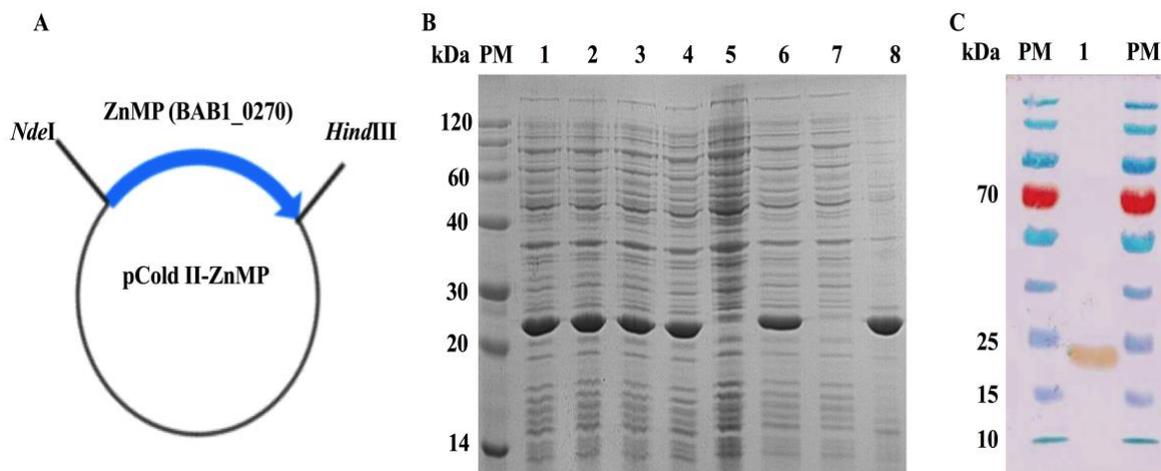


Figura 5. Expresión y Purificación de ZnMP codificado en el ORF BAB1_0270 de *B. abortus* 2308. A) La secuencia de ZnMP fue clonada en el vector de expresión pColdII (pColdII-ZnMP) inserto con las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII*. El vector recombinante fue usado para transformar a *E. coli* BL21 (DE3). B) La visualización de la expresión de la proteína ZnMP fue inducida con IPTG y visualizada mediante SDS-PAGE, donde PM: marcador de peso molecular (kDa); carriles 1-4: proteínas totales inducidas; carril 5: proteínas totales no-inducidas; 6: proteínas totales inducidas; carril 7: sobrenadante del lisado; carril 8: Precipitación del lisado. C) La purificación de la proteína ZnMP fue confirmada mediante Western Blot usando anticuerpos anti-6x-HisTag. PM: Marcador de peso molecular (kDa); carril 1: proteína recombinante purificada.

5.1.3. Caracterización genómica del ORF BAB1_0270 en *B. abortus*.

La caracterización del ORF BAB1_0270 en su contexto genómico dentro de la IG-3 de *B. abortus* 2308 fue estudiada mediante una aproximación *in silico* y a través de ensayos de RT-PCR. Los resultados muestran que esta proteína posee homología con las metaloproteinasas de la familia ImmA/IrrE caracterizadas por tener dominios conservados COG2856 y motivos conservados HEXXH. La búsqueda bioinformática demostró que esta ZnMP forma una unidad transcripcional (operón) con un regulador transcripcional-Xre (WP_002967122.1). Este operón se encuentra localizado en la región 270612-271513 del cromosoma I en la cepa *B. abortus* 2308 (NC_007618.1). Estas observaciones bioinformáticas fueron analizadas experimentalmente mediante RT-PCR y los resultados obtenidos confirman que el ARN mensajero (ARNm) de *B. abortus* 2308 amplifica un amplicón de 906 pb que contiene al ORF BAB1_0270 de 549 pb y a un regulador transcripcional de 357 pb. Este amplicón fue encontrado en el ADN genómico de *B. abortus* 2308 y este mismo amplicón fue obtenido desde el ADNc (**Figura 6A y B**).

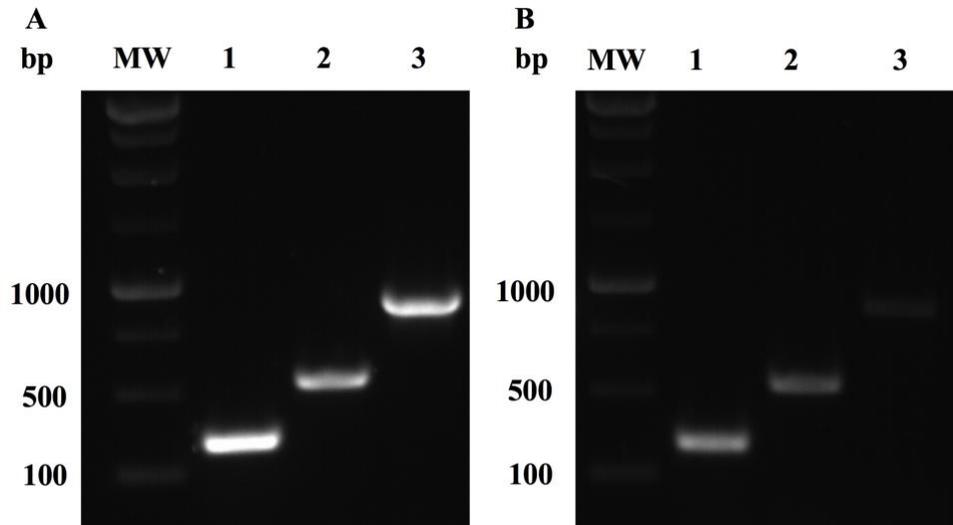


Figura 6. Operón formado por ZnMP y un regulador transcripcional-Xre en *B. abortus*. Identificación de una unidad transcripcional (operón) constituida por el ORF BAB1_0270 y un regulador transcripcional de la familia Xre en *B. abortus* 2308. Este operón es expresado en **A**) el ADN genómico de *B. abortus* 2308 y en **B**) el ADNc procedente del ARN total. MW: peso molecular; carril 1: regulador transcripcional (357 pb); carril 2: BAB1_0270 (549 pb); y carril 3: operón constituido por el ORF BAB1_0270-regulador transcripcional (amplicón de 906 pb).

Estos resultados demuestran que ambos genes son transcritos juntos dentro de una sola molécula de mRNA, demostrándose que la secuencia del ORF BAB1_0270 comparte los cuatro nucleótidos iniciales (ATGA) con la región terminal del gen codificante para el regulador transcripcional. Este regulador transcripcional está constituido por una secuencia nucleotídica de 357 pb que se traduciría a una proteína de 118 aa, caracterizada por contener un dominio Hélice-giro-Hélice (HTH, del inglés Helix-turn-Helix) de la familia Xre (**Figura 7**). Además, este operón contiene un promotor en las regiones -35 y -10 reconocido por los factores sigma rpoD de la ARN polimerasa (**Figura 7**). Esta unidad transcripcional de *B. abortus* 2308 es equivalente al operón codificado por los ORFs BruAb1_0264 y

BruAb1_0263 de *B. abortus* biovar 1 cepa 9-941, el cual ha sido descrito de acuerdo a la base de datos Toxin-antitoxin TADB2.0 (Xie *et al.*, 2018), como un sistema toxina-antitoxina tipo II. En base a estos resultados, se describe en la **Figura 7** un modelo hipotético de un sistema Toxina-Antitoxina (TA) tipo II para este operón constituido por la proteína ZnMP y el factor de transcripción-Xre en *B. abortus* cepa 2308.

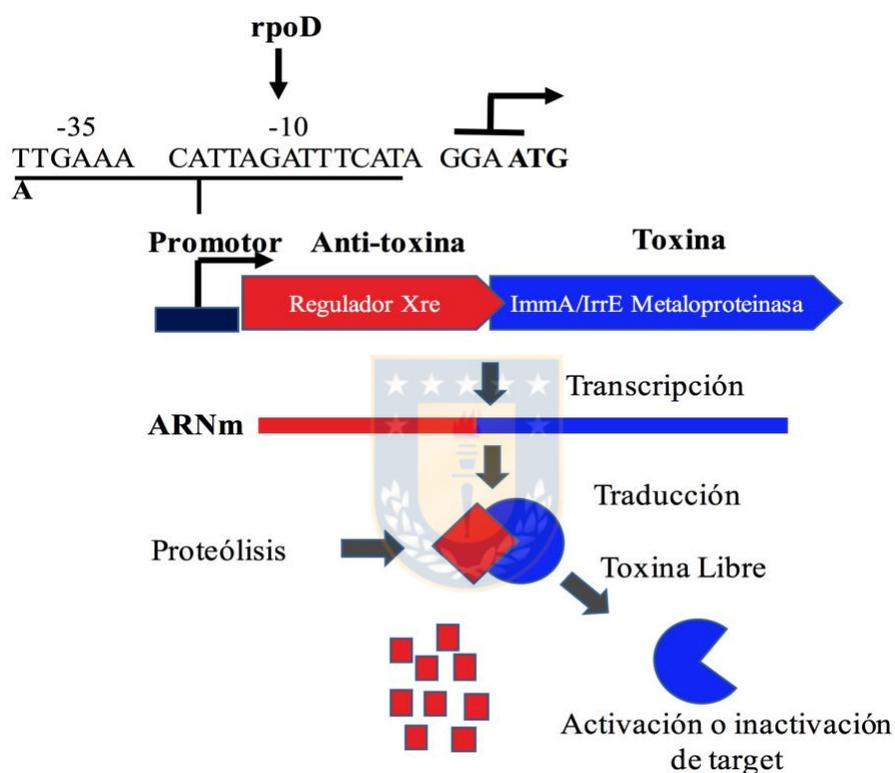


Figura 7. Modelo hipotético de un sistema toxina-antitoxina tipo II constituido por la proteína ZnMP y el regulador transcripcional Xre. En este modelo, la toxina (ZnMP) y la anti-toxina (regulador transcripcional-Xre) son transcritos juntos en el ARNm. La proteasa es activada bajo condiciones de estrés, clivando la antitoxina, lo cual incrementa los niveles de toxina libre que induce varias funciones biológicas en la bacteria. El promotor predicho en el sitio -35 y -10 de unión por un factor sigma *rpoD* ARN polimerasa. ATG A: nucleótidos compartidos entre la parte final del factor transcripcional y la ZnMP codificada en el ORF BAB1_0270 de *B. abortus* 2308.

5.2. Objetivo 2. Determinar la importancia de la proteína ZnMP en la sobrevivencia de *B. abortus* bajo condiciones de estrés ácido y oxidativo.

5.2.1. Crecimiento de *B. abortus* Δ 270 bajo condiciones de estrés ácido.

La contribución de la proteína ZnMP en el crecimiento de *B. abortus* bajo condiciones de pH ácidas fue estudiada. Los resultados obtenidos mediante las curvas de crecimiento para la cepa *B. abortus* Δ 270 mostraron que la delección de la proteína ZnMP redujo significativamente la capacidad de la cepa mutante para adaptarse en la fase lag, comparado con las cepas *B. abortus* 2308 o complementada en un medio de cultivo con un pH 5.5 ($P < 0.0001$) (**Figura 8A**). La cepa mutante *B. abortus* Δ 270 permaneció en la fase lag o de adaptación desde las 6 h hasta las 72 h de cultivo, retrasando su ingreso en la fase de crecimiento logarítmica hasta las 72 h (crecimiento exponencial). En este punto, fueron registradas las mayores diferencias estadísticas entre la cepa mutante y la cepas wt y complementada ($P < 0.0001$). Las cepas wt y complementada mostraron un curvas de crecimiento similares bajo estas condiciones de pH ácido con una fase lag que se extendió hasta las 48 h, y con una fase exponencial iniciada desde las 72 h hasta las 96 h. Aunque *B. abortus* Δ 270 desarrolló curvas de crecimiento diferentes a las cepas *B. abortus* 2308 y *B. abortus* Δ 270C bajo estas condiciones de cultivo ácido, los análisis de correlación lineal respecto al cambio del pH del medio mostraron que las tres cepas alcalinizaron el pH del medio desde un pH 5.5 hasta valores de aproximadamente 8, sin registrarse diferencias significativas entre ellas ($P > 0.05$) (**Figura 8B**). Estos resultados demuestran que esta ZnMP es requerida en la adaptación de *B. abortus* a ambientes ácido.

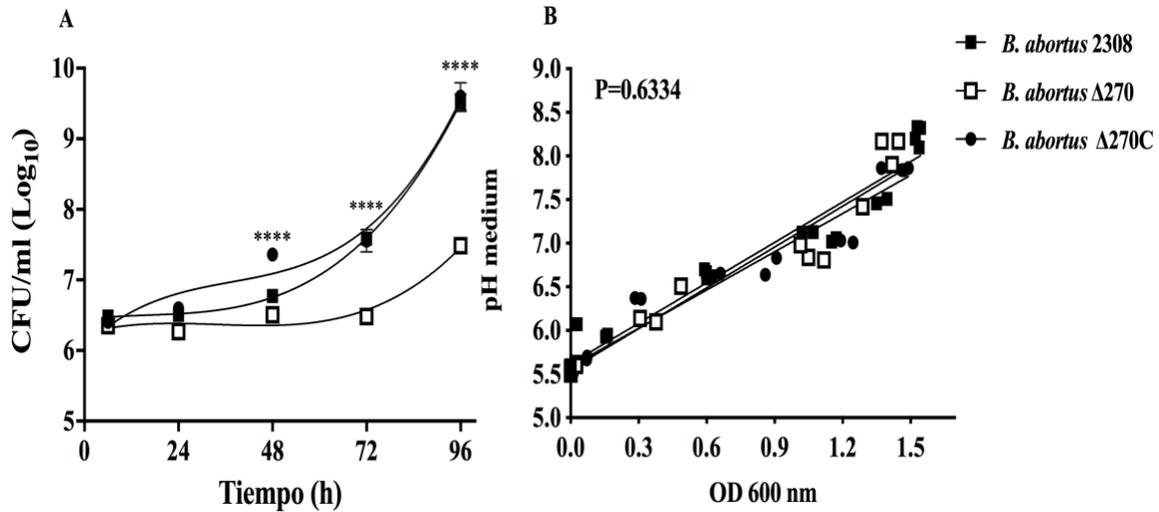


Figura 8. Crecimiento de *B. abortus* Δ270 bajo condiciones de estrés ácido. A) Curvas de crecimiento desarrolladas por las cepas *B. abortus* 2308, *B. abortus* Δ270 y *B. abortus* Δ270C cultivadas en medio ácido (pH 5.5). B) Análisis de regresión lineal de los cambios en el pH del medio de cultivo durante su crecimiento de las cepas *Brucella*. Los resultados fueron expresados como el promedio \pm desviación estándar. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos, donde **** denota valores de $P < 0.0001$. Todos los ensayos fueron realizados en triplicados.

5.2.2. Expresión relativa de genes de *B. abortus* Δ270 bajo condiciones de estrés ácido.

El rol de la proteína ZnMP en la expresión relativa de diversos genes involucrados en la virulencia y adaptación intracelular de *B. abortus* en macrófagos fue evaluada durante el crecimiento de *B. abortus* Δ270 por 24 h en un cultivo a pH 5.5. Los resultados muestran que bajo estas condiciones de pH ácido, la cepa mutante *B. abortus* Δ270 expresó niveles significativamente menores en los genes *bvrR*, *vjbR*, *hutC*, *virB1*, *virB2*, *virB5*, *vceA*, *vceC* y *btpA*, comparado con la cepa *B. abortus* 2308 ($P < 0.05$) (Figura 9). Estos resultados sugieren que la delección de la proteína ZnMP reduce la capacidad de *B. abortus* para adaptarse y crecer bajo las condiciones de pH ácido.

