



Universidad de Salamanca

Departamento de Microbiología y Genética

**Estudio de factores implicados en la
virulencia de *Brucella ovis* y *Brucella canis***

Memoria presentada por Ana Isabel Martín Martín
para optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca

2010

El Dr. **Ángel Domínguez Olavarri**, Director del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la tesis titulada "**Estudio de factores implicados en la virulencia de *Brucella ovis* y *Brucella canis***", presentada por Dña. Ana Isabel Martín Martín para optar al grado de Doctora en Biología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Luis R. Fernández Lago y la Dra. Nieves Vizcaíno Santiso en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expido y firmo la presente certificación en Salamanca a de Octubre de 2010.

Fdo. Ángel Domínguez Olavarri

El **Dr. Luis R. Fernández Lago** y la **Dra. Nieves Vizcaíno Santiso**, Profesores del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICAN:

Que la tesis titulada: "**Estudio de factores implicados en la virulencia de *Brucella ovis* y *Brucella canis***", presentada por Dña. Ana Isabel Martín Martín para optar al grado de Doctora en Biología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para **autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente**, extienden el presente certificado en Salamanca, a 13 de Octubre de 2010

Fdo. Dr. Luis R. Fernández Lago

Fdo. Dra. Nieves Vizcaíno Santiso

El presente trabajo de investigación ha sido financiado por los proyectos PI050091 del Instituto de Salud Carlos III, SA113A06 de la Junta de Castilla y León y AGL2008-04514-C03-02/GAN del Ministerio de Ciencia e Innovación.

Ana Isabel Martín Martín ha disfrutado de una beca y un contrato con cargo a los proyectos PI050091 del Instituto de Salud Carlos III y AGL2008-04514-C03-02/GAN del Ministerio de Ciencia e Innovación, respectivamente, durante la realización de la presente tesis doctoral

Agradecimientos

En primer lugar, quiero expresar mis más sinceros agradecimientos al Dr. Luis R. Fernández Lago y a la Dra. Nieves Vizcaíno Santiso por su total dedicación en la dirección de este trabajo de investigación y por toda la ayuda que me han brindado tanto científica como personalmente durante los años que hemos compartido y que ha hecho que recuerde la realización de esta tesis doctoral como una bonita etapa de vida.

A mi compañera Pilar por ofrecerme siempre su ayuda y por todas las anécdotas que nos han pasado en el animalario. A Paola por guiarme en mis inicios en el laboratorio.

Al Dr. Ignacio Moriyón por la cesión de las preparaciones de lipopolisacárido empleados en este estudio. Al Dr. José María Blasco y a las Dras. Clara Marín y María Jesús de Miguel, sin olvidar a los restantes miembros del departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Pamplona y de la Unidad de Sanidad Animal del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, por su inestimable ayuda y colaboración en la realización de esta tesis doctoral.

Al personal del animalario del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca y en especial, a Carmen Rodríguez, por su disposición y amabilidad a la hora de prestar sus servicios. Al Dr. Manuel Sánchez Hernández del Servicio de Secuenciación de ADN de la Universidad de Salamanca por su excelente labor.

A la Dra. Azucena Esparís Ogando por su enorme amabilidad a la hora de enseñarme el manejo de cultivos celulares.

A mis brujitas Pilar, Cristina, Laura, Belinda y Marisa por todos los momentos únicos e inolvidables que hemos vivido juntas y que espero que algún día puedan volver a repetirse. A Andrea por su amistad a pesar de la distancia que nos separa.

A Paula, Jaime, Pablo, Marta, Lorena, Óscar, Eugenia y Raúl por ser tan buenas personas y por todas las aventuras que nos han sucedido en cada uno de los viajes que hemos hecho.

A mis compañeros del laboratorio 214 por adoptarme a la hora del café y por todos los momentos divertidos que hemos pasado juntos.

Finalmente, a mis padres por apoyarme incondicionalmente en los momentos difíciles de la vida, por tener siempre en cuenta mi beneficio personal y por todos los ánimos que me han dado, porque nadie mejor que ellos conoce el trabajo, esfuerzo y a veces los disgustos que conlleva el realizar una tesis doctoral. A mis abuelos por sus inagotables mimos y por quererme tanto. A Julio por toda la comprensión que he recibido siempre de tu parte y por todo el cariño que me das.

*A mis Padres,
por su apoyo incondicional*

Índice

INTRODUCCIÓN

1. EL GÉNERO <i>Brucella</i> Y LA BRUCELOSIS.....	1
2. FACTORES RELACIONADOS CON LA VIRULENCIA DE <i>Brucella</i> spp. OBJETO DE ESTUDIO DE ESTE TRABAJO.....	3
2.1 El lipopolisacárido del género <i>Brucella</i>	3
2.1.1 Estructura química del lipopolisacárido.....	4
2.1.2 Papel del lipopolisacárido de <i>Brucella</i> spp. en la modulación de la respuesta inmune innata del hospedador.....	6
2.1.3 El lipopolisacárido y su papel en la internalización y multiplicación intracelular De <i>Brucella</i> spp. en células fagocíticas.....	11
2.2 Proteínas de la membrana externa mayoritarias del género <i>Brucella</i>	16
2.2.1 Una introducción general.....	16
2.2.2 Características de las proteínas de membrana externa que componen la familia Omp25/Omp31.....	18
2.3 Otros factores de virulencia de <i>Brucella</i> spp.....	24
2.3.1 El Sistema de Secreción de Tipo IV.....	24
2.3.2 Sistemas de regulación de la expresión génica en <i>Brucella</i> spp.....	27
2.3.3 Los glucanos cíclicos.....	31
2.3.4 La proteína transportadora BacA.....	33
3. ESPECIES NATURALMENTE RUGOSAS DE <i>Brucella</i>	34