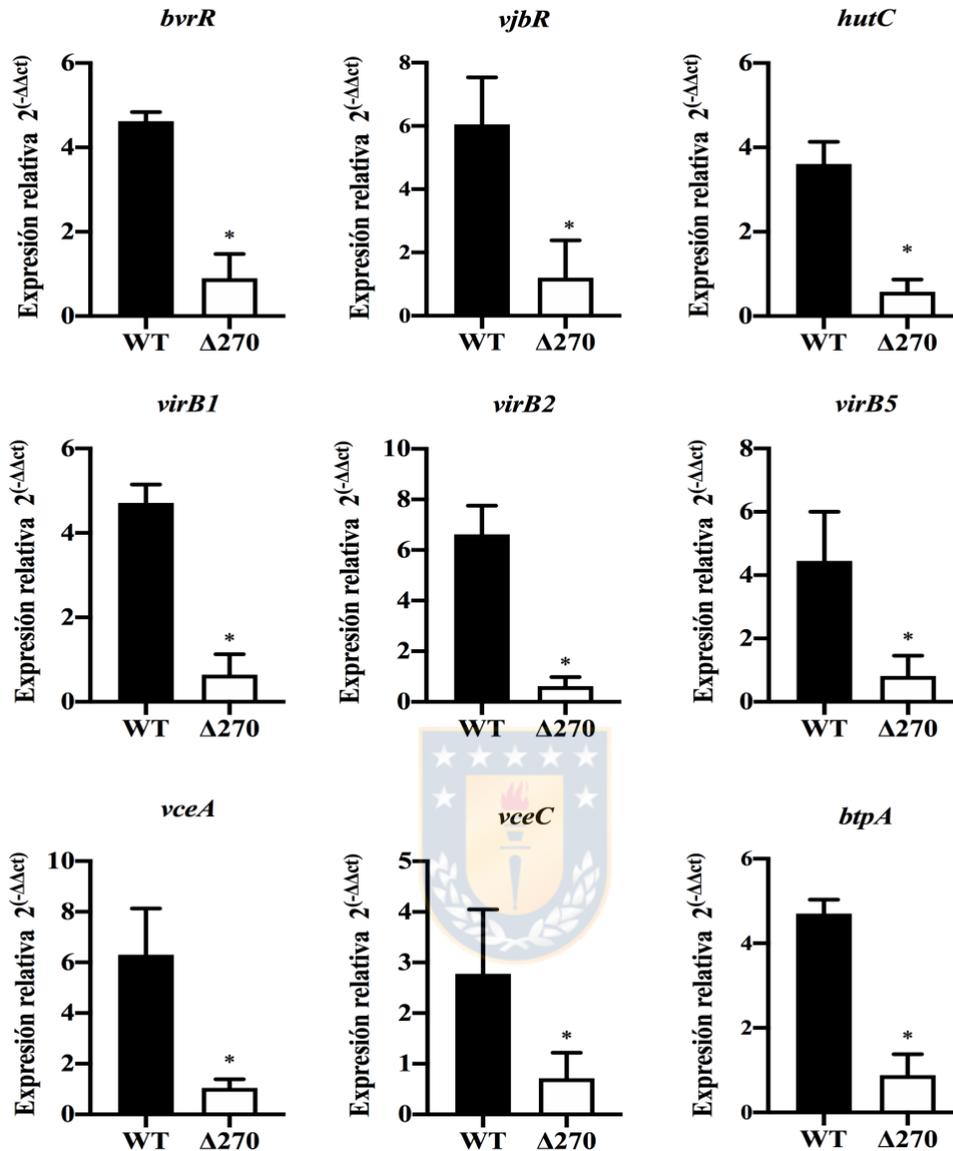


Figura 9. Expresión génica en *B. abortus* cultivadas bajo condiciones de estrés ácido. La expresión relativa *bvrR*, *vjbR*, *hutC*, *virB1*, *virB2*, *virB5*, *btpA*, *vceA* y *vceC* inducida en las cepas *B. abortus* 2308 y *B. abortus* $\Delta 270$ cultivadas en medio con pH 5.5 fue analizada a las 24 h de cultivo mediante qPCR. Los genes *gyrA* y *16s* fueron usados como genes de referencia. Los resultados fueron expresados como el promedio \pm desviación estándar. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. * denota valores de $P < 0.05$. Todos los ensayos fueron realizados en triplicados.

5.2.3. Resistencia de *B. abortus* Δ 270 bajo condiciones de estrés oxidativo.

El rol de la proteína ZnMP en la tolerancia de *B. abortus* frente a diversas concentraciones de H₂O₂ fue analizado. Estas cepas fueron expuestas a concentraciones que van desde 0.05 hasta 1.2 M de H₂O₂ durante 20 min. Los resultados muestran que una concentración de 0.05 M de H₂O₂ no produce cambios observables en la sobrevivencia de ninguna de las tres cepas estudiadas (**Figura 10**). Sin embargo, concentraciones de 0.4 M hasta 1.2 M de H₂O₂ producen una elevada toxicidad en *B. abortus* Δ 270, reduciendo significativamente su viabilidad en comparación con las cepas wt y complementada. Las cepas wt y complementada mostraron una mayor capacidad para tolerar la toxicidad de este compuesto hasta los 0.8 M de H₂O₂. Concentraciones de 1 y 1.2 M de H₂O₂ afectaron significativamente su viabilidad (**Figura 10**). Estos resultados demostrarían que esta ZnMP es requerida por *B. abortus* para tolerar ambientes con elevados niveles de estrés oxidativo.



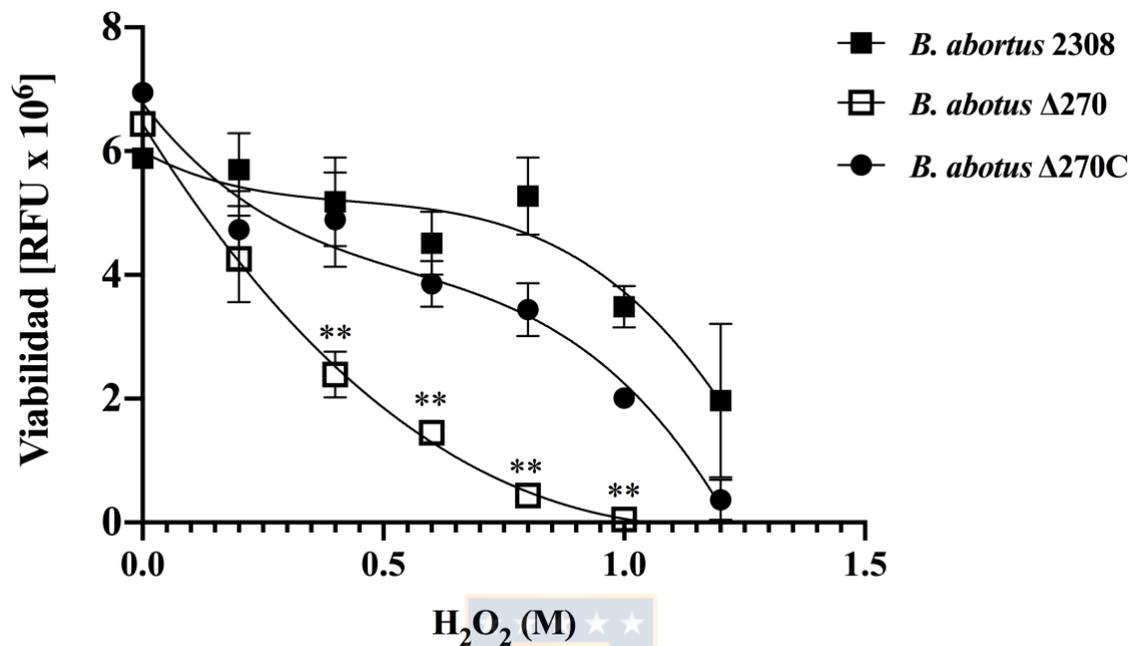


Figura 10. Rol de la ZnMP en el crecimiento de *B. abortus* Δ270 bajo condiciones de estrés oxidativo. Las cepas *B. abortus* 2308, *B. abortus* Δ270 y *B. abortus* Δ270C fueron expuestas a 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 M H₂O₂ por 20 min y su viabilidad cuantificada a 590 nm. Los resultados se muestran como el promedio ± desviación estándar. Todos los ensayos fueron realizados en triplicado.

5.2.4. Expresión relativa de genes de *B. abortus* Δ270 bajo condiciones de estrés oxidativo.

El rol de la proteína ZnMP en la expresión relativa de algunos genes involucrados en la tolerancia de *B. abortus* a ambientes oxidativos fue evaluada a las 24 h de crecimiento de *B. abortus* Δ270 en un cultivo con 50 mM de H₂O₂. Los resultados mostraron que bajo estas condiciones oxidativas, la cepa *B. abortus* Δ270 expresó niveles significativamente menores de los genes codificantes para enzimas involucradas en la respuesta antioxidante de esta bacteria, tales como *katE*, *sodC* y *ahpC* comparado con la cepa *B. abortus* 2308 ($P < 0.05$) (**Figura 11**). Además, en esta cepa mutante fue registrado una expresión significativamente menor de los genes *oxyR* (BAB2_0848) y *lysR* (BAB2_0530), comparado con la cepa wt ($P < 0.05$), genes que codifican proteínas reguladoras de la expresión respectiva de *katE* y *ahpC*. Estos resultados sugieren que la delección de esta ZnMP, reduce la capacidad de *B. abortus* para tolerar la toxicidad del H₂O₂, lo cual estaría asociado a una regulación negativa en la expresión de enzimas requeridas en los procesos de destoxicación de agentes peroxidantes en este patógeno.

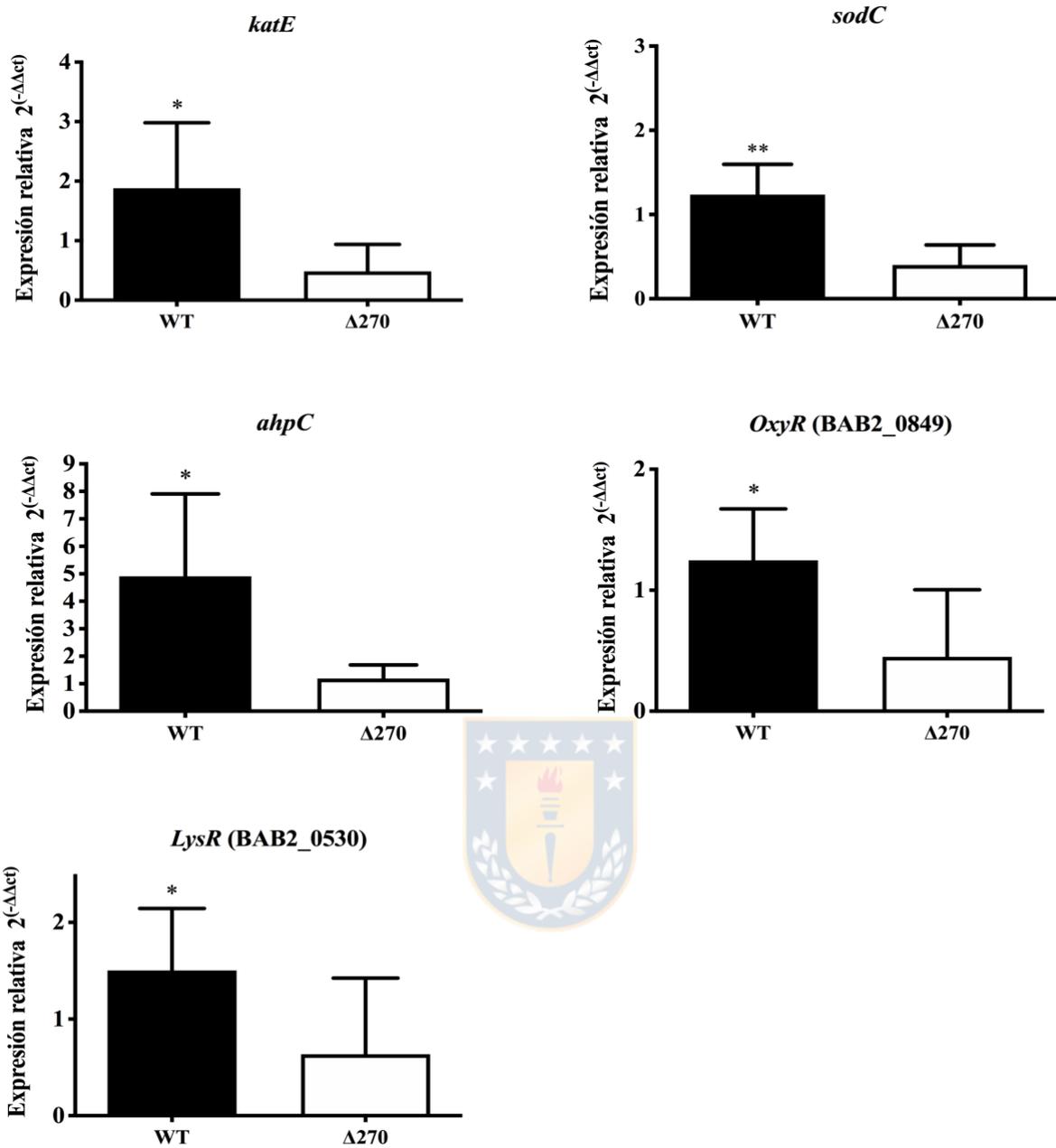


Figura 11. Expresión relativa de los genes involucrados en la resistencia a peróxidos. A) *katE*; B) *sodC* y C) *ahpC* codificantes de las enzimas KatE, SOD y AhpC. Estas enzimas fueron inducidas en *B. abortus* 2308 y *B. abortus* Δ270 cultivadas por 24 h en medio con 50 mM de H₂O₂. La expresión de estos genes fue evaluada por qPCR. Los genes *gyrA* y *I6s* fueron usados como genes de referencias. Los resultados fueron expresados como el promedio ± desviación estándar. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Todos los ensayos fueron realizados en triplicados.

5.3. Objetivo 3. Evaluar el rol de esta ZnMP en la adaptación intracelular de *B. abortus* en macrófagos.

5.3.1. Adhesión y tráfico intracelular de *B. abortus* Δ 270 en macrófagos RAW 264.7

La infección de macrófagos por *B. abortus* requiere de la adhesión, invasión y el desarrollo de un nicho replicativo asociado a vesículas derivadas del RE. El rol del ORF BAB1_0270 en este proceso, fue evaluado infectando macrófagos RAW264.7 con la cepa *B. abortus* Δ 270. Esta cepa mutante mostró niveles de adhesión a los macrófagos comparables a la cepa wt, siendo estadísticamente similares ($P > 0.05$) (**Figura 12A y B**). Posteriormente, su tráfico intracelular fue evaluada a través de la co-localización de estas cepas con la proteína EEA1, mostrando que a los 5 min pi no se producen diferencias significativas entre las cepas *B. abortus* Δ 270 y *B. abortus* 2308 ($P > 0.05$). Sin embargo, a los 10 min pi fueron observados en la cepa mutante niveles de co-localización significativamente menores que la cepa wt ($P < 0.001$), mientras que a los 15 min pi la cepa mutante adquiere mayores niveles de co-localización con EEA1 que *B. abortus* 2308 ($P < 0.05$) (**Figura 13C y D**). Luego, a las 1 h pi ambas cepas mostraron niveles similares de co-localización con cathepsina D, una proteasa fagolisosomal ($P > 0.05$) (**Figura 13E y F**); sin embargo, a las 12 h pi fueron registradas diferencias entre ambas cepas, siendo la cepa *B. abortus* Δ 270 la que presentó niveles significativamente mayores de co-localización con cathepsina D, que la cepa *B. abortus* 2308 ($P < 0.01$) (**Figura 13E y F**). Adicionalmente, a 1 h pi ambas cepas mostraron niveles similares de co-localización con calnexina ($P > 0.05$), una proteína chaperona presente en las vesículas derivadas del RE: sin embargo, a las 12 h pi la cepa mutante alcanzó niveles de co-localización significativamente menores que la cepa wt ($P < 0.01$) (**Figura 13G y H**). Estos resultados sugieren que la delección de esta ZnMP reduce la capacidad de *B. abortus* Δ 270

para escapar desde los compartimentos fagolisosomales (catepsina D), lo cual afectaría significativamente su capacidad para alcanzar las vesículas derivadas del RE de macrófagos.