OBJETIVOS

Objetivos.....	39
----------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS.....	41
1.1 Cepas de <i>Brucella</i> spp.....	41
1.2 Cepas de <i>Escherichia coli</i>	41
2. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE.....	42
2.1. <i>Brucella</i> spp.....	42
2.2. <i>Escherichia coli</i>	43
3. MATERIALES Y TÉCNICAS GENERALES DE BIOLOGÍA.....	43
3.1 Vectores de clonación empleados.....	43
3.2 Cebadores empleados.....	48
3.3 Plásmidos obtenidos.....	50
3.4 Métodos de transformación en bacterias.....	52
3.4.1 Transformación en <i>Escherichia coli</i>	52
3.4.2 Transformación en <i>Brucella</i> spp. por electroporación.....	52
3.5 Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	53
3.6 Extracción de ADN cromosómico de <i>Brucella</i>	54
3.7 Técnicas generales de manipulación y análisis de ADN.....	54
3.7.1 Reacciones enzimáticas.....	54
3.7.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	54
3.7.3 Secuenciación de ADN.....	55
3.7.4 Electroforesis de ADN en gel de agarosa.....	55
3.7.5 Purificación de ADN a partir de gel de agarosa.....	56
3.7.6 Hibridación de ácidos nucleicos.....	56
3.8 Técnicas inmunológicas.....	57
3.8.1 SDS-PAGE.....	57
3.8.2 Western Blot.....	58

3.8.3	Anticuerpos monoclonales utilizados.....	59
3.8.4	Detección de citoquinas.....	60
4.	OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A LAS PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA EXTERNA DE LA FAMILIA Omp25/Omp31.....	60
4.1	Genes de la familia <i>omp25/omp31</i> empleados.....	60
4.2	Construcción de los plásmidos portadores de los genes codificadores de las proteínas recombinantes.....	61
4.3	Inducción de la expresión de los genes recombinantes en <i>E. coli</i>	63
4.4	Obtención de los extractos celulares.....	64
4.5	Purificación de las proteínas recombinantes.....	64
4.6	Cuantificación de las proteínas recombinantes obtenidas.....	65
4.7	Inmunización de conejos y obtención de anticuerpos frente a las PMEs de la Familia Omp25/Omp31.....	65
4.8	Adsorción de los sueros de conejo obtenidos.....	65
5.	GENERACIÓN DE CEPAS MUTANTES EN <i>Brucella</i> spp.....	66
5.1	Obtención de cepas mutantes en los genes <i>omp25d</i> y <i>omp22</i> en las cepas <i>B. canis</i> RM6/66, <i>B. abortus</i> 2308 y <i>B. neotomae</i> 5K33.....	66
5.1.1	Construcción de los plásmidos recombinantes portadores de los genes <i>omp25d</i> y <i>omp22</i> inactivados.....	66
5.1.2	Sustitución de los genes silvestres <i>omp25d</i> y <i>omp22</i> por los genes inactivados en las distintas cepas de <i>Brucella</i>	67
5.3	Obtención de cepas mutantes de <i>B. ovis</i> PA en genes implicados en la virulencia de cepas lisas de <i>Brucella</i>	71
5.3.1	Obtención de una cepa de <i>B. ovis</i> PA con una mutación polar en el operón <i>virB</i>	71
5.3.2	Obtención de cepas mutantes no polares de <i>B. ovis</i> PA en los genes <i>vjbR</i> , <i>cgs</i> , <i>bacA</i> y <i>virB2</i>	75
6.	CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS MUTANTES Y REVERTIENTES SILVESTRES OBTENIDAS EN ESTE TRABAJO.....	82
6.1	Caracterización genotípica.....	82
6.2	Caracterización fenotípica clásica.....	83
6.2.1	Manipulación de las cepas y preparación de las suspensiones bacterianas.....	83
6.2.2	Control de pureza y estabilidad <i>in vitro</i> de los cultivos.....	83
6.2.3	Pruebas fenotípicas clásicas.....	84
6.3	Análisis del crecimiento.....	84
6.3.1	Preparación de los cultivos.....	84
6.3.2	Recuento de Unidades Formadoras de Colonia/ml a partir de cultivos en medio sólido.....	85
6.3.3	Crecimiento en medio líquido.....	85
6.4	Estudio de las propiedades relacionadas con la membrana externa.....	85
6.4.1	Autoaglutinación en medio líquido.....	85
6.4.2	Sensibilidad a la polimixina B.....	86
6.4.3	Sensibilidad al desoxicolato de sodio.....	86
6.4.4	Sensibilidad a pH ácido.....	87
6.4.5	Sensibilidad al peróxido de hidrógeno.....	87
6.4.6	Sensibilidad al suero no inmune humano.....	87
7.	ANÁLISIS DE LA VIRULENCIA EN RATÓN DE CEPAS MUTANTES Y SILVESTRES DE <i>Brucella</i>	88
7.1	Estudio de la cinética de multiplicación esplénica de diferentes cepas mutantes de <i>Brucella</i>	

7.2	Estudio de la cinética de multiplicación intracelular de diversas cepas de <i>Brucella</i> en macrófagos esplénicos.....	89
8.	CULTIVOS DE CÉLULAS HeLa, MACRÓFAGOS J774.A1 Y ENSAYOS DE INFECCIÓN.....	90
8.1	Líneas celulares empleadas.....	90
8.2	Medios y condiciones de cultivo.....	90
8.3	Congelación y almacenamiento de las líneas celulares.....	91
8.4	Ensayos de infección.....	91
8.5	Tratamientos previos al periodo de infección de los cultivos celulares.....	92
8.5.1	Tratamiento con filipina, β -metil-ciclodextrina y subunidad B de la toxina Colérica.....	92
8.5.2	Tratamiento con diferentes preparaciones de lipopolisacáridos purificados.....	92
8.5.3	Tratamiento con wortmanina.....	93
8.6	Evaluación de la citotoxicidad.....	93
9.	MÉTODOS ESTADÍSTICOS EMPLEADOS.....	93