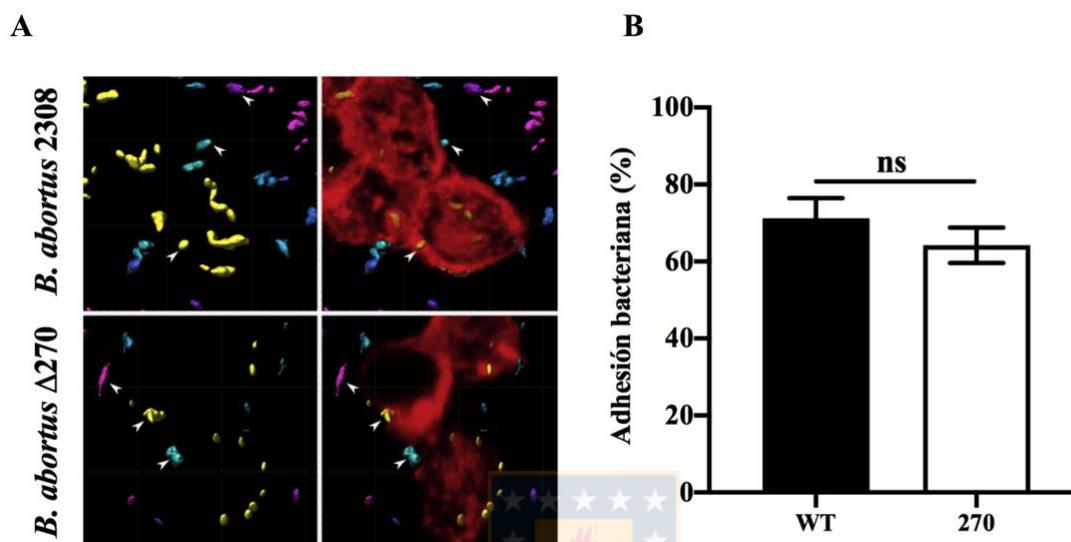


Figura 12. Adhesión de *B. abortus* Δ270 a macrófagos RAW264.7. A) Macrófagos fueron tratados con citocalasina D (0.5 mg/ml) e infectados con las cepas *B. abortus* 2308 y *B. abortus* Δ270 por 30 min. Las imágenes muestran la proximidad de estas bacterias a los macrófagos RAW264.7 marcados con faloidina conjugada a AF633 para marcar a los macrófagos (rojo). El color cian representa las bacterias con una proximidad menor a 5 mm de macrófagos, el purpura representa bacterias con una proximidad mayor a 5 mm de los macrófagos, y el amarillo representa bacterias adheridas a los macrófagos. B) La adhesión es expresada por el porcentaje de bacterias (amarillo) adheridas a los macrófagos RAW264.7. Los resultados son expresados como el promedio \pm desviación estándar. ns: no significativo. Todos los ensayos fueron realizados en triplicados.

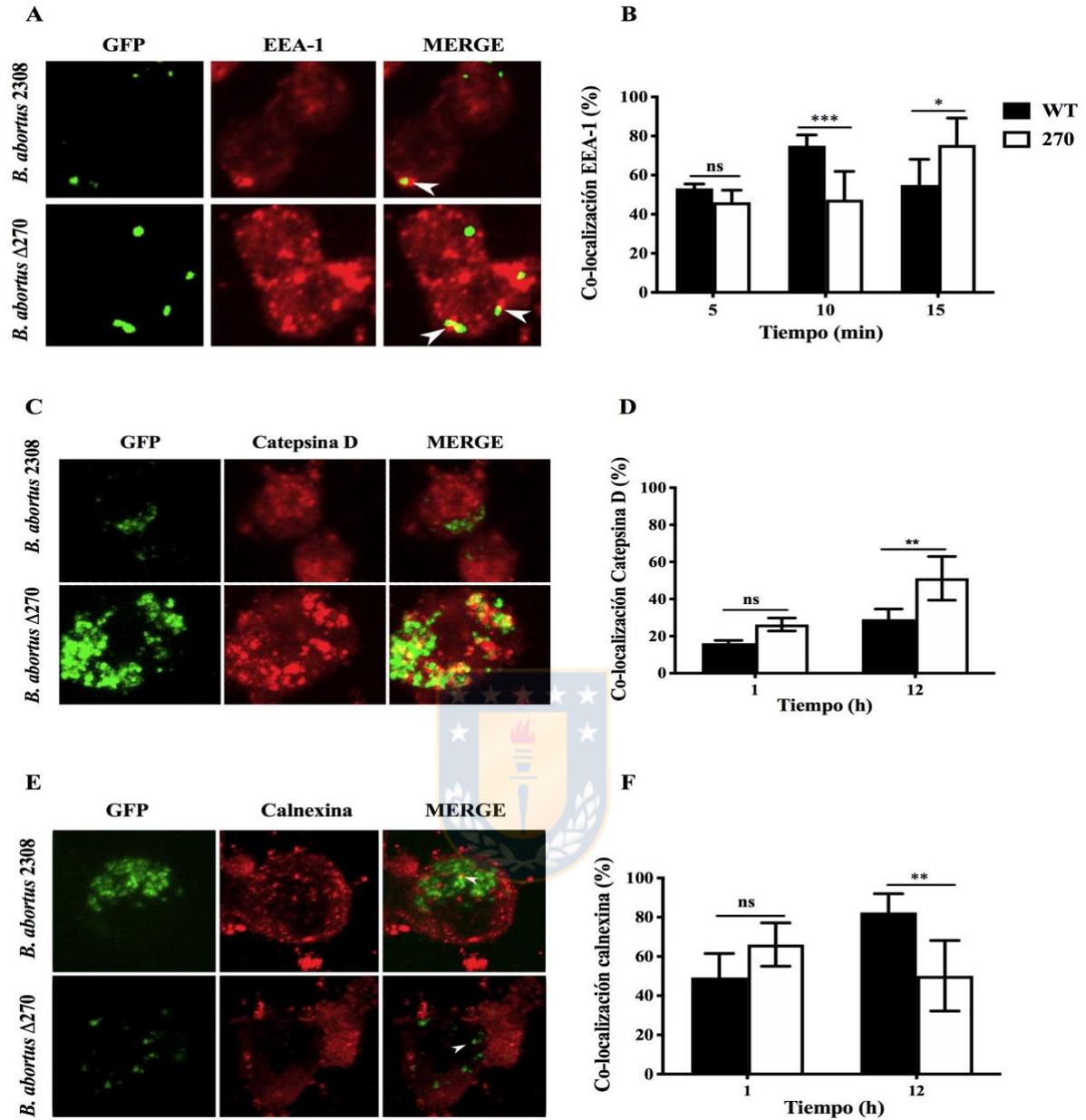


Figura 13. Tráfico intracelular de cepas *B. abortus* en macrófagos RAW267.4. Las imágenes muestran la co-localización de las cepas *B. abortus*-GFP con **A)** EEA1 a los 5, 10 y 15 min pi, **C)** con catepsina D a 1 y 12 h pi y **E)** con calnexina a 1 y 12 h pi. **B)** porcentajes de co-localización de las cepas de *B. abortus*-GFP con EEA1 a los 5, 10 y 15 min pi; **D)** con catepsina D a 1 h y 12 h pi, y **F)** con calnexina a 1 y 12 h pi. Los resultados son expresados como el promedio \pm desviación estándar. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos, donde ns: no significativo, mientras que *, ** y *** denotan valores de $P < 0.05$, $P < 0.01$ y $P < 0.001$, respectivamente. Todos los ensayos fueron realizados en triplicados.

5.3.2. Supervivencia intracelular de *B. abortus* Δ 270 en macrófagos RAW264.7.

B. abortus es un patógeno que se replica dentro de las vacuolas de los macrófagos. El rol del ORF BAB1_0270 en la supervivencia intracelular de *B. abortus* Δ 270 fue evaluado en macrófagos RAW264.7 a las 6 y 24 h pi. Los resultados muestran que a las 6 h pi, la cepa mutante presenta un recuento de UFC/ml significativamente menor que *B. abortus* 2308 ($P < 0.001$) y que la cepa complementada ($P < 0.01$). Recuentos similares fueron mantenidos por *B. abortus* Δ 270 desde las 6 h hasta las 24 h, un tiempo donde las diferencias en la replicación intracelular de esta mutante y las cepas *B. abortus* 2308 y *B. abortus* Δ 270C están significativamente incrementadas ($P < 0.0001$) (**Figura 14**). A las 24 h pi, la cepa *B. abortus* 2308 se caracterizó por alcanzar una robusta replicación intracelular en los macrófagos, siendo significativamente mayor que la cepa mutante y la complementada. En este tiempo, la cepa *B. abortus* Δ 270C mostró niveles de replicación significativamente mayores que la cepa mutante *B. abortus* Δ 270, pero menores que la cepa wt *B. abortus* 2308. Estos resultados demuestran que la delección de ZnMP afecta negativamente la capacidad de replicación intracelular de *B. abortus* Δ 270 en macrófagos.

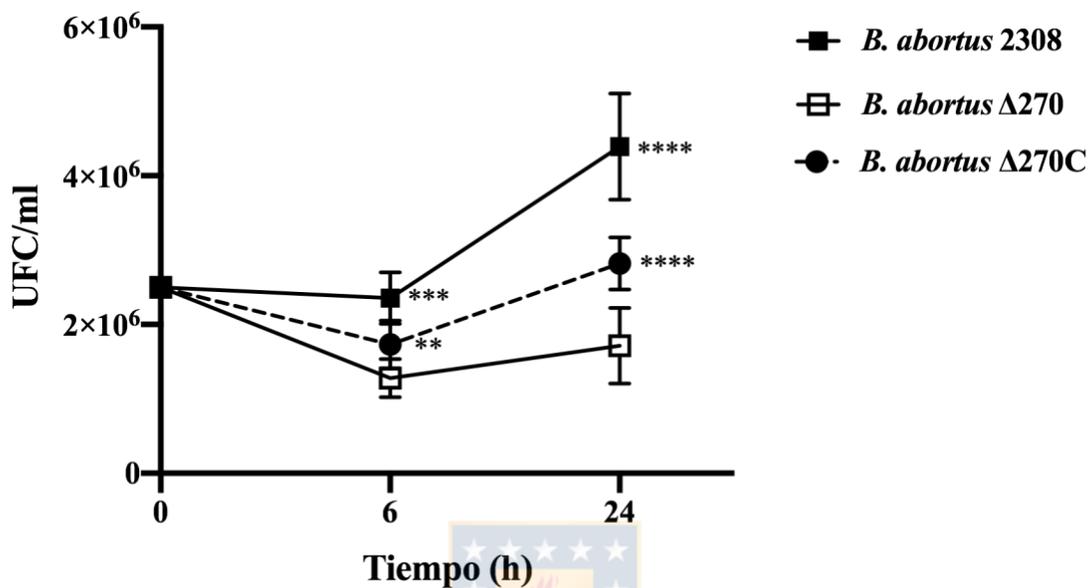


Figura 14. Sobrevivencia intracelular de *B. abortus* en macrófagos. La sobrevivencia intracelular fue obtenido mediante el recuento de cepas *B. abortus* 2308, *B. abortus* Δ270 o *B. abortus* Δ270C vivas recuperadas desde el interior de macrófagos infectados (MOI de 1:10) a las 6 h y 24 h pi. La sobrevivencia intracelular fue registrada como el promedio ± desviación estándar del recuento bacteriano cuantificado como UFC/mL. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticos significativos. **, *** y **** denotan valores de $P < 0.01$, $P < 0.001$ y $P < 0.0001$, respectivamente. Todos los ensayos fueron realizados en triplicados.

5.3.3. Expresión génica de *B. abortus* Δ 270 durante la infección de macrófagos RAW264.7.

B. abortus es una bacteria que sobrevive en el interior de macrófagos mediante la expresión de diversos factores de virulencia. La expresión de genes involucrados en la sobrevivencia intracelular de *B. abortus* en macrófagos fueron cuantificados a las 24 h pi. Los resultados muestran que los genes *bvrR* ($P < 0.05$), *vjbR* ($P < 0.01$) y *hutC* ($P < 0.01$), codificantes de reguladores transcripcionales de la virulencia y de la respuesta al estrés (por ej. estrés ácido), del quorum sensing (QS) o de la expresión de factores de virulencia (por ej. VirB SST4), fueron significativamente incrementados en *B. abortus* Δ 270 (**Figura 15**). Además, el gen *virB1* mostró una regulación positiva en esta cepa mutante ($P < 0.05$). Sin embargo, los genes *virB2* y *virB5* no mostraron diferencias significativas comparados con la cepa wt (**Figura 15**). Por otro lado, entre los genes codificantes de proteínas efectoras (*vceA*, *vceC* y *btpA*), el gen *vceA* mostró una regulación negativa en *B. abortus* Δ 270 comparada con la cepa wt ($P < 0.05$), mientras que los genes *vceC* y *btpA* no mostraron diferencias significativas respecto a la expresión de estos genes en *B. abortus* 2308 ($P > 0.05$). Finalmente, la expresión de los ORFs BAB1_0273, codificantes de un regulador transcripcional hipotético, y el BAB1_0627, un ORF codificante de una proteína hipotética con funciones desconocidas, fueron regulados negativamente en *B. abortus* Δ 270 ($P < 0.05$). Estos resultados demuestran que la delección de ZnMP afecta negativamente la sobrevivencia intracelular de *B. abortus* Δ 270, mediante una desregulación en la expresión de diversos genes requeridos en la infección de macrófagos y que están involucrados en la virulencia y sobrevivencia intracelular de este patógeno.