RESULTADOS

1.	ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES ESTABLECIDAS ENTRE ESPECIES NATURALMENTE RUGOSAS DE <i>Brucella</i> Y LAS CÉLULAS FAGOCÍTICAS.....	95
1.1	Evaluación del efecto citotóxico y de los niveles de activación celular como respuesta a una infección por especies naturalmente rugosas de <i>Brucella</i>	95
1.2	Evaluación de la tasa de multiplicación intracelular de <i>B. ovis</i> PA y <i>B. canis</i> RM6/66 en células fagocíticas profesionales.....	96
1.3	Estudio de los mecanismos de infección de especies naturalmente rugosas de <i>Brucella</i> en macrófagos murinos.....	98
1.3.1	Análisis del papel desempeñado por los "lípidos rafts" en la infección y multiplicación intracelular de <i>B. ovis</i> PA y <i>B. canis</i> RM6/66 en macrófagos J774.A1.....	98
1.3.2	Análisis del papel llevado a cabo por el receptor SR-A en la internalización de <i>B. ovis</i> PA y <i>B. canis</i> RM6/66 en macrófagos murinos.....	99
1.3.3	Análisis del papel de la actividad enzimática de las PI3Ks en la entrada de <i>B. ovis</i> PA y <i>B. canis</i> RM6/66 en macrófagos murinos.....	101
2.	ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN E IMPLICACIÓN EN VIRULENCIA DE LAS PMEs DE LA FAMILIA Omp25/Omp31 EN <i>B. ovis</i> PA Y EN OTRAS ESPECIES DE <i>Brucella</i>	102
2.1	Estudio de la capacidad infectiva y de multiplicación intracelular de cepas mutantes de <i>B. ovis</i> PA en los genes de la familia <i>omp25/omp31</i> en cultivos celulares.....	102
2.2	Análisis de la presencia de las proteínas de la familia Omp25/Omp31 en <i>Brucella</i> spp.....	105
2.2.1	Detección inmunológica de las PMEs de la familia Omp25/Omp31 en <i>Brucella</i> spp.....	106
2.3	Estudio del papel de las PMEs Omp25d y Omp22 en la virulencia de la cepa naturalmente rugosa <i>B. canis</i> RM6/66 y en otras estirpes lisas de <i>Brucella</i>	110
2.3.1	Obtención de cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ de <i>B. canis</i> RM6/66, <i>B. abortus</i> 2308 y <i>B. neotomae</i> 5K33.....	111
2.3.2	Análisis de la sensibilidad a polimixina B, desoxicolato de sodio, suero no Inmune humano y peróxido de hidrógeno de las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ de <i>B. canis</i> RM6/66, <i>B. abortus</i> 2308 y <i>B. neotomae</i> 5K33.....	112
2.3.3	Estudio de la capacidad infectiva y de multiplicación intracelular de cepas mutantes de <i>B. canis</i> RM6/66, <i>B. abortus</i> 2308 y <i>B. neotomae</i> 5K33 en los genes <i>omp25d</i> y <i>omp22</i> en cultivos celulares.....	114
2.3.4	Evaluación de la virulencia en ratones BALB/c de las cepas mutantes de <i>B. canis</i> RM6/66 en los genes <i>omp25d</i> y <i>omp22</i>	115

3.	ESTUDIO DEL PAPEL DE DIVERSOS GENES IMPLICADOS EN LA VIRULENCIA DE ESTIRPES LISAS DE <i>Brucella</i> EN EL ESTABLECIMIENTO DEL PROCESO INFECCIOSO DE <i>B. ovis</i> PA.....	117
3.1	Construcción de cepas mutantes de <i>B. ovis</i> PA en el operón <i>virB</i> y en los genes <i>vjbR</i> , <i>cgs</i> , <i>bacA</i> y <i>virB2</i>	118
3.2	Verificación genotípica de las cepas mutantes y revertientes silvestres de <i>B. ovis</i> PA generadas.....	118
3.3	Caracterización fenotípica de la colección de cepas mutantes y revertientes silvestres de <i>B. ovis</i> PA.....	122
3.3.1	Caracterización fenotípica clásica.....	122
3.3.2	Análisis del crecimiento en medio sólido y líquido.....	122
3.3.3	Estudio de las propiedades de la membrana externa.....	126
3.4	Evaluación del efecto de la inactivación del operón <i>virB</i> y de los genes <i>vjbR</i> , <i>cgs</i> , <i>bacA</i> y <i>virB2</i> sobre la expresión de los genes de la familia <i>omp25/omp31</i> en <i>B. ovis</i> PA.....	128
3.5	Estudio de la virulencia en ratones BALB/c de las cepas mutantes de <i>B. ovis</i> PA en el operón <i>virB</i> y en los genes <i>vjbR</i> , <i>cgs</i> , <i>bacA</i> y <i>virB2</i>	131
3.6	Análisis de la capacidad infectiva y de multiplicación intracelular de las cepas mutantes de <i>B. ovis</i> PA en el operón <i>virB</i> y en los genes <i>vjbR</i> , <i>cgs</i> , <i>bacA</i> y <i>virB2</i> en cultivos de macrófagos murinos.....	132

DISCUSIÓN

1.	ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES ENTRE LAS CEPAS NATURALMENTE RUGOSAS <i>B. ovis</i> PA Y <i>B. canis</i> RM6/66 Y LAS CÉLULAS FAGOCÍTICAS.....	137
1.1	Evaluación del efecto citotóxico causado por una infección de <i>B. ovis</i> PA y <i>B. canis</i> RM6/66.....	137
1.2	Análisis del nivel de activación de los macrófagos infectados por <i>B. ovis</i> PA y <i>B. canis</i> RM6/66.....	138
1.3	Estudio de la tasa de multiplicación intracelular de <i>B. ovis</i> PA y <i>B. canis</i> RM6/66 en células fagocíticas profesionales.....	139
1.4	Estudio de los mecanismos de infección empleados por <i>B. ovis</i> PA y <i>B. canis</i> RM6/66.....	141
1.4.1	Papel de los "lípidos rafts" en la internalización y multiplicación intracelular de <i>B. ovis</i> PA y <i>B. canis</i> RM6/66 en macrófagos murinos.....	141
1.4.2	Implicación del receptor SR-A en la entrada de <i>B. ovis</i> PA y <i>B. canis</i> RM6/66 en macrófagos murinos.....	142
1.4.3	Papel de la actividad enzimática de las PI3Ks en la internalización de <i>B. ovis</i> PA y <i>B. canis</i> RM6/66 en macrófagos murinos.....	143
2.	ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS PMEs DE LA FAMILIA <i>Omp25/Omp31</i> EN <i>Brucella</i> spp. Y SU IMPLICACIÓN EN VIRULENCIA.....	145
2.1	Implicación de las PMEs <i>Omp25d</i> y <i>Omp22</i> en la internalización y multiplicación intracelular de la cepa naturalmente rugosa <i>B. ovis</i> PA en células fagocíticas.....	145
2.2	Estudio de la expresión de los genes de la familia <i>omp25/omp31</i> en diferentes especies de <i>Brucella</i>	146
2.3	Análisis del papel ejercido por las PMEs <i>Omp25d</i> y <i>Omp22</i> en la virulencia de la cepa naturalmente rugosa <i>B. canis</i> RM6/66 y de las cepas lisas <i>B. abortus</i> 2308 y <i>B. neotomae</i> 5K33.....	149
3.	ESTUDIO DEL POSIBLE PAPEL EJERCIDO POR GENES IMPLICADOS EN LA VIRULENCIA DE ESPECIES LISAS DE <i>Brucella</i> EN EL ESTABLECIMIENTO DE UNA INFECCIÓN POR <i>B. ovis</i> PA.....	150
3.1	El operón <i>virB</i> y el gen <i>virB2</i>	150
3.2	El gen <i>vjbR</i>	153
3.3	El gen <i>cgs</i>	155
3.4	El gen <i>bacA</i>	158

CONCLUSIONES	
Conclusiones.....	161
BIBLIOGRAFÍA	
Bibliografía.....	163
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DEL TRABAJO DE TESIS	
Publicaciones científicas derivadas del trabajo de tesis.....	193
APÉNDICES	
I. Abreviaturas utilizadas.....	215
II. Índice de Tablas.....	217
III. Índice de Figuras.....	218

Introducción

1. EL GÉNERO *Brucella* Y LA BRUCELOSIS.

El género *Brucella* fue descrito por primera vez por Meyer y Shaw en 1920 (Corbel and Brinley-Morgan, 1984) y debe su nombre al médico militar David Bruce, quien en 1887, fue el primero en aislar uno de los microbios que componen este género a partir de bazos de soldados británicos fallecidos acuartelados en la isla de Malta. Actualmente pertenece a la subdivisión α -2 de las proteobacterias y está filogenéticamente relacionado con bacterias patógenas de animales (*Bartonella* y *Rickettsia*) y de plantas (*Agrobacterium*), y con simbioses (*Rhizobium*) (Moreno *et al.*, 1990). Este género está compuesto por microorganismos Gram negativos, de forma cocobacilar de 0,5 – 0,7 μm de diámetro y 0,6 – 1,5 μm de longitud, aeróbicos, no fermentativos, inmóviles y con una temperatura óptima de crecimiento de 36 – 38 °C, aunque pueden llegar a sobrevivir en un intervalo de 20 a 40 °C. Su genoma contiene un 58 – 59 % de G+C (Guanina + Citosina) y en la mayoría de las cepas está organizado en dos cromosomas con un tamaño de 2,2 Mb y 1,1 Mb. Son además parásitos extracelulares e intracelulares facultativos (Moreno and Moriyón, 2002) que infectan una gran variedad de mamíferos, incluido el hombre, causando una de las zoonosis de mayor distribución e importancia mundial.

Tradicionalmente, en base a las diferencias en patogenicidad y en el rango de hospedador, en este género se han incluido seis especies clásicas responsables de causar brucelosis en mamíferos terrestres. Posteriormente, mediante estudios de hibridación ADN - ADN, se demostró la existencia de un alto grado de identidad (>90 %) entre las distintas especies de *Brucella* (Hoyer and McCullough, 1968a; Hoyer and McCullough, 1968b), lo que condujo a considerar que este género estaba formado por una única especie, *B. melitensis*, más diferentes biovariedades (Verger *et al.*, 1985; Verger *et al.*, 1987). A pesar de que esta nueva organización fue adoptada por algunos bancos de datos (GenBank) y colecciones de cultivo (United Kingdom National Culture Collection), ha persistido el empleo de la antigua clasificación debido tanto a su difusión, como a su utilidad a nivel epidemiológico. Además el criterio que utiliza coincide con diversos resultados obtenidos en estudios evolutivos y moleculares realizados. Por todo ello, esta clasificación tradicional ha sido reconocida de nuevo por el Subcomité de Taxonomía de *Brucella* (Osterman and Moriyón, 2006). De este modo, se distinguen las siguientes especies clásicas, con sus respectivos hospedadores preferentes: *B. melitensis* (cabras y ovejas), *B. abortus* (vacas), *B. suis* (cerdos), *B. canis* (perros), *B. ovis* (carneros) y *B. neotomae* [aislada únicamente de la rata del desierto *Neotoma lepida* (Corbel and Brinley-Morgan, 1984)]. Aunque cada una de estas especies posee un hospedador primario, también se han llegado a aislar cepas de *Brucella* en una gran variedad de especies de mamíferos silvestres como bisontes, ciervos, zorros, liebres, búfalos africanos, jabalíes y caribúes (Davis and Elzer, 2002).

En los últimos años, se han aislado de mamíferos marinos, varias cepas bacterianas que muestran un perfil metabólico, bioquímico y proteico concordante con el presentado por especies del género *Brucella*, pero que no se ajusta completamente a las características mostradas por las seis especies clásicas descritas anteriormente. Actualmente, estas cepas se incluyen en las especies *B. ceti* y *B. pinnipedialis*, que engloban cepas aisladas de pinnípedos y cetáceos, respectivamente (Foster *et al.*, 1996; Jahans *et al.*, 1997; Foster *et al.*, 2007; Dawson *et al.*, 2008). Sin embargo, también se ha producido algún aislamiento ocasional en humanos, lo que indica su potencial patógeno para humanos (Sohn *et al.*, 2003). Más recientemente, se han descrito otras dos nuevas especies: *B. microti*, aislada inicialmente del topillo común *Microtus arvalis* (Scholz *et al.*, 2008; Audic *et al.*, 2009) y *B. inopinata*, aislada de un implante de mama en una paciente de 71 años de edad con signos clínicos de brucelosis (De *et al.*, 2008; Scholz *et al.*, 2010).

A pesar de la similitud que existe entre las seis especies clásicas de *Brucella* a nivel del ADN, la virulencia y facilidad de transmisión al hombre que presentan difiere de una especie a otra (Moreno *et al.*, 2002). Así, salvo *B. ovis* y *B. neotomae*, el resto de las especies han sido aisladas de pacientes con brucelosis, siendo *B. melitensis* la que presenta un mayor grado de patogenicidad para el hombre. La fiebre de Malta, fiebre ondulante o enfermedad de Bang, como también es conocida la brucelosis humana, se caracteriza por la aparición de episodios recurrentes de fiebre, escalofríos, sudoración nocturna, pérdida de peso, cefalea, artralgias, esplenomegalia y linfadenopatías (Corbel, 1990; Dornand *et al.*, 2002), que en algunos casos, causa la muerte del paciente. Dicha enfermedad se suele contraer por contacto directo con el animal infectado o a través de la ingesta de alimentos contaminados, como leche o queso sin pasteurizar.

En animales, la brucelosis se caracteriza por ser una enfermedad que afecta principalmente a los aparatos reproductores de machos y hembras, provocando fiebre recurrente, aborto y problemas de fertilidad en el hospedador. Debido a ello, causa grandes pérdidas económicas dentro del sector ganadero dedicado principalmente a la explotación del ganado bovino, ovino, porcino o caprino.