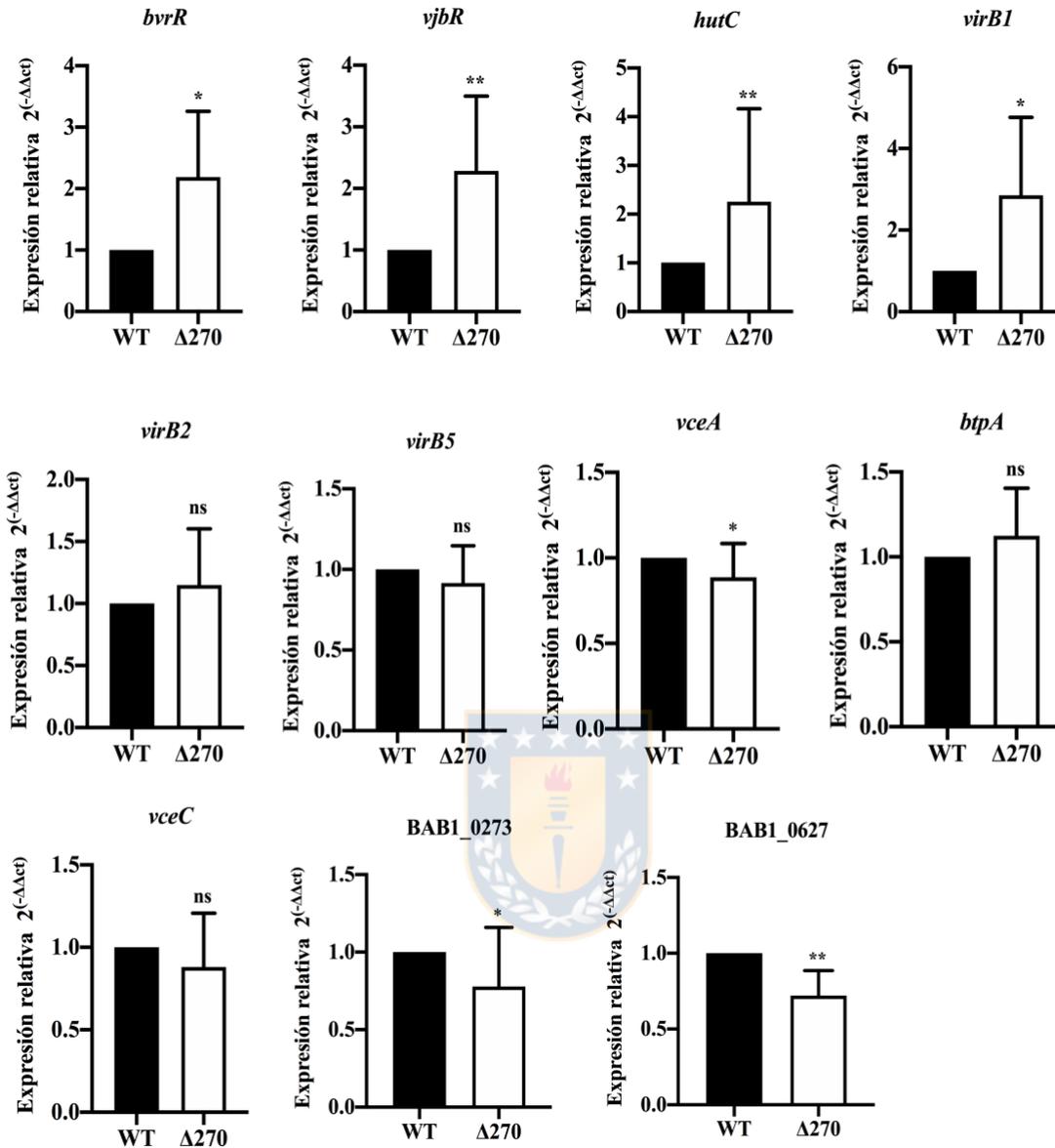


Figura 15. Expresión génica de las cepas de *B. abortus* durante la infección de macrófagos. La expresión relativa de *bvrR*, *vjbR*, *hutC*, *virB1*, *virB2*, *virB5*, *vceA*, *vceC* y *btpA* inducidas en *B. abortus* 2308 (wt) y *B. abortus* Δ270 durante la infección de macrófagos fue analizada a las 24 h pi a través de qPCR. Los genes *gyrA* y *16s* fueron usados como genes de referencia. Los resultados fueron expresados como el promedio ± desviación estándar. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos, donde ns: no significativo, mientras que * y ** denotan valores de $P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente. Todos los ensayos fueron realizados en triplicados.

5.4. Objetivo 4. Evaluar el rol de esta ZnMP en la virulencia de *B. abortus* en la activación o supresión de macrófagos infectados.

5.4.1. Respuesta de macrófagos infectados con *B. abortus* Δ270.

Los macrófagos destruyen a las bacterias fagocitadas en los compartimentos fagolisosomales. La degradación lisosomal de estos microorganismos estimula en los macrófagos la producción de citoquinas TNF- α e IL-6 y proteínas co-estimuladoras CD80 y CD86. La expresión de estas proteínas activan las células T, las cuales son fundamentales en la eliminación de este patógeno. La expresión de estas proteínas fue cuantificada a las 6 y 24 h mediante ELISA o citometría de Flujo. Los resultados muestran que los macrófagos infectados con la cepa *B. abortus* Δ270 a las 6 h pi produjeron niveles significativamente mayores de TNF- α que los macrófagos infectados con la cepa wt ($P < 0.001$), con la cepa inactivada ($P < 0.05$) y que los macrófagos no estimulados ($P < 0.0001$). Además, a las 24 h pi, los macrófagos infectados con la cepa mutante secretaron niveles de TNF- α aún mayores que a las 6 h pi, siendo estos resultados estadísticamente significativos, al compararlos con los macrófagos tratados con cualquiera de los otros grupos analizados ($P < 0.001$) (**Figura 16A**). A este tiempo (6 h pi), los macrófagos infectados con la cepa *B. abortus* 2308 y la cepa *B. abortus* 2308i mostraron niveles similares en la secreción de TNF- α . Cuando fue cuantificada la producción de IL-6 desde macrófagos infectados, los resultados mostraron que los macrófagos infectados por 6 h con la cepa mutante, no expresaron niveles significativos de esta citoquina comparados con la cepas wt o inactivada ($P > 0.05$) y solo fueron observadas diferencias estadísticamente significativas con los macrófagos no-estimulados ($P < 0.05$). Sin embargo, a las 24 h pi, los macrófagos infectados con *B. abortus* Δ270 produjeron niveles significativamente mayores de IL-6 comparados con los

macrófagos infectados con las cepas wt, inactivada o los macrófagos no-estimulados ($P < 0.0001$) (**Figura 16B**). Por otro lado, cuando fue evaluada la expresión de las proteínas co-estimuladoras CD80 y CD86, los resultados mostraron que los macrófagos infectados con *B. abortus* $\Delta 270$ a las 6 h pi, no presentaron diferencias en la expresión de ninguna de estas proteínas comparados con los macrófagos infectados con las cepas wt, inactivada o no-estimulados (**Figura 17**). A las 24 h pi, la expresión de CD80 y CD86 en macrófagos infectados con *B. abortus* $\Delta 270$ fue significativamente mayor que aquellos macrófagos infectados con la cepa wt, estimulados con la cepa inactivada o tratados con PBS (**Figura 17**). Estos resultados demuestran que la delección de esta ZnMP atenuó significativamente la virulencia de *B. abortus*, la cual favoreció la producción de las citoquinas IL-6 y TNF- α y la expresión de las proteínas co-estimuladoras CD80 y CD86 en estas células.



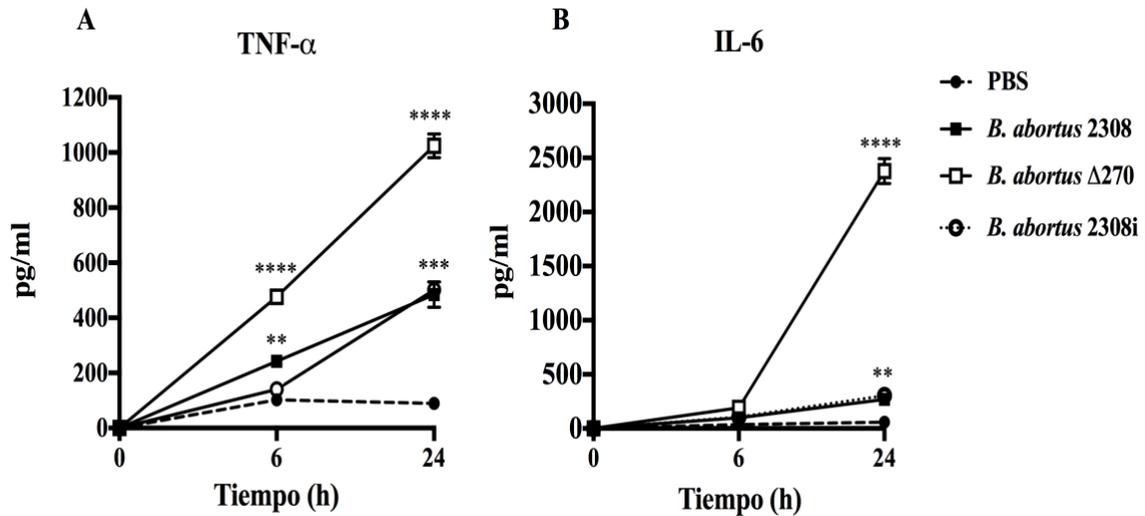


Figura 16. Producción de citoquinas en macrófagos infectados con *B. abortus*. A) La producción de TNF- α (pg/ml) y B) de IL-6 (pg/ml) secretada al sobrenadante por macrófagos infectados con cepas de *Brucella* a una MOI de 1:10 fue cuantificada por ELISA Sandwich a las 6 y 24 h pi. Los datos representan a macrófagos no estimulados (tratados con PBS), macrófagos infectados con *B. abortus* 2308, macrófagos infectados con *B. abortus* Δ 270 y macrófagos estimulados con *B. abortus* 2308i. Los resultados fueron expresados como el promedio \pm desviación estándar. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos, donde **, *** y **** denotan valores de $P < 0.01$, $P < 0.001$ y $P < 0.0001$, respectivamente. Todos los ensayos fueron realizados en triplicados.

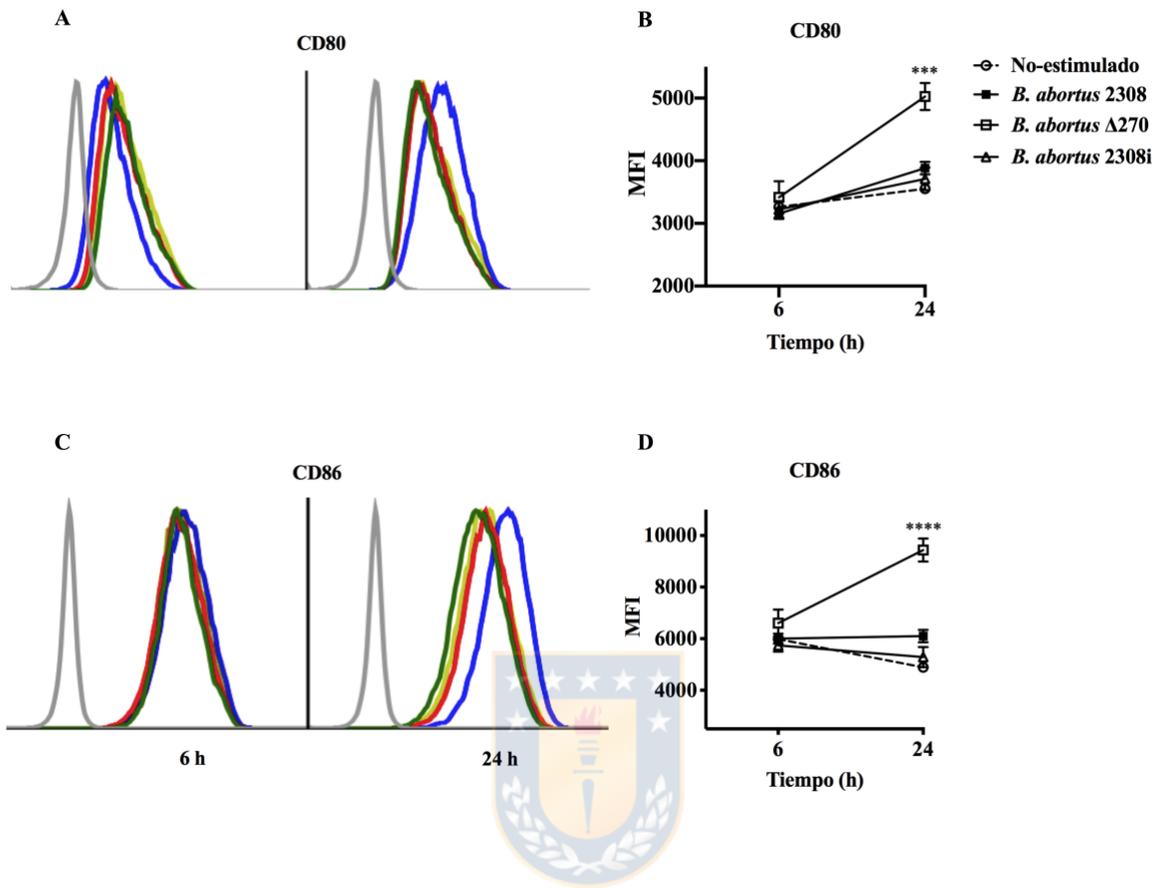


Figura 17. Expresión de proteínas co-estimuladoras en macrófagos infectados con *B. abortus*. A) Expresión de CD80 y C) CD86 desde macrófagos infectados con cepas de *B. abortus* a una MOI de 1:10 evaluada mediante Citometría de flujo a las 6 h y 24 h pi. *B. abortus* 2308 (línea Roja), *B. abortus* Δ270 (línea azul), *B. abortus* 2308i (línea amarilla), no estimulado (línea verde), fluorescencia minus one (FMO) fue usado como un control negativo (línea gris). **B** y **D**) muestra el promedio \pm desviación estándar de la intensidad de la fluorescencia (MFI) de CD80 y CD86, respectivamente. Los datos representan a macrófagos no estimulados (PBS), macrófagos infectados con *B. abortus* 2308, infectados con *B. abortus* Δ270 y estimulados con *B. abortus* 2308i. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos, donde *** y **** denotan valores de $P < 0.001$ y $P < 0.0001$, respectivamente. Todos los ensayos fueron realizados en triplicados.

5.4.2. Rol de hemooxigenasa 1 (HO-1) en la respuesta de macrófagos infectados con *B. abortus* Δ 270.

HO-1 es una enzima que participa en diversos procesos fisiológicos que incluyen respuestas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en los macrófagos, siendo su rol durante la infección por *B. abortus* estudiada. Los resultados muestran que macrófagos infectados con *B. abortus* 2308 o *B. abortus* Δ 270 por 24 h sobreexpresan el gen *Hmox1* codificante de la enzima HO-1 (**Figura 18**). La expresión de esta enzima fue inducida en niveles similares durante la infección con ambas cepas bacterianas ($P > 0.05$). Para evaluar el rol de esta enzima en los macrófagos infectados, los macrófagos fueron tratados con un inhibidor de HO-1 (10 μ M de ZnPP) e infectados con las cepas *B. abortus* 2308 y *B. abortus* Δ 270. Los resultados mostraron que el inhibidor de HO-1, ZnPP, redujo significativamente la sobrevivencia intracelular de ambas cepas al ser fagocitadas (**Figura 19A y B**). Por otro lado, el recuento bacteriano desde macrófagos tratados con cloruro de hemina, un agonista de HO-1 no mostró diferencias significativas comparado con macrófagos no tratados (grupo PBS) (**Figura 19A y B**). Estos resultados sugieren que la enzima HO-1 en los macrófagos RAW264.7 podría cumplir roles importantes en el establecimiento intracelular de *B. abortus* durante el proceso de infección.

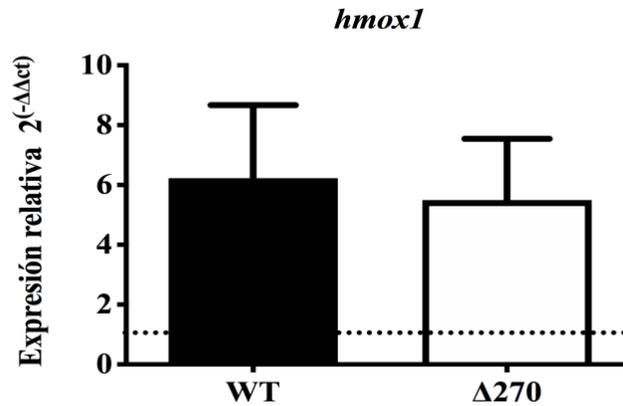


Figura 18. Expresión de HO-1 en macrófagos infectados con *B. abortus*. Expresión relativa del gen *hmox1* codificante de la enzima HO-1 desde macrófagos infectados con *B. abortus* 2308 y *B. abortus* Δ270 a las 24 pi. Los resultados fueron expresados como el promedio ± la desviación estándar. Todos los ensayos fueron realizados en triplicados.

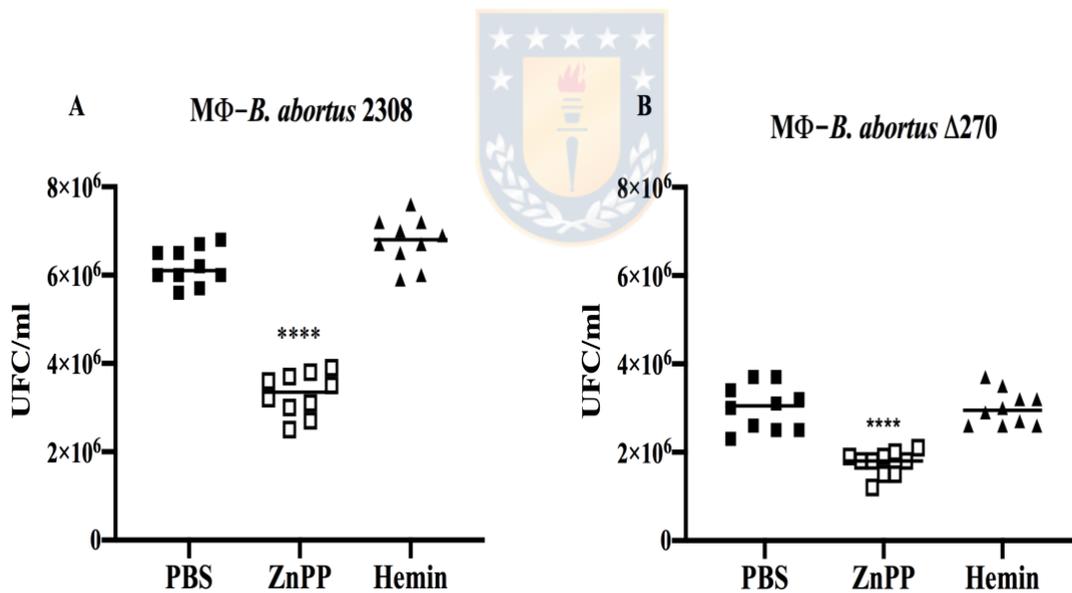


Figura 19. Respuesta de macrófagos (MΦ) durante el proceso de infección por *B. abortus*. Sobrevivencia intracelular de A) *B. abortus* 2308 y B) *B. abortus* Δ270 en macrófagos tratados con un inhibidor de HO-1 (10 μg/ml de zinc-protoporfirina, ZnPP) o tratados con un agonista de HO-1 (10 μg/ml de cloruro de hemina, Hemin). Los resultados fueron expresados como el promedio ± la desviación estándar. **** denota valores de $P < 0.0001$. Todos los ensayos fueron realizados en triplicados.

6. Discusión

B. abortus es un patógeno adaptado para sobrevivir y replicarse en el ambiente intracelular de los macrófagos (von Bargen *et al.*, 2012; Roop II *et al.*, 2013; Celli, 2019). Dentro de estas células, *B. abortus* desarrolla una eBCV que transita por los endosomas y lisosomas, exponiendo a este patógeno a un ambiente microbicida asociado a un aumento de moléculas oxidativas (O_2^- y H_2O_2), un pH ácido (pH 4.5-5.5) y a la acción de enzimas proteolíticas (Yates *et al.*, 2005; Huynh y Grinstein, 2007). La acidificación del ambiente intracelular es clave en la virulencia de *B. abortus*, ya que bajo estas condiciones, son activados los factores BvrR/BvrS y VjbR, los cuales regulan la expresión del sistema de secreción VirB SST4 (Ke *et al.* 2015). La síntesis de este sistema de secreción es fundamental en la sobrevivencia intracelular de *B. abortus* debido que le permite translocar diversas proteínas efectoras hasta el citoplasma de los macrófagos infectados (Ke *et al.*, 2015). Estas proteínas juegan roles claves en la virulencia de este patógeno ya que controlan la fisiología de las células hospederas, inhibiendo las vías de señalización intracelular, la secreción de proteínas o el tráfico vesicular (von Bargen *et al.*, 2012; Myeni *et al.*, 2013; Ke *et al.*, 2015; Celli, 2019). Algunos ORFs de la IG-3 han demostrado ser importantes en la sobrevivencia intracelular y en los mecanismos de evasión inmune del hospedero (Salcedo *et al.*, 2008). En este contexto, el ORF BAB1_0270 de *B. abortus* 2308 codifica una proteína hipotética con una función desconocida que participa en la sobrevivencia intracelular y en la colonización del bazo de ratones BALB/c (Ortiz-Román *et al.*, 2014). Su caracterización demuestra que el producto del ORF BAB1_0270 es una metaloproteinasas dependiente de zinc (ZnMP) expresada en el citoplasma de *B. abortus*. Esta proteína contiene homología con metaloproteasas ImmA/IrrE, proteínas caracterizadas por modular la expresión de diversos genes involucrados en la transferencia horizontal de genes (ImmA) o en la resistencia al estrés ambiental (IrrE) (Earl

et al., 2002; Bose *et al.*, 2008; Ludanyi *et al.*, 2014). Por lo tanto, debido a la homología de su secuencia con las proteasas ImmA/IrrE, fue postulado que esta ZnMP podría participar en la resistencia de *B. abortus* a las condiciones de estrés ácido y oxidativas expuestas durante su tráfico intracelular en macrófagos, ejerciendo una función similar a la descrita para la proteasa IrrE.

6.1. Rol de ZnMP en la resistencia de *B. abortus* al estrés ácido y oxidativo

El rol de la proteína ZnMP en la resistencia de *B. abortus* al estrés ácido y oxidativo fue evaluado mediante la exposición de la cepa mutante *B. abortus* $\Delta 270$ a un cultivo con pH 5.5 y a distintas concentraciones de H₂O₂. Por un lado, el crecimiento de esta cepa bajo condiciones de estrés ácido demostró que la proteína ZnMP es requerida en la adaptación de *B. abortus* a este medio ácido (fase de lag) ya que su delección retrasó significativamente el comienzo de su crecimiento exponencial. Además, esta cepa mutante cultivada bajo estas condiciones de pH ácido mostró una regulación negativa en la expresión de diversos genes claves (*bvrR*, *vjbR*, *hutC*, *virB1*, *virB2*, *virB5*, *btpA*, *vceA* o *vceC*) en la virulencia y adaptación intracelular de *B. abortus*. Estos factores de virulencia son requeridos en la adaptación al medio ácido ya que durante su ingreso en los macrófagos, la eBCV adquiere una acidificación que activa a los reguladores transcripcionales BvrR/BvrS, VjbR, HutC y a su vez al sistema de secreción VirB SST4 (genes *virB*) que transloca diversas proteínas efectoras tales como BtpA, VceA o VceC (codificadas en los genes *btpA*, *vceA*, *vceC*, respectivamente) (Boschioli *et al.*, 2002; Arocena *et al.*, 2010; Martínez-Núñez *et al.*, 2010; Arocena *et al.*, 2012; Ke *et al.*, 2015; Altamirano-Silva *et al.*, 2018). En este sentido, la acidificación de la eBCV gatilla la expresión de *bvrR* codificante de un sistema de dos

componentes BvrR/BvrS que detectan los cambios en el microambiente endosomal y montan una respuesta transcriptómica requerida por *B. abortus* en su adaptación intracelular, mientras que *vjbR* codifica el regulador de la virulencia VjbR que también es inducido por una acidificación específica, pH 5.5 (valores de pH mayores no inducen su expresión y tampoco lo hace un pH bajo 4.5) (Arocena *et al.*, 2012; Altamirano-Silva *et al.*, 2018). La expresión de BrvR/BvrS y VjbR activan HutC, los cuales en conjunto regulan la expresión del sistema de secreción VirB SST4 y consecuentemente, la secreción de diversas proteínas efectoras que modulan el tráfico intracelular y la fisiología de las células hospederas (Arocena *et al.*, 2010; Martínez-Núñez *et al.*, 2010; Sieira *et al.*, 2010; Ke *et al.*, 2015). Estas observaciones demuestran que el pH ácido de los endosomas es fundamental para gatillar la virulencia de *B. abortus*, y por lo tanto, basados en los resultados descritos en este trabajo podemos indicar que la proteína ZnMP sería un factor requerido por *B. abortus* en su adaptación intracelular bajo las condiciones de acidificación presentes en los endosomas/lisosomas.

La exposición de *B. abortus* Δ 270 a un estrés oxidativo inducido por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), mostró que esta cepa presenta niveles de tolerancia significativamente menores a este compuesto que *B. abortus* 2308 y *B. abortus* Δ 270C. Debido a su estilo de vida intracelular en las células fagocíticas, *B. abortus* ha desarrollado mecanismos de resistencia al estrés oxidativo generado por el estallido respiratorio (O_2^- y H_2O_2), los cuales consisten en la expresión de enzimas con actividad antioxidantes que incluyen las superóxido dismutasas (SOD-Mn y SOD Cu-Zn) que catalizan la dismutación del O_2^- a H_2O_2 y O_2 . El H_2O_2 es un compuesto químico altamente microbicida para las bacterias, por lo cual debe ser

rápidamente transformado a O₂ y H₂O por la actividad de la catalasa KatE presente en el periplasma de *B. abortus* (Kim *et al.*, 2000; Gee *et al.*, 2005; Steele *et al.*, 2010). Además, *B. abortus* expresa la enzima AhpC que participa en la destoxificación del peróxido, protegiéndola de la muerte oxidativa intracelular (Steele *et al.*, 2010; Olsen y Palmer, 2014). En los patógenos intracelulares *Mycobacterium tuberculosis* y *Burkholderia thailandensis* expuestos al estallido respiratorio de las células fagocíticas, la expresión de la enzima AhpC destoxifica y protege a las bacterias de los peroxinitritos generados en los endosomas/fagosomas (Olsen y Palmer, 2014; Zhang *et al.*, 2019a). Se ha demostrado que la expresión de estas enzimas es inducida en respuesta a un aumento de moléculas oxidativas en el ambiente intracelular (Kim *et al.*, 2000; Gee *et al.*, 2005; Steele *et al.*, 2010). Interesantemente, durante la exposición de *B. abortus* Δ270 a H₂O₂ fue registrado una regulación negativa en la expresión de los genes *katE*, *sodC*, *ahpC* y de *oxyR* y *lysR*, genes codificantes de los reguladores transcripcionales de las enzimas KatE y AhpC, respectivamente. Estas observaciones demuestran que *B. abortus* resiste al estrés oxidativo mediante la expresión de enzimas con actividad antioxidante, y es la proteína ZnMP un factor que sería requerido en la adaptación intracelular de este patógeno cuando es expuesta a las condiciones oxidativas presentes en el ambiente endosomal y lisosomal.

Esta evidencia confirma que la delección de ZnMP reduce significativamente la capacidad de *B. abortus* 2308 para crecer bajo condiciones oxidativas y de pH ácido, factores que durante el tráfico intracelular, específicamente en los endosomas, controlan el crecimiento de las bacterias fagocitadas (Yates *et al.*, 2005; Huynh y Grinstein, 2007). Esta ZnMP en *B. abortus* ejercería una función similar a la descrita para la proteasa IrrE en la resistencia frente al estrés

ambiental, una proteasa que en *Deinococcus* actúa como un regulador global que promueve la transcripción de diversos genes requeridos en la sobrevivencia bacteriana a las condiciones de radiación ionizante (IR) y ultravioleta (UV) mediante la proteólisis de proteínas represoras (Earl *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2011; Ludanyi *et al.*, 2014; Lim *et al.*, 2019). Varios autores han demostrado las cualidades reguladoras de la proteasa IrrE de *D. Radiodurans* en hospederos heterólogos como *E. coli*, donde la expresión de esta proteína incrementó significativamente su tolerancia frente a la irradiación, cambios osmóticos, calor, sal y estrés oxidativo. Además, en *Zymomonas mobilis* la expresión de IrrE promovió su tolerancia al etanol y al estrés ácido, y aún más interesante fueron los hallazgos reportados por Pan *et al.* (2009) quienes indujeron la expresión de IrrE de *D. radiodurans* R1 en la planta *Brassica napus*, incrementando significativamente su capacidad para tolerar el estrés salino (Ma *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2015). Estos reportes demuestran que este regulador transcripcional puede incrementar la tolerancia de hospedero no nativos a diversas condiciones de estrés ambiental. Esta información refuerza la idea que la proteína ZnMP de *B. abortus* estaría ejerciendo una función similar a IrrE, contribuyendo en la tolerancia de este patógeno frente al estrés intracelular de los mecanismos microbicidas de los fagocitos. Además, considerando que la proteína ZnMP está codificada en la IG-3, la cual habría sido adquirida en un proceso de transferencia horizontal de genes, se sugiere que este tipo de proteínas podrían tener importantes roles evolutivos en las redes regulatorias y adaptativas de las bacterias.

6.2. ZnMP: un nuevo de factor de virulencia requerido por *B. abortus* en su adaptación endosomal de macrófagos

En el proceso de infección de los macrófagos participan diversos factores de virulencia de *B. abortus* tales como el lipopolisacárido (Br-LPS) o los glucanos b1,2 cíclicos (CβG), los cuales le permiten adherirse e invadir a los macrófagos (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005; Lapaque, *et al.*, 2005; Haag *et al.*, 2010). En este contexto, los resultados demostraron que esta ZnMP, una proteína citoplasmática de *B. abortus*, no contribuye en la adhesión ni en la invasión de los macrófagos, un proceso que depende del Br-LPS, la proteína Hsp60 o la proteína de superficie de 41 kDa (SP41) presentes en su envoltura celular (Castañeda-Roldán *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004; de Figueiredo *et al.*, 2015). Sin embargo, durante su tráfico intracelular se demostró que la ZnMP es requerida por *B. abortus* para escapar desde los fagolisosomas y por ende, alcanzar su nicho replicativo en las vesículas derivadas del RE de los macrófagos. En los fagolisosomas, los microorganismos fagocitados son expuestos a un ambiente microbicidas dependiente de moléculas oxidativas (ROS, RNI), un pH ácido (valores de pH 4.5) y la acción de diversas enzimas hidrolíticas (Yates *et al.*, 2005; Huynh y Grinstein, 2007). Estas condiciones microbicidas, específicamente la acidificación induce en *B. abortus* la expresión de diversos factores de virulencia, incluyendo el sistema de secreción VirB SST4 que le permite a esta bacteria escapar de los lisosomas y redirigir su tránsito intracelular hasta las vesículas derivadas del ER donde desarrolla rBCVs (von Bargen *et al.*, 2012; Celli, 2019). Sin embargo, durante la infección de macrófagos con la cepa *B. abortus* Δ270 a las 24 h fue registrado un incremento significativo en la expresión de los genes *bvrR*, *vjvR*, *hutC* y *virB*, pero esta expresión no promovió niveles de replicación intracelular similares a la cepa *B. abortus* 2308. Por otro lado, en *B. abortus* Δ270 los genes BAB1_0273, BAB1_0637 y *vceA* mostraron niveles de expresión significativamente menores comparados

con *B. abortus* 2308. La función de los ORFs BAB1_0273 y BAB1_0627 es desconocida, pero se ha descrito que la delección del *vceA* en *B. abortus* promueve la autofagia e inhibe la apoptosis en trofoblastos humanos (Zhang *et al.*, 2019b). Cabe señalar, que aunque hay una diferencia estadística en la expresión de estos genes, sin embargo, se desconoce si realmente estas diferencias se traducen en cambios biológicos efectivos sobre la fisiología de *B. abortus*. Por lo tanto, estos resultados contribuyen a demostrar que esta ZnMP sería requerida en el tráfico intracelular de *B. abortus*, específicamente, para escapar desde los fagolisosomas ya que su delección genera en la cepa mutante una desregulación en la expresión génica que afecta negativamente la adaptación intracelular de esta bacteria en los macrófagos.