El diagnóstico de la brucelosis se lleva a cabo generalmente a través del aislamiento del patógeno mediante hemocultivo y mediante la detección de anticuerpos específicos frente a *Brucella* spp. en sangre por seroaglutinación (O.I.E., 2004; Nielsen and Yu, 2010), aunque en los últimos años se están desarrollando nuevas pruebas complementarias basadas en métodos moleculares que permitan mejorar el diagnóstico de la enfermedad.

El control de la brucelosis se basa en la erradicación de la enfermedad en el reservorio animal, lo cual exige la identificación sistémica y eliminación de aquellos que se encuentran infectados, así como la vacunación de los animales susceptibles. Hasta el momento, en el control de la brucelosis animal se emplean las vacunas vivas atenuadas

B. abortus S19 y *B. abortus* RB51 (para el ganado bovino) (Nicoletti, 1990; Schurig *et al.*, 1991; Schurig *et al.*, 2002) y *B. melitensis* Rev1 (para el ganado ovino y caprino) (Blasco, 1997; Schurig *et al.*, 2002), las cuales, a pesar de ser eficientes, presentan varios inconvenientes tales como, riesgo de abortos, interferencia en el diagnóstico de la infección en el caso de las cepas vacunales lisas o riesgo de infección en su manipulación para el hombre, por lo que actualmente se sigue intentando obtener nuevas vacunas mejoradas que no tengan estos efectos secundarios.

2. FACTORES RELACIONADOS CON LA VIRULENCIA DE *Brucella* spp. OBJETO DE ESTUDIO DE ESTE TRABAJO.

Las especies de *Brucella*, patógenos extracelulares e intracelulares facultativos, se han adaptado a lo largo de la evolución a sobrevivir bajo diferentes condiciones, evadiendo a su vez, los diferentes mecanismos de defensa del organismo hospedador. Sin embargo, se ha observado que *Brucella* carece de factores clásicos de virulencia, tales como plásmidos o bacteriófagos lisogénicos, producción de exotoxinas, variación antigénica o presencia de cápsula o fimbrias. Por tanto, otros deben ser los factores o mecanismos que estén implicados en la virulencia que presentan las especies de *Brucella* y que les permite sobrevivir y replicarse con éxito en células fagocíticas tanto profesionales como no profesionales. Varios han sido los candidatos propuestos a ejercer tal función en esta bacteria, siendo los más importantes los detallados a continuación.

2.1 El lipopolisacárido del género *Brucella*.

El lipopolisacárido (LPS) del género *Brucella* posee una estructura química peculiar que lo diferencia del LPS clásico presentado por otras bacterias Gram negativas. Por ello, confiere unas propiedades especiales a la bacteria que le proporcionan protección frente a los mecanismos de defensa del organismo hospedador. Entre estas propiedades se encuentran: una baja endotoxicidad, una alta resistencia a la degradación por macrófagos y una baja inmunogenicidad (Moreno *et al.*, 1981; Forestier *et al.*, 1999; Forestier *et al.*, 2000; Lapaque *et al.*, 2005). Además el LPS de *Brucella* spp. puede hallarse en fase lisa (S-LPS) o en fase rugosa (R-LPS) según la presencia o ausencia de cadenas polisacáridicas O en su estructura. Así, las especies que componen este género se dividen en lisas o rugosas. Dentro de las seis especies clásicas de *Brucella*, *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. neotomae* poseen un S-LPS, mientras que *B. ovis* y *B. canis* son especies naturalmente rugosas. Se ha observado que el LPS en fase lisa es muy importante para la virulencia de la bacteria ya que mutantes rugosos obtenidos a partir de estirpes lisas se encuentran atenuados (Allen *et al.*, 1998; Godfroid *et al.*,

1998; McQuiston *et al.*, 1999; Foulongne *et al.*, 2000; Ugalde *et al.*, 2000; Monreal *et al.*, 2003; Porte *et al.*, 2003; González *et al.*, 2008). Por ello, el S-LPS ha sido ampliamente estudiado y está considerado como un factor de virulencia en este género. Sin embargo, cabe destacar, que tanto *B. ovis* como *B. canis*, sin presentar un LPS en fase lisa, son virulentas en sus respectivos hospedadores y que en la actualidad, poco es lo que se conoce sobre los posibles factores y mecanismos que se hallan implicados en el establecimiento del proceso infeccioso de ambas especies.

2.1.1 Estructura química del lipopolisacárido.

El LPS de las bacterias Gram negativas en general, y del género *Brucella* en particular, se encuentra ubicado en la membrana externa de la bacteria, la cual está constituida también por fosfolípidos y proteínas distribuidos asimétricamente. La molécula de LPS está formada por una parte glucolípídica e hidrofóbica (el denominado lípido A) insertada en la membrana externa y no expuesta a la superficie de la bacteria, y otra parte totalmente sacarídica, dirigida hacia el exterior. Ésta última se divide a su vez en dos secciones: el núcleo (la parte más interna) y las cadenas polisacarídicas O, presentes únicamente en aquellas especies que poseen un S-LPS, como ya se ha mencionado anteriormente (Figura 1).