El tráfico intracelular de *B. abortus* Δ 270 demostraría que sus niveles de co-localización con catepsina D fagolisosomal y su menor capacidad para alcanzar las vesículas derivadas del RE estaría relacionado con la tolerancia de esta cepa para resistir adaptarse al estrés ácido y oxidativo de los endosomas (Gómez *et al.*, 2020a). Estos datos refuerzan la idea de que esta ZnMP tiene en *B. abortus* una función similar a las proteasas IrrE, es decir, ejercería una función proteolítica sobre un represor que impide la expresión de genes requeridos en la resistencia frente al estrés ácido y oxidativo tal como podría estar ocurriendo con la regulación negativa en la expresión de un número no despreciable de genes: *bvrR*, *VjbR*, *hutC*, *virB1*, *virb2*, *virB5*, *btpA*, *vceA*, *vceC*, *katE*, *sodC*, *ahpC*, *oxyR* y *lysR* en *B. abortus* Δ 270. Aunque se desconoce si estos cambios (represión de estos genes) son una causa directa de la delección de esta ZnMP o una consecuencia de la atenuación de esta cepa, la cual presenta una menor capacidad para adaptarse y tolerar las condiciones de pH ácido y oxidativas. Además, debido que estos genes podrían constituir un sistema toxina-antitoxina

tipo II hipotético constituido por esta ZnMP y un regulador transcripcional-Xre, se ha postulado la siguiente hipótesis que explicaría la función de esta ZnMP en la regulación de la virulencia y adaptación intracelular de *B. abortus* durante su establecimiento en las células hospederas (**Figura 20**) (Gómez *et al.*, 2020b).

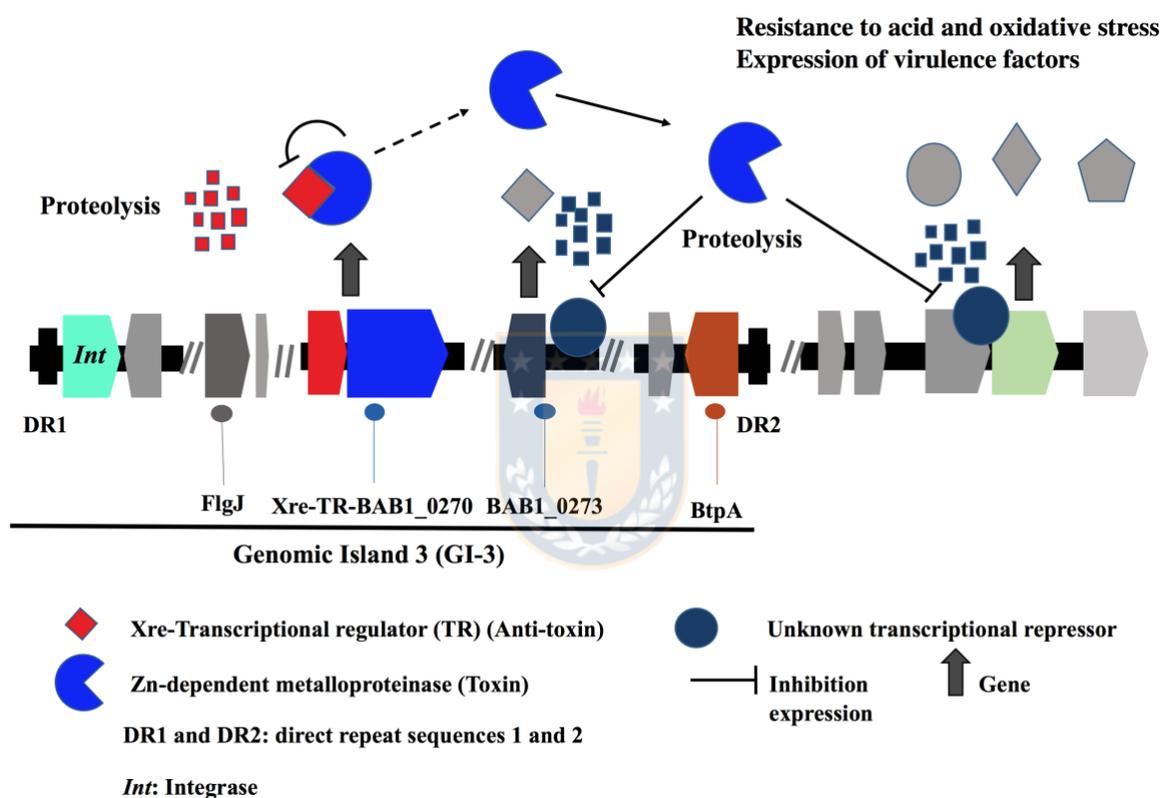


Figura 20. Función hipotéticas ejercida por la proteína ZnMP en *B. abortus*. Este modelo se basa en el sistema TA II y en las proteasas regulatorias ImmA/IrrE. Se postula que el operón constituido por el regulador transcripcional Xre y la ZnMP son un tipo de sistema TA II, donde el RT-Xre es la anti-toxina y la ZnMP es la toxina. Bajo condiciones de estrés (por ej. pH ácido u oxidativo) es inducido el operón para la persistencia bacteriana donde la anti-toxina es clivada y la ZnMP (toxina) es libre para ejercer su función proteolítica de un represor, permitiendo la expresión de diversos genes tales como *vceA*, *katE* o *ahpC*, las cuales están involucradas en la resistencia de *B. abortus* para sobrevivir a un ambiente hostil (Gómez *et al.*, 2020b).

6.3. Respuesta de macrófagos RAW264.7 infectados con *B. abortus* Δ270

Los macrófagos son parte del sistema inmune innato que provee la primera línea de defensa contra patógenos. La delección de la proteína ZnMP en *B. abortus* Δ270 atenuó significativamente su virulencia lo cual fue observado a través de una reducida capacidad para escapar de los fagolisosomas de los macrófagos. En estos compartimentos, las bacterias son eliminadas, permitiendo que los diversos antígenos de *B. abortus* Δ270 puedan ser reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que activan vías de señalización intracelular dependiente de MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88)/MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) y factores de transcripción tales como NF- κ B (Macedo *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2016). Basados en los resultados de este trabajo, estas vías de señalización habrían sido gatilladas en los macrófagos infectados con *B. abortus* Δ270, ya que estas células mostraron un fenotipo pro-inflamatorio asociado a niveles elevados de IL-6, TNF- α y de las proteínas co-estimuladoras CD80/CD86. *In vivo*, la secreción de IL-6 desde macrófagos infectados ha mostrado que contribuye en la resistencia del hospedero frente a la brucelosis debido que controla la actividad bactericida de los macrófagos contra *B. abortus* (Hop *et al.*, 2019), pero además, es una citoquina que participa en el crecimiento de las células B, diferenciación de células T CD4+ y las funciones citotóxicas de las células T CD8+ (Dienz y Rincon, 2009; Lee *et al.*, 2016). Por otro lado, el TNF- α es una citoquina que ejerce funciones pleiotrópica durante las interacciones patógeno-hospedero, jugando un rol importante como factor autocrino y paracrino para los macrófagos infectados (Caldwell *et al.*, 2014). Estas observaciones demuestran que la delección de esta ZnMP redujo significativamente el fitness de *B. abortus* Δ270 en el ambiente intracelular de los macrófagos, y a su vez, a través de la expresión de IL-6 y TNF- α , podrían haber generado una retro alimentación positiva que activó a los macrófagos infectados, controlando el

crecimiento intracelular de esta bacteria. Además, la expresión de estas proteínas demostraría que durante el proceso de infección *in vivo*, *B. abortus* $\Delta 270$ sería degradada en los fagolisosomas de los macrófagos, lo cual activa una respuesta protectora dependiente de las células T que orquestan la eliminación de esta cepa desde el bazo de ratones BALB/c (Ortiz-Román *et al.* 2014).

Los macrófagos infectados con la cepa virulenta *B. abortus* 2308 expresaron bajos niveles de IL-6, TNF- α y de CD80/CD86, lo cual contribuye a entender como esta bacteria subvierte la respuesta inmune del hospedero. En este proceso, la inhibición de estas proteínas le permite a *B. abortus* evadir la respuesta inmune del tipo Th1 protectora del hospedero (Skendros y Boura, 2013; Martirosyan y Gorvel, 2013; Ahmed *et al.*, 2016). Además, los resultados mostraron que los macrófagos infectados con *B. abortus* 2308 o *B. abortus* $\Delta 270$ sobreexpresan el gen *hmx1* codificante de la enzima hemo-oxigenasa-1 (HO-1). Esta enzima es inducida por estrés, agentes oxidativos o inflamatorios, la cual cataliza la degradación del grupo hemo a biliverdina, ion ferroso, y monóxido de carbono (CO), elementos que tienen una actividad anti-inflamatorias, anti-oxidantes y anti-apoptóticas en las células (Naito *et al.*, 2014; Hedblom *et al.*, 2019). Además, la inducción de HO-1 en macrófagos se asocia a una polarización de estas células a un fenotipo M2 anti-inflamatorio (Naito *et al.*, 2014). Los resultados descritos plantean diversas preguntas, ya que la sobreexpresión de HO-1 en macrófagos infectados con *B. abortus* podría estar asociado a fenotipo de macrófagos M2, el cual favorecería la sobrevivencia de este patógeno intracelularmente. Evidencia de esto fue observado en los macrófagos tratados con zinc-protoporfirina, un inhibidor de HO-1, donde se aprecia una eliminación significativa de *B. abortus* 2308 o *B. abortus* $\Delta 270$ fagocitadas.

Adicionalmente, en los macrófagos tratados con cloruro de hemina, un agonista de HO-1, no fue afectada la sobrevivencia intracelular de ninguna de las dos cepas de *B. abortus*. Estos resultados indicarían que *B. abortus* explota las vías reguladoras de los macrófagos para ejercen funciones anti-inflamatorias o esta respuesta podría corresponder a una respuesta fisiológica de las células frente al estrés generado por el proceso de infección. Por lo tanto, se sugiere que el rol de HO-1 en la regulación inmune durante el proceso de infección con *B. abortus* debiese ser investigado.

6.4. Reflexiones finales acerca del rol de ZnMP en la virulencia de *B. abortus*

La evidencia expuesta en este trabajo apoyaría la hipótesis postulada, demostrando que esta ZnMP es requerida por *B. abortus* en su resistencia al estrés ambiental inducido en los fagosomas de los macrófagos. Sin embargo, en base a los resultados se ha postulado que esta ZnMP desarrolla una función similar a la descrita para IrrE, esto es, ejercer una actividad proteolítica sobre un represor que previene la expresión de genes requeridos en la resistencia al estrés ácido y oxidativo como ocurre con diversos genes involucrados en la virulencia *bvrR*, *vjbR*, *hutC*, *virB1*, *virb2*, *virB5*, *btpA*, *vceA*, *vceC*, *katE*, *sodC*, *ahpC*, *oxyR* y *lysR* en *B. abortus* Δ 270. Estas observaciones abren diversas interrogantes acerca de la función de esta ZnMP en *B. abortus* durante el proceso de infección: i) Puede esta proteína jugar un rol similar a la descrita para las proteasas ImmA/IrrE?, ii) puede esta ZnMP clivar un gen represor involucrado en la resistencia al estrés ambiental de los fagosomas?, respecto a este represor, iii) podría ser el regulador transcripcional-Xre presente en el mismo operón, el cual reprime la expresión de los genes involucrados en la adaptación intracelular de estas bacteria?

o, iv) Cómo la delección de esta ZnMP afecta la expresión de este regulador-Xre?. Finalmente, si consideramos que esta ZnMP y el regulador transcripcional-Xre forman un sistema TA tipo II, donde ZnMP es la toxina y el regulador-Xre es la antitoxina (**Figura 20**), v) por qué la eliminación de ZnMP (toxin) hace a esta cepa mutante menos virulenta y menos resistente a los mecanismos microbicidas intracelulares? Tal vez, vi) este sistema TA II provee tolerancia al estrés?. Tal vez, este sistema juega un role en la resistencia al estrés ambiental como ocurre con la respuesta bacteriana SOS o la producción de guanosina de pentafofato ((p) ppGpp), los cuales contribuyen en la persistencia bacteriana (Page y Peti, 2016; Harms *et al.*, 2018). Finalmente, debido la función postulada para esta ZnMP nos permite entender un mecanismo que regula la virulencia de *B. abortus* el cual podría ser conservado en diversas bacterias patógenas.



7. Conclusiones

Los patógenos intracelulares han desarrollado diversas estrategias para resistir al estrés inducido por los mecanismos microbicidas de los macrófagos. *B. abortus* es una bacteria bien adaptada al microambiente ácido y oxidativo de los endosomas, lo cual es fundamental para su establecimiento y replicación intracelular en las células hospederas. Por lo tanto, en este trabajo se demuestra que la ZnMP es requerida en la resistencia de *B. abortus* 2308 durante su tráfico intracelular en macrófagos, donde su delección produce:

- I) Una reducida capacidad en *B. abortus* para adaptarse y crecer bajo condiciones de pH ácido y de estrés oxidativo.
- II) Una desregulación transcripcional en la expresión de diversos genes codificantes de factores de virulencia involucrados en la resistencia al estrés ácido y oxidativo: *virB1*, *virB2*, *virB5*, *vceA*, *vceV*, *btpA*, *vjbR*, *bvrR/bvrS*, *hutC*, *katE*, *sodC*, *ahpC*, *oxyR* y *lysR*.
- III) Una reducción en la capacidad de *B. abortus* para escapar desde los fagolisosomas y alcanzar las vesículas derivadas del retículo endoplásmico, y consecuentemente replicarse intracelularmente en macrófagos.
- IV) Una atenuación en *B. abortus* que induce en macrófagos un fenotipo inflamatorio (del tipo M1) requerido en la eliminación bacteriana por el hospedero.

En resumen, en este trabajo se ha caracterizado la metaloproteinasa dependiente de zinc codificada en el ORF BAB1_0270 de *B. abortus* como un nuevo factor de virulencia requerido por *B. abortus* para adaptarse al estrés ejercido por los mecanismos microbicidas

presentes en los endosomas/lisosomas de macrófagos. Por lo tanto, en base a la evidencia no se rechaza la hipótesis planteada, lo cual provee nuevas luces acerca de los mecanismos que regulan la virulencia de este patógeno y contribuye a ampliar nuestro entendimiento de cómo *B. abortus* se adapta a su nicho intracelular, un proceso central en la progresión de la brucelosis durante la infección en animales y humanos.



8. Referencias

Ahmed, W., Zheng, K., Liu, Z. (2016). Establishment of chronic infection: *Brucella*'s stealth strategy. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **6**, 1-12. doi:10.3389/fcimb.2016.00030

Alaidarous, M., Ve, T., Casey, L., *et al.* (2014). Mechanism of bacterial interference with TLR4 signaling by *Brucella* Toll/Interleukin-1 receptor domain-containing protein TcpB. *J. Biol. Chem.* **289**, 654-68. doi: 10.1074/jbc.M113.523274

Al Dahouk, S., Köhler, S., Occhialini, A., *et al.* (2017). *Brucella* spp. of amphibians comprise genomically diverse motile strains competent for replication in macrophages and survival in mammalian hosts. *Sci. Rep.* **7**, 1-17. doi: 10.1038/srep44420

Altamirano-Silva, P., Meza-Torres, J., Castillo-Zeledón, *et al.* (2018). *Brucella abortus* senses the intracellular environment through the BvrR/BvrS two-component system, which allows *B. abortus* to adapt to its replicative niche. *Infect. Immun.* **86**, e00713-17. doi: 10.1128/IAI.00713-17

Atluri, V., Xabier, M., de Jong, M., *et al.* (2011). Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts. *Annu Rev Microbiol*, **65**, 523-41. doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102905.

Aranís, C., Oporto, J., Espinoza, M., *et al.* (2008). Utilidad de la determinación de anticuerpos IgG e IgM por ELISA e inmunocaptura en una serie clínica de brucelosis humana. *Rev. Chilena Infectol.* **25**, 116-21. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182008000200006>

Arayan, L., Simborio, H., Reyes, A., *et al.* (2015). The effects of red ginseng saponin fraction-A (RGSF-A) on phagocytosis and intracellular signaling in *Brucella abortus* infected RAW 264.7 cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **362**, 1-7. doi: 10.1093/femsle/fnv070

Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., *et al.* (2005). Cyclic β -1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat. Immunol.* **6**, 618-625. doi:10.1038/ni1202

Arocena, G., Sieira, R., Comerci, D., Ugalde, R. (2010). Identification of the quorum-sensing target DNA sequence and N-Acyl homoserine lactone responsiveness of the *Brucella abortus* *virB* promoter. *J. Bacteriol.* **192**, 3434-3440. doi: 10.1128/JB.00232-10

Arocena, G., Zorreguieta, A., Sieira, R. (2012). Expression of VjbR under nutrient limitation conditions is regulated at the post-transcriptional level by specific acidic pH values and urocanic acid. *PLoS One*. **7**:e35394. doi: 10.1371/journal.pone.0035394.

Bakal C, Davies J. (2010). No longer an exclusive club: eukaryotic signaling domains in bacteria. *Trends Cell. Biol.*, **10**(1):32–8. doi: 10.1016/s0962-8924(99)01681-5.

Barquero-Calvo E, Chaves-Olarte E, Weiss D, *et al.* (2007). *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS One*, **2**(7):e631. doi: [10.1371/journal.pone.0000631](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000631)

Boschiroli, M., Ouahrani-Bettache, S., Foulongne, V., *et al.* (2002). The *Brucella suis virB* operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 1544-49. doi: [10.1073/pnas.032514299](https://doi.org/10.1073/pnas.032514299)

Bose, B., Auchtung, J., Lee, C., Grossman, A. (2008). A conserved anti-repressor controls horizontal gene transfers by proteolysis. *Mol. Microbiol.* **70**, 570-582. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06414.x

Buddle, M. (1956). Studies on *Brucella ovis* (n.sp.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. *J. Hyg. (Lond)*. **54**, 351-64. doi: 10.1017/s0022172400044612

Caldwell, A., Cheng, Z., Vargas, J., Birnbaum, H., Hoffmann, A. (2014). Network dynamics determine the autocrine and paracrine signaling functions of TNF. *Genes Dev.* **28**, 2120–2133. doi: 10.1101/gad.244749.114

Carmichael, L., Bruner, D. (1968). Characteristics of a newly recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. *Cornell Vet.* **48**, 579-92.

Casabuono, A., Czibender, C., Del Giudice, M., *et al.* (2017). New features in the lipid A structure of *Brucella suis* and *Brucella abortus* lipopolysaccharide. *J. Am. Soc. Mass. Spectr.* **28**, 2716-23. doi: 10.1007/s13361-017-1805-x

Castañeda-Roldán, E., Avelino-Flores, F., Dall’Agnol, M., *et al.* (2004). Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. *Cell. Microbiol.* **6**, 435-445. doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00372.x

Celli, J., Chastellier, C., Franchini, DM., Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E., Gorvel, JP. (2003). *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.* **198**, 545-56. doi: 10.1084/jem.20030088

Celli, J. (2019). The intracellular life cycle of *Brucella* spp. *Microbiol. Spectr.* **7**, 1-17. doi: 10.1128/microbiolspec.BAI-0006-2019

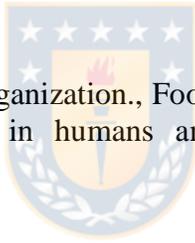
Céspedes, S., Salgado, P., Retamal-Díaz, A., *et al.*, (2012). Roles of genomic island 3 (GI-3) BAB1_0278 and BAB1_0263 open reading frames (ORFs) in the virulence of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Vet. Microbiol.* **156**, 1–7. doi:10.1016/j.vetmic.2011.09.025

Cirl, C., Wieser, A., Yadav, M., *et al.* (2008). Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. *Nat. Med.* **14**, 399-06. doi: 10.1038/nm1734.

Coloma-Rivero, R., Gómez, L., Alvarez, F., *et al.* (2020) The role of the flagellar protein FlgJ in the virulence of *Brucella abortus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**, 178. doi: 10.3389/fcimb.2020.00178

Corbel, M (1997). Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.*, **3**, 213-21. doi: 10.3201/eid0302.970219.

Corbel, MJ. (2006). World Health Organization., Food and Agriculture Organization of the United Nations., *et al.* Brucellosis in humans and animals. Geneva: World Health Organization, 1-89.



Corsetti, P., de Almeida, L., Carvalho, N., *et al.* (2013). Lack of endogenous IL-10 enhances production of proinflammatory cytokines and leads to *Brucella abortus* clearance in mice. *PLoS ONE*, **8**:e74729.

D'Anastasio, R., Zipfel, B., Moggi-Cecchi, J., *et al.* (2009). Possible brucellosis in an early hominin skeleton from Sterkfontein, South Africa. *PLoS ONE*, **4**:e6439. doi: 10.1371/journal.pone.0006439

Datsenko, KA., Wanner, BL. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 6640-6645. doi:10.1073/pnas.120163297

de Barsey, M., Jamet, A., Filopon, D., *et al.* (2011). Identification of a *Brucella* spp. secreted effector specifically interacting with human small GTPase Rab2. *Cell. Microbiol.* **13**, 1044-58. doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01601.x

De Bolle, X., Crosson, S., Matroule, J., Letesson, J. (2015). *Brucella abortus* cell cycle and infection are coordinated. *Trends Microbiol.* **23**(12), 812-21. doi: 10.1016/j.tim.2015.09.007.

de Figueiredo, P., Ficht, T., Rice-Ficht, A., Rossetti, C., Adams, L. (2015). Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: Review of *Brucella*-host interactions. *Am. J. Pathol.* **185**, 1505-1517. doi:10.1016/j.ajpath.2015.03.003

Dienz, O., and Rincon, M. (2009). The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. *Clin. Immunol.* **130**, 27–33. doi: 10.1016/j.clim.2008.08.018

Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., Hacker, J. (2004). Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 414-24. doi: 10.1038/nrmicro884.

Earl, A., Mohundro, M., Mian, I., Battista, J. (2002). The IrrE protein of *Deinococcus radiodurans* R1 is a novel regulator of recA expression. *J. Bacteriol.* **184**, 6216-6224. doi:10.1128/JB.184.22.6216

El-Tras, W., Tayel, A., Eltholth, M., Guitian, J. (2010). *Brucella* infection in fresh water fish: Evidence for natural infection of Nile catfish, *Clarias gariepinus*, with *Brucella melitensis*. *Vet. Microbiol.* **141**, 321-25. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.09.017.

Escalona, E., Sáez, D., Oñate, A. (2017). Immunogenicity of a multi-epitope DNA vaccine encoding epitopes from Cu–Zn superoxide dismutase and open reading frames of *Brucella abortus* in mice. *Front. Immunol.* **8**, 1-10. doi:10.3389/fimmu.2017.00125

Fahel, J., de Souza, M., Gomes, M., *et al.* (2015). 5-Lipoxygenase negatively regulates Th1 response during *Brucella abortus* infection in mice. *Infect. Immun.* **83**, 1210-16. doi: 10.1128/IAI.02592-14.

Foster, G., Osterman, B., Godfroid, J., *et al.* (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. Microbiol.* **57**, 2688-93. doi: 10.1099/ijs.0.65269-0.

Franco, M., Mulder, M., Gilman, R., Smits, H. (2007). Human brucellosis. *Lancet Infect. Dis.*, **7**, 775-86. doi: 10.1016/S1473-3099(07)70286-4.

Gagnaire, A., Gorvel, L., Papadopoulos, A., *et al.* (2016). COX-2 inhibition reduces *Brucella* bacterial burden in draining lymph nodes. *Front. Microbiol.* **7**, 1-13. doi: 10.3389/fmicb.2016.01987.

Gee, J., Valderas, M., Kovach, M., *et al.* (2005). The *Brucella abortus* Cu,Zn superoxide dismutase is required for optimal resistance to oxidative killing by murine macrophages and wild-type virulence in experimentally infected mice. *Infect. Immun.* **73**, 2873-2880. doi: 10.1128/IAI.73.5.2873-2880.2005

Gomes, M., Campos, P., Pererira Gde, S., *et al.* (2016). TLR9 is required for MAPK/NF- κ B activation but does not cooperate with TLR2 or TLR6 to induce host resistance to *Brucella abortus*. *J. Leukoc. Biol.* **99**, 1-10. doi:10.1189/jlb.4A0815-346R

Gómez, LA., Alvarez, FI., Fernández, PA., *et al.* (2016). Immunogenicity and protective response induced by recombinant plasmids based on the BAB1_0267 and BAB1_0270 open reading frames of *Brucella abortus* 2308 in BALB/c mice. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **6**, 1-7. doi:10.3389/fcimb.2016.00117

Gómez, LA., Llanos, J., Escalona, E., *et al.* (2017). Multivalent fusion DNA vaccine against *Brucella abortus*. *Biomed. Res. Int.* 2017: 6535479. doi: 10.1155/2017/6535479

Gómez, LA., Alvarez, FI., Betancur, DI., Oñate, A (2018). Brucellosis vaccines based on the open reading frames from genomic island 3 of *Brucella abortus*. *Vaccine*, **36**, 2928-36. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.04.014.

Gómez, LA., Oñate, AA. (2018). Plasmid-based DNA vaccines. Capítulo de libro, En: Plasmid. *IntechOpen*. doi:10.5772/intechopen.76754

Gómez, LA., Alvarez, FI., Molina, RA., *et al.* (2020a). A Zinc-dependent metalloproteinase of *Brucella abortus* is required in the intracellular adaptation of macrophages. *Front. Microbiol.* **11**:1586. doi: 10.3389/fmicb.2020.01586

Gómez, LA, Alvarez, FI, Molina, R., *et al.* (2020b). A Zinc-dependent metalloproteinase in the intracellular adaptation of *Brucella abortus* in macrophages. *bioRxiv* 2020.04.17.046490. doi.org/10.1101/2020.04.17.046490

Gorvel, JP. (2008). *Brucella*: a Mr "Hide" converted into Dr Jekyll. *Microbes Infect.* **10**, 1010-3. doi: 10.1016/j.micinf.2008.07.007.

Haag, A., Myka, K., Arnold, M., Caro-Hernández, P., Ferguson, GP. (2010). Importance of lipopolysaccharide and cyclic β -1,2-glucans in *Brucella*-mammalian infections. *Int. J. Microbiol.* Article ID 124509, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2010/124509>.

Harms, A., Brodersen, DE., Mitarai, N., Gerdes, K. (2018). Toxins, targets, and triggers: an overview of toxin-antitoxin biology. *Mol. Cell.* **70**, 768-784. doi:10.1016/j.molcel.2018.01.003

Hedblom, A., Hejazi, S., Canesin, G., *et al.* (2019). Heme detoxification by heme oxygenase-1 reinstates proliferative and immune balances upon genotoxic tissue injury. *Cell Death Dis.* **10**, 1-13. doi: 10.1038/s41419-019-1342-6.

Heo, L., Park, H., Seok, C. (2013). GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking. *Nucleic Acids Res.* **41**, 384-88. doi:10.1093/nar/gkt458

Hernández-Mora, G., Palacios-Alfaro, J., González-Barrientos, R. (2013). Wildlife reservoirs of brucellosis: *Brucella* in aquatic environments. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **32**, 89-03. doi: 10.20506/rst.32.1.2194.

Holtzendorff, J., Hung, D., Brende, P., *et al.* (2004). Oscillating global regulators control the genetic circuit driving a bacterial cell cycle. *Science*, **304**, 983-7. doi: 10.1126/science.1095191.

Hop, H., Huy, T., Reyes, A., *et al.* (2019). Interleukin 6 promotes *Brucella abortus* clearance by controlling bactericidal activity of macrophages and CD8C T cell differentiation. *Infect. Immun.* 87:e00431-19. doi: 10.1128/IAI.00431-19

Hu, H., Tian, M., Li, P., *et al.* (2020). *Brucella* infection regulates thioredoxin-interacting protein expression to facilitate intracellular survival by reducing the production of nitric oxide and reactive oxygen species. *J. Immunol.* **204**, 632-643. doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801550>

Huddleson, I. (1931). The differentiation of the species of the genus *Brucella*. *Am. J. Public Health Nations Health*, **21**, 491-98. doi: 10.2105/ajph.21.5.491

Huynh, K., Grinstein, S. (2007). Regulation of vacuolar pH and its modulation by some microbial species. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 452-462. doi:10.1128/MMBR.00003-07

Juhas, M., van der Meer, J., Gaillard, M., Harding, R., Hood, D., Crook, D. (2009). Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 376-393. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00136.x

Kaden, R., Ferrari, S., Jinnerot, T., Lindberg, M., Wahab, T., Lavander, M. (2018). *Brucella abortus*: determination of survival times and evaluation of methods for detection in several matrices. *BMC Infect. Dis.* **18**(259), 1-6. doi: 10.1186/s12879-018-3134-5.

Karsi, A., Lawrence, ML. (2007). Broad host range fluorescence and bioluminescence expression vectors for Gram-negative bacteria. *Plasmid*. **57**, 286-295. doi:10.1016/j.plasmid.2006.11.002

Ke, Y., Wang, Y., Li, W., Chen, Z. (2015). Type IV secretion system of *Brucella* spp. and its effectors. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **5**, 1-10. doi:10.3389/fcimb.2015.0007

Kim, J., Sha, Z., Mayfield, J. (2000). Regulation of *Brucella abortus* catalase. *Infect. Immun.* **68**, 3861-3866. doi: 10.1128/iai.68.7.3861-3866.2000

Kim, S., Watarai, M., Suzuki, H., Makino, S., Kodama, T., Shirahata, T. (2004). Lipid raft microdomains mediate class A scavenger receptor-dependent infection of *Brucella abortus*. *Microb. Pathog.* **37**, 11-19. doi:10.1016/j.micpath.2004.04.002

Lapaque, N., Moriyón, I., Moreno, E., Gorvel, JP. (2005). *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 60-66. doi:10.1016/j.mib.2004.12.003

Lee, Y. J., Won, T. J., Hyung, K. E., Jang, Y. W., Kim, S. J., Lee, D. I., et al. (2016). IL-6 induced proliferation and cytotoxic activity of CD8⁺ T cells is elevated by SUMO2 overexpression. *Arch. Pharm. Res.* **39**, 705-12. doi: 10.1007/s12272-016-0736-6

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**, 137-44. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.07.016.