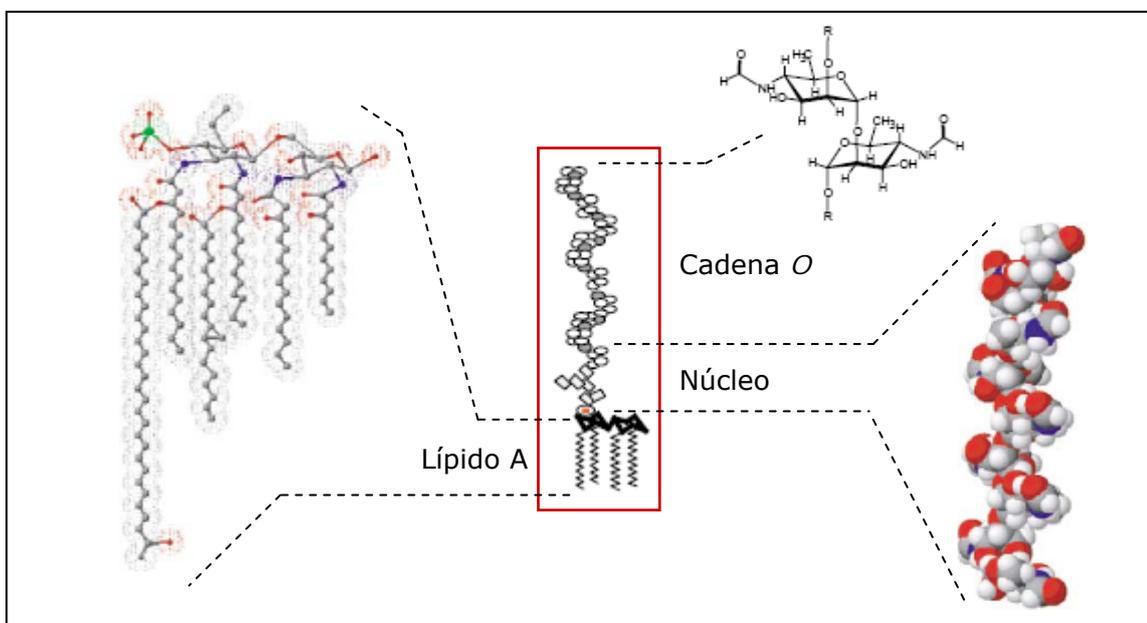


Figura 1. Esquema estructural simplificado del lipopolisacárido en fase lisa de *Brucella* spp. El S-LPS de estirpes lisas de *Brucella* está constituido por: **el lípido A**, formado por diaminoglucosa unida a diferentes ácidos grasos de cadena larga, una región central denominada **núcleo** que contiene ácido 2-ceto 3-desoxioctulosónico, glucosamina, quinovosamina, glucosa y manosa, y por homopolímeros de N-formilperosamina proyectados hacia el exterior de la membrana externa, llamados **cadena O**. Esquema tomado y modificado de Lapaque *et al.*, 2005.

- El lípido A.

Se ha observado que el lípido A de la especie *B. abortus*, aunque es químicamente diferente al de bacterias Gram negativas clásicas, posee una estructura que está presente también en algunos géneros de las α -2 proteobacterias relacionados filogenéticamente con *Brucella* spp., como por ejemplo, *Ochrobactrum* y *Mesorhizobim* (Moreno *et al.*, 1990). El lípido A del género *Brucella* está constituido por un esqueleto disacárido de diaminoglucosa [2,3-diamino-2,3-didesoxi-D-glucosa unidos mediante enlace β (1-6)] que puede estar en algunas ocasiones mono o bifosforilado en las posiciones 1' ó 1' + 4', respectivamente (Rojas *et al.*, 1994; Iriarte *et al.*, 2004). Por otra parte, a este esqueleto se encuentran unidos, mediante enlaces éster y amida, β -hidroxiácidos [3-OH-C_{12:0} hasta VLCFAs ("Very long chain fatty acids") como 27-OH-C_{28:0} ó 29-OH-C_{30:0}] y otros ácidos grasos de cadena larga (C_{16:0} a C_{18:0}) (Moreno *et al.*, 1990; Bhat *et al.*, 1991). Hasta el momento, no se ha detectado ni etanolamina ni otros azúcares neutros formando parte de la composición del lípido A de *Brucella*, a diferencia de lo que sucede en otras bacterias Gram negativas (Moreno *et al.*, 1990; Freer *et al.*, 1995). Además, se ha observado que existe una fuerte asociación entre proteínas de la membrana externa y el lípido A, ya que cuando se obtienen extractos de LPS, éstos contienen fragmentos de proteínas que no se eliminan mediante el empleo de los procedimientos convencionales usados para enterobacterias (Moreno *et al.*, 1981; Rojas *et al.*, 1994).

En enterobacterias, el grado de heterogeneidad que presenta el lípido A es mayor debido a las diferentes combinaciones en las que se pueden vincular los ácidos grasos, los grupos fosfato, los azúcares neutros, la etanolamina y los diferentes tipos de azúcares amino que conforman la molécula. En cambio, en el género *Brucella*, existen menos variantes de lípido A ya que la heterogeneidad que presenta deriva del número de ácidos grasos unidos y de las posibles diferencias que puedan existir entre ellos debidas prácticamente a la presencia de 1 o 2 grupos fosfato en las posiciones 1' y 4' (Freer *et al.*, 1995; Iriarte *et al.*, 2004; Cardoso *et al.*, 2006). Además, se ha comprobado que el lípido A de *Brucella* es poco endotóxico y que contribuye a la resistencia que muestra la membrana externa de este género a la acción de antibióticos y péptidos catiónicos (Rasool *et al.*, 1992, Freer *et al.*, 1996; Manterola *et al.*, 2005; Caro-Hernández *et al.*, 2007).

- Núcleo oligosacárido.

Diferentes análisis cualitativos han demostrado que el núcleo oligosacárido del LPS de *B. abortus* está constituido por ácido 2-ceto-3-desoxioctulosónico (KDO), 2-amino-2-desoxiglucosa (glucosamina), 2-amino-2,6-didesoxi-D-glucosa (quinovosamina), glucosa y manosa. Sin embargo, no se han observado en su estructura otros

componentes comunes del núcleo de otras α -proteobacterias, como heptosa, fosfatos o ácido galacturónico (Iriarte *et al.*, 2004).

- Cadenas polisacáridicas O.

Estas cadenas polisacáridicas, ligadas al núcleo y proyectadas hacia el exterior de la bacteria, se encuentran presentes solamente en el LPS de especies lisas de *Brucella*. Son homopolímeros sin ramificaciones de N-formilperosamina, con una media de longitud de cadena normalmente de entre 96 – 100 subunidades glicosídicas. Estos residuos están unidos en algunas cepas exclusivamente por enlaces α (1-2) (por ejemplo, en *B. suis* 1330 y *B. abortus* 544) y en otras sin embargo, mediante enlaces α (1-2) y α (1-3) en diferentes proporciones (4:1 en *B. melitensis* 16M) (Garín-Bastuji *et al.*, 1990; Iriarte *et al.*, 2004). Estas uniones generan tres tipos básicos de epítomos en *Brucella* (el A, el M y el C o común) confirmados todos ellos mediante estudios con anticuerpos monoclonales (Wilson and Miles, 1932; Douglas and Buchanan, 1980; Bundle *et al.*, 1989; Meikle *et al.*, 1989; Cloeckert *et al.*, 1992a; Cloeckert *et al.*, 1993; Rojas *et al.*, 1994). Aparte de éstos, se ha demostrado la existencia de otros epítomos que muestran reacciones cruzadas con *Yersinia enterocolitica* 0:9 (denominados C/Y) (Bundle *et al.*, 1989; Meikle *et al.*, 1989; Weynants *et al.*, 1997; Cloeckert *et al.*, 1998).

2.1.2 Papel del lipopolisacárido de *Brucella* spp. en la modulación de la respuesta inmune innata del hospedador.

La peculiar estructura química que presenta el LPS de *Brucella* le confiere a la bacteria unas propiedades que le permiten condicionar la respuesta inmune innata del organismo hospedador. Fundamentalmente, se ha observado que el LPS se encuentra implicado en la resistencia de la bacteria a la acción bactericida de péptidos catiónicos y del complemento, y en la inhibición de la síntesis de diferentes mediadores inmunitarios necesarios para la activación de distintos mecanismos de defensa antimicrobianos (Lapaque *et al.*, 2005).

- Resistencia a péptidos catiónicos bactericidas.

Es bien conocido en la actualidad que el LPS de *Brucella* constituye una eficiente barrera protectora frente a mecanismos bactericidas extracelulares y frente a la actividad antimicrobiana de células fagocíticas. Se ha demostrado que este género posee una elevada resistencia a una gran variedad de péptidos catiónicos bactericidas tales como, defensinas NP-2, lactoferrina, cecropina, lisozima, péptidos derivados de batenecina y polimixina B, así como también a extractos lisosomales de leucocitos polimorfonucleares (Riley and Robertson, 1984; Martínez de Tejada *et al.*, 1995; Freer *et al.*, 1996; Velasco

et al., 2000; Manterola *et al.*, 2005; Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2010). Se ha postulado que la responsable de esta marcada resistencia es la estructura química que posee el LPS. Así, el hecho de que el núcleo oligosacárido y el lípido A no presenten muchos constituyentes cargados negativamente, como por ejemplo, azúcares ácidos o grupos fosfatos, facilita la agregación de moléculas de LPS a través de sus ácidos grasos, evitando la unión y penetración de los péptidos catiónicos (Moriyón and López-Goñi, 1998; Lapaque *et al.*, 2005). Resulta por ejemplo sorprendente, la ausencia del azúcar básico 4-amino-arabinosa (arabinosamina) en el lípido A de *Brucella*, ya que en otras bacterias Gram negativas, este azúcar actúa neutralizando la carga negativa neta de la estructura, lo que aumenta la resistencia de la membrana externa a la acción de estos péptidos antimicrobianos (Iriarte *et al.*, 2004). Por otra parte, se ha indicado que la estructura del núcleo oligosacárido de *Brucella* crea por sí misma un bloque estérico que dificulta el acceso de policationes tanto al KDO como a otros grupos aniónicos del lípido A, contribuyendo así a incrementar la resistencia a estos agentes bactericidas (Martínez de Tejada *et al.*, 1995; Velasco *et al.*, 2000; Iriarte *et al.*, 2004). Además del papel relevante que presenta el complejo núcleo-lípido A en la protección frente a los péptidos catiónicos, se ha propuesto también una posible implicación de las cadenas polisacáridicas *O*, ya que podrían disminuir la exposición de grupos aniónicos del LPS (Martínez de Tejada *et al.*, 1995). Sin embargo, *B. ovis* PA, una especie naturalmente rugosa carente de cadenas *O*, muestra una mayor resistencia a la acción del polication bactericida polimixina B que algunas cepas lisas de *Brucella*, lo que revela que esta cepa presenta unas particulares propiedades en su membrana externa (Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2010).

- Inhibición del sistema del complemento.

Se ha demostrado que el LPS de *Brucella* también se encuentra involucrado en la inhibición de la cascada del complemento, lo que favorece la supervivencia extracelular de este patógeno (Corbeil *et al.*, 1988; Eisenschenk *et al.*, 1995; Allen *et al.*, 1998; Fernández-Prada *et al.*, 2001). Según varias evidencias experimentales obtenidas en diversos estudios, parece ser que las especies de *Brucella* inducen una débil activación de la ruta alternativa del complemento, estando solamente implicadas en la eliminación del patógeno, la ruta clásica y la mediada por las lectinas (Hoffmann and Houle, 1983; Fernández-Prada *et al.*, 2001). Se ha observado que *B. abortus* posee una particular resistencia a sueros no inmunes, la cual es debida en parte, a que las cadenas polisacáridicas *O* de su LPS bloquean el acceso de C1q (subunidad proteica del primer componente del complemento en la ruta clásica) a las proteínas de la membrana externa de *Brucella* spp. (Eisenschenk *et al.*, 1999; Fernández-Prada *et al.*, 2001). Este hecho ha llevado a formular la hipótesis de que las cadenas *O*, por su longitud y densidad, podrían

enmascarar posibles receptores para el complemento, actuando además como un escudo protector frente a este mecanismo defensivo (Moreno *et al.*, 1981; Eisenschenk *et al.*, 1999). Sin embargo, la resistencia que presenta el género *Brucella* a la lisis por el complemento no depende exclusivamente de la presencia de estas cadenas polisacáridicas en la molécula de LPS, ya que se ha observado que especies naturalmente rugosas muestran una menor o igual sensibilidad que cepas lisas a la actividad de suero no inmune de cordero (Estein *et al.*, 2004; Caro-Hernández *et al.*, 2007). Por tanto, deben existir otras diferencias en la superficie de las especies de *Brucella* que expliquen este distinto comportamiento (Martín-Martín *et al.*, 2010). Recientemente, se ha indicado que la fosfatidilcolina, un fosfolípido típicamente relacionado con células eucariotas y que se encuentra en abundancia en la membrana externa de *Brucella*, podría estar involucrada en la resistencia mostrada por este género tanto al complemento como a los péptidos antimicrobianos (Conde-Álvarez *et al.*, 2006; Aktas *et al.*, 2010).

- Interferencia con la respuesta inmunitaria del organismo hospedador.

El LPS, uno de los principales componentes de la superficie de *Brucella* spp., aparte de constituir una eficiente barrera protectora para la bacteria, también interfiere con la respuesta inmunitaria que pone en marcha el organismo hospedador en defensa a la infección. Así, impide el acceso de moléculas efectoras del sistema inmune, tales como los anticuerpos, a otros componentes de la membrana externa que se encuentran enmascarados por él. Por ejemplo, se ha observado mediante ensayos realizados por citometría de flujo, ensayos inmunoenzimáticos (ELISAs) y microscopía electrónica, que en cepas rugosas de *Brucella*, la unión de anticuerpos monoclonales específicos frente a proteínas de membrana externa (PMEs) es mayor que en cepas lisas, en las cuales, la presencia de cadenas O hace que la accesibilidad de las PMEs sea menor (Bowden *et al.*, 1995a).