Lim, S., Jung, JH., Blanchard, L., de Groot, A. (2019). Conservation and diversity of radiation and oxidative stress resistance mechanisms in *Deinococcus* species. *FEMS Microbiol. Rev.* **43**, 19-52. doi: 10.1093/femsre/fuy037

Ludanyi, M., Blanchard, L., Dulermo, R., et al. (2014). Radiation response in *Deinococcus deserti*: IrrE is a metalloprotease that cleaves repressor protein DdrO. *Mol. Microbiol.* **94**(2), 434-449. doi:10.1111/mmi.12774

Ma, R., Zhang, Y., Hong, H., Lu, W., Lin, M., Chen, M., Zhang, W. (2010). Improved osmotic tolerance and ethanol production of ethanologenic *Escherichia coli* by IrrE, a global regulator of radiation-resistance of *Deinococcus radiodurans*. *Curr. Microbiol.* **62**, 659-64. doi: 10.1007/s00284-010-9759-2.

Macedo, GC., Magnani, DM., Carvalho, B., Bruna-Romero, O., Gazzinelli, RT., Oliveira, SC. (2008). Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection. *J. Immunol.* **18**, 1080-1087. doi:10.4049/jimmunol.180.2.1080

Mancilla, M. (2011). The *Brucella* genomic island. En: López-Goñi, I., O'Callaghan, D., editores. *Brucella: molecular microbiology and genomics*. Norwich (UK): Horizon Scientific Press. 36-7.

Marino M, Banerjee M, Jonquières R, *et al.* (2002). GW domains of the *Listeria monocytogenes* invasion protein InlB are SH3-like and mediate binding to host ligands. *EMBO J.*, **21**(21), 5623-34. doi: 10.1093/emboj/cdf558

Martínez, P. (2013). Brucelosis humana: situación epidemiológica en Chile, 2001-2010. *Rev. Chilena Infectol.* **30**, 653-9. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182013000600013>

Martínez-Núñez, C., Altamirano-Silva, P., Alvarado-Guillén, F., *et al.* (2010). The two-component system BvrR/BvrS regulates the expression of the type IV secretion system VirB in *Brucella abortus*. *J. Bacteriol.* **192**, 5603-8. doi: 10.1128/JB.00567-10.

Martirosyan, A., Moreno, E., Gorvel, JP. (2011). An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. *Immunol. Rev.* **240**, 211-34. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00982.x

Martirosyan, A., Gorbel, JP. (2013). *Brucella* evasion of adaptive immunity. *Future Microbiol.* **8**, 147-54. doi: 10.2217/fmb.12.140.

Master, S., Springer, B., Sander, P., Boettger, E., Deretic, V., Timmins, G. (2002). Oxidative stress response genes in *Mycobacterium tuberculosis*: role of *ahpC* in resistance to peroxynitrite and stage-specific survival in macrophages. *Microbiology* **148**, 3139-44. doi: 10.1099/00221287-148-10-3139.

Meyer, K., Shaw, E. (1920). A comparison of the morphologic, cultural and biochemical characteristics of *B. abortus* and *B. melitensis* from cattle. Studies on the genus *Brucella* nov. gen. *J. Infect. Dis.*, **27**, 173-84.

Miller, C., Smith, E., Cundiff, J., Knodler, L., Blackburn, J., *et al.* (2017). A *Brucella* type IV effector targets the COG tethering complex to remodel host secretory traffic and promote intracellular replication. *Cell Host Microbe.* **22**, 317-29. doi: 10.1016/j.chom.2017.07.017.

Mills, K. (2004). Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 841-55. doi: 10.1038/nri1485.

Ministerio de Salud (Minsal), Gobierno de Chile (2004). Reglamento sobre notificación de enfermedades transmisibles de declaración obligatoria N° 158.

Ministerio de Salud (Minsal), Gobierno de Chile. (2015). Brucelosis. <https://www.minsal.cl/brucelosis/>

Moreno, E. (2014). Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Front. Microbiol.* **5**, 1-18. doi: 10.3389/fmicb.2014.00213.

Myeni, S., Child, R., Ng, TW., Kupko, JJ 3rd., Wehrly, TD., Porcella, SF., *et al.* (2013). *Brucella* modulates secretory trafficking via multiple type IV secretion effector proteins. *PLoS Pathog.* **9**:e1003556. doi:10.1371/journal.ppat.1003556

Naito, Y., Takagi, T., Higashimura, Y. (2014). Heme oxygenase-1 and anti-inflammatory M2 macrophages. *Arch. Biochem. Biophys.* **564**, 83-8. doi: 10.1016/j.abb.2014.09.005.

Oliveira, SC., de Oliveira, FS., Macedo, GC., de Almeida, LA., Carvalho, NB. (2008). The role of innate immune receptors in the control of *Brucella abortus* infection: Toll-like receptors and beyond. *Microbes Infect.* **10**, 1005-09. doi:10.1016/j.micinf.2008.07.005

Olsen, S., Palmer, M. (2014). Advancement of knowledge of *Brucella* over the past 50 years, 2014. *Vet. Pathol.* **51**, 1076-89. doi: 10.1177/0300985814540545.

Olsen, S., Stoffregen, W. (2014). Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. *Expert. Rev. Vaccines.* **4**, 915-28. doi: 10.1586/14760584.4.6.915.

Ortiz-Román, L., Riquelme-Neira, R., Vidal, R., 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.* **172**, 279-84. doi:10.1016/j.vetmic.2014.05.005

Page, R., Peti, W. (2016). Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nat. Chem. Biol.* **12**, 208-14. doi:10.1038/nchembio.2044

Pan, J., Wang, J., Zhou, Z., Yan, Y., Zhang W., Lu, W. (2009). IrrE, a global regulator of extreme radiation resistance in *Deinococcus radiodurans*, enhances salt tolerance in

Escherichia coli and *Brassica napus*. *PLoS One*. **4**(2): e4422. doi: 10.1371/journal.pone.0004422.

Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., *et al.* (2006a). The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect. Dis.* **6**, 91-9. doi: 10.1016/S1473-3099(06)70382-6.

Pappas, G., Panagopoulou, P., Christou, L., Akritidis, N. (2006b). *Brucella* as a biological weapon. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2229-36. doi: 10.1007/s00018-006-6311-4.

Pasquali, P., Thornton, A., Vendetti, S., *et al.* (2010). CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells limit effector T cells and favor the progression of brucellosis in BALB/c mice. *Microbes Infect.* **12**, 3-10. doi.org/10.1016/j.micinf.2009.09.005

Porte, F., Naroeni, A., Ouahrani-Bettache, S., 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**, 1481-90. doi: 10.1128/iai.71.3.1481-1490.2003.

Qing, G., Ma, L., Khorchid, A., Swapna, G., Mal, T., Takayama, M., *et al.* (2004). Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* **22**, 877-82. doi:10.1038/nbt984

Rajashekara, G., Glasner, J., Glover, D., Splitter, G. (2004). Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. *J. Bacteriol.* **186**, 5040-51. doi: 10.1128/JB.186.15.5040-5051.2004

Raschke, W., Baird, S., Ralph, P., Nakoinz, I. (1978). Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell.* **15**, 261-7. doi: 10.1016/0092-8674(78)90101-0.

Ratushna, V., Sturgill, D., Ramamoorthy, S., *et al.* (2006). Molecular targets for rapid identification of *Brucella* spp. *BMC Microbiol.* **6**, 1-20. doi: 10.1186/1471-2180-6-13.

Riquelme-Neira, R., Retamal-Díaz, A., Acuña, F., *et al.* (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**, 3663-7. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.06.013.

Rodríguez, J., Levitt, M., Chopra, G. (2012). KoBaMIN: A knowledge-based minimization web server for protein structure refinement. *Nucleic Acids Res.* **40**, 323-28. doi:10.1093/nar/gks376

Roop II, RM., Gaines, JM., Anderson, ES., Caswell, CC., Martin, DW. (2013). Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med. Microbiol. Immunol.* **198**, 1-28. doi:10.1007/s00430-009-0123-8

Salcedo, SP., Marchesini, MI., Lelouard, H., Fugier, E., Jolly, G., Balor, S., *et al.* (2008). *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. *PLoS Pathog.* **4**(2): e21. doi:10.1371/journal.ppat.0040021

Salem, S., Mohsen, A. (1997). Brucellosis in fish. *Vet. Med. (Praha)*, **42**, 5-7. PMID: 9123781

Sanjabi, S., Zenewicz, L., Kamanaka, M., *et al.* (2009). Anti- and pro-inflammatory roles of TGF- β , IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr. Opin. Pharmacol.* **9**(4), 447-53. doi: 10.1016/j.coph.2009.04.008.

Scholz, H., Hubalek, Z., Sedláček, I., *et al.* (2008). *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 375-82. doi: 10.1099/ijs.0.65356-0.

Scholz, H., Nöckler, K., Göllner, C., *et al.* (2010). *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 801-08. doi: 10.1099/ijs.0.011148-0.

Scholz, H., Revilla-Fernandez, S., Al Dahouk, S., *et al.* (2016) *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**, 2090-98. doi: 10.1099/ijsem.0.000998.

Schmidt, H., Hensel, M. (2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 14-56. doi: 10.1128/CMR.17.1.14-56.2004

Seleem, M., Boyle, S., Sriranganathan, N. (2010). Brucellosis: a re-emerging zoonosis. *Vet. Microbiol.* **140**, 392-8. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.06.021.

Servicio agrícola y ganadero, SAG. (2015). Situación sanitaria brucelosis bovina en Chile. Programa de erradicación de brucelosis bovina. 1-11.

Sharan, S., Thomason, L., Kuznetsov, S., Court, D. (2009). Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering. *Nat. Protoc.* **4**, 206-23. doi: 10.1038/nprot.2008.227

Sieira, R., Arocena, G., Bukata, L., Commerci, D., Ugalde, R. (2010). Metabolic control of virulence genes in *Brucella abortus*: HutC coordinates *virB* expression and the histidine

utilization pathway by direct binding to both promoters. *J. Bacteriol.* **192**, 217-24. doi: 10.1128/JB.01124-09

Sislema-Egas, F., Céspedes, S., Fernández, P., *et al.* (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. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.09.039.

Skendros, P., Boura, P. (2013). Immunity to brucellosis. *Rev. Sci. Tech.* **32**, 137-47. doi:10.20506/rst.32.1.2190

Solovyev, V., Salamov, A. (2011). Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences. En: metagenomics and its applications in agriculture, biomedicine and environmental studies (Ed. R.W. Li), *Nov. Sci. Publ.* 61-78.

Spera, J., Comerci, D., Ugalde, J. (2014). *Brucella* alters the immune response in a prpA-dependent manner. *Microb. Pathog.* **67-68**, 8-13. doi: 10.1016/j.micpath.2014.01.003.

Starr, T., Ng, TW., Wehrly, TD., Knodler, LA., Celli, J. (2008). *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic*. **9**, 678-94. doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00718.x

Steele, K., Baumgartner, J., Valderas, M., Roop II RM. (2010). Comparative study of the roles of AhpC and KatE as respiratory antioxidants in *Brucella abortus* 2308. *J. Bacteriol.* **192**, 4912-22. doi: 10.1128/JB.00231-10

Stoenner, H., Lackman, D. (1957). A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida* Thomas. *Am. J. Vet. Res.* **18**, 947-51.

Studier, F., Moffatt, B. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-30. doi:10.1016/0022-2836(86)90385-2

Wiederstein, M., Sippl, MJ. (2007). ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* **35**, 407-10. doi:10.1093/nar/gkm290

Vitry, M., Trez, C., Goriely, S., *et al.* (2012). Crucial role of gamma interferon-producing CD4⁺ Th1 cells but dispensable function of CD8⁺ T cell, B cell, Th2, and Th17 responses in

the control of *Brucella melitensis* infection in mice. *Infect. Immun.* **80**, 4271-80. doi:10.1128/IAI.00761-12

von Bargen, K., Gorvel, JP., Salcedo, SP. (2012). Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 533-62. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00334.x

Whatmore, A., Davison, N., Cloeckaert, A., *et al.* (2014) *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio spp.*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**, 4120-28. doi: 10.1099/ijs.0.065482-0.

Whisstock J, Lesk A. (1999). SH3 domains in prokaryotes. *Trends Biochem. Sci.*, **24**(4), 132-3. doi: 10.1016/s0968-0004(99)01366-3.

Xabier, M., Winter, M., Spees, A., *et al.* (2013). CD4+ T cell-derived IL-10 promotes *Brucella abortus* persistence via modulation of macrophage function. *PLoS Pathog.* **9**(6):e1003454. doi: 10.1371/journal.ppat.1003454.

Xie, Y., Wei, Y., Shen, Y., Li, X., Zhou, H., Tai, C., Deng, Z., Ou, HY. (2018). TADB 2.0: an updated database of bacterial type II toxin-antitoxin loci. *Nucleic Acids Res.* **46**, 749-53. doi: 10.1093/nar/gkx1033.

Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y. (2014). The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction. *Nat. Methods.* **12**, 7-8. doi:10.1038/nmeth.3213

Yates, R., Hermetter, A., Russel, D. (2005). The kinetics of phagosome maturation as a function of phagosome/lysosome fusion and acquisition of hydrolytic activity. *Traffic.* **6**, 413-20. doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00284.x

Yu, C., Lin, C., Kwang, J. (2004). Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. *Protein Sci.* **13**, 1402-06. doi:10.1110/ps.03479604

Zhang, Y., Ma, R., Zhao, Z., Zhou, Z., Lu, W., Zhang, W., Chen, M. (2010). IrrE, an exogenous gene from *Deinococcus Radiodurans*, improves the growth of and ethanol production by a *Zymomonas Mobilis* strain under ethanol and acid stress. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 1156-62. doi: 10.4014/jmb.0912.12036. DOI: 10.4014/jmb.0912.12036

Zhang, B., Gu, H., Yang, Y., *et al.* (2019a). Molecular mechanisms of AhpC in resistance to oxidative stress in *Burkholderia thailandensis*. *Front. Microbiol.* **10**, 1-11. doi: 10.3389/fmicb.2019.01483.

Zhang, J., Li, M., Li, Z., *et al.* (2019b). Deletion of the type IV secretion system effector VceA promotes autophagy and inhibits apoptosis in *Brucella*-infected human trophoblast cells. *Curr. Microbiol.* **76**, 510-19. doi:10.1007/s00284-019-01651-6

Zhao, P., Zhou, Z., Zhang, W., Lin, M., Chen, M., Wei, G. (2015). Global transcriptional analysis of *Escherichia coli* expressing IrrE, a regulator from *Deinococcus radiodurans*, in response to NaCl shock. *Mol. Biosyst.* **11**, 1165-71. doi: 10.1039/c5mb00080g.

Zhou, Z., Zhang, W., Chen, M., *et al.* (2011). Genome-wide transcriptome and proteome analysis of *Escherichia coli* expressing IrrE, a global regulator of *Deinococcus radiodurans*. *Mol. BioSyst.* **7**, 1613-20. doi: 10.1039/c0mb00336k