Por otro lado, diversas investigaciones han demostrado que la actividad endotóxica que presenta el LPS del género *Brucella* es muy baja en comparación con otras moléculas de LPS de bacterias patógenas Gram negativas (Moreno *et al.*, 1981; Goldstein *et al.*, 1992; Rasool *et al.*, 1992). Esta peculiar propiedad se considera que pueda ser una adaptación evolutiva a una vida intracelular ya que esta característica se ha observado también en otros patógenos intracelulares, tales como *Bartonella* y *Legionella* (Moreno *et al.*, 1981; Zähringer *et al.*, 1995; Zähringer *et al.*, 2004). Debido a esa baja endotoxicidad que posee, el LPS de *Brucella* es un débil inductor de la respuesta inflamatoria del organismo hospedador (Roop *et al.*, 2009). Se ha indicado que las cadenas polisacáridicas O podrían tener un papel relevante en la prevención de la inducción de la síntesis de citoquinas en macrófagos, ya que podrían impedir el reconocimiento de posibles patrones moleculares asociados con el patógeno ("Pathogen-

associated molecular patterns", PAMPs) por parte de receptores de células inmunes, tales como, los receptores tipo Toll ("Toll-like receptors", TLRs) (Huang *et al.*, 2003; Rittig *et al.*, 2003; Jiménez de Bagüés *et al.*, 2004; Billard *et al.*, 2007a). El hecho de que *Brucella* spp. interfiera en el desarrollo de un correcto patrón de citoquinas durante los primeros estadios del proceso infeccioso desencadena por un lado, que la respuesta inmune innata no sea lo suficientemente eficiente y por otro lado, que la respuesta inmune adaptativa no se establezca adecuadamente ya que ésta depende de las primeras señales emitidas tras detectar al microorganismo patógeno. Dentro de las citoquinas que ejercen un papel importante en la organización de la respuesta inmune frente a *Brucella* spp. se encuentran la interleucina 12 (IL12), el interferón gamma (INF γ) y el factor de necrosis tumoral (TNF α) (Ko *et al.*, 2003).

El TNF α , secretado por las células T $\gamma\delta$ del sistema inmune al activarse por mecanismos que todavía se desconocen y por los macrófagos tras ser infectados, actúa activando a los propios macrófagos y a las células NK ("natural killer") de la respuesta innata (Dornand *et al.*, 2002) (Figura 2). Se ha observado que *B. suis* inhibe la síntesis de TNF α por macrófagos humanos, acción que favorece al establecimiento de la infección en el hospedador debido a que también repercute en la maduración de las células presentadoras de antígeno profesionales: las células dendríticas (Caron *et al.*, 1996; Billard *et al.*, 2007b). Por otra parte, al no producirse la activación del macrófago, éste no sintetiza IL12, una citoquina clave ya que es la responsable de que los linfocitos T CD4+ se diferencien hacia el subtipo celular Th1, conduciendo al sistema inmune a una respuesta adaptativa fundamentalmente celular (Zhan and Cheers, 1995; Zhan and Cheers, 1998) (Figura 2). Un componente crucial en esta respuesta celular es el INF γ producido por los linfocitos Th1 y CD8+ y por las células NK y T $\gamma\delta$, el cual actúa como un potente inductor de la actividad bactericida de los macrófagos y de los linfocitos CD8+ (Jiang and Baldwin, 1993; Oliveira *et al.*, 1995; Fernández-Lago *et al.*, 1996; Dornand *et al.*, 2002; Ko *et al.*, 2003) (Figura 2).

Existen evidencias genéticas que sugieren que el lípido A podría tener un papel importante en la modulación que ejerce *Brucella* spp. de la respuesta inmune del hospedador; se ha observado que una cepa mutante de *B. abortus* que presenta un lípido A defectuoso en cuanto a su composición en ácidos grasos de cadena larga, además de ser más sensible a la acción bactericida del sistema del complemento, induce una mayor respuesta proinflamatoria en el organismo que la hospeda que la cepa parental (Parent *et al.*, 2007). Recientemente, han sido identificadas en el género *Brucella* dos proteínas que podrían también intervenir en la modulación de la respuesta inmune. Se trata de la proteína TcpB o BTP1, implicada en la inhibición de la maduración y de la actividad funcional de las células dendríticas (Cirl *et al.*, 2008; Salcedo *et al.*, 2008; Radhakrishnan *et al.*, 2009; Sengupta *et al.*, 2010), y de la proteína PrpA, responsable de inducir una activación policlonal no específica de células B y de promover una fuerte producción de

interleucina 10. Este hecho hace que la supervivencia de *Brucella* spp. en el hospedador se vea favorecida ya que esta citoquina, a la vez que se encuentra implicada en el desarrollo de una respuesta adaptativa humoral mediada por los linfocitos Th2, ejerce una regulación negativa en la proliferación de células Th1 de la inmunidad celular (Fernandes and Baldwin, 1995; Spera *et al.*, 2006) (Figura 2).

Por otro lado, se ha demostrado que el S-LPS purificado de *B. abortus* también es un débil inductor de la explosión oxidativa y de la secreción de lisozima por células fagocíticas infectadas (Rasool *et al.*, 1992; Lapaque *et al.*, 2005). Adicionalmente, *Brucella* spp. posee otros mecanismos que la ayudan a protegerse de los intermediarios de oxígeno y nitrógeno producidos en la explosión oxidativa de los macrófagos (Jiang *et al.*, 1993). De este modo, tanto superóxidos dismutasas citoplasmáticas como citocromos oxidasas parecen estar involucradas en la prevención de la toxicidad por radicales de oxígeno (Tatum *et al.*, 1992; Lynch and Kuramitsu, 2000; Gee *et al.*, 2005). Además, para contrarrestar el efecto bactericida que ejerce el óxido nítrico producido por la enzima inducible óxido nítrico sintetasa (iNOS) en macrófagos infectados, se ha detectado que *Brucella suis* emplea una enzima óxido nítrico reductasa (Nor) (Gross *et al.*, 2000; Loisel-Meyer *et al.*, 2006). Asimismo, actualmente se está investigando el papel que pueden ejercer las proteínas AhpC en la protección de la bacteria frente a otro potente agente microbicida, el peroxinitrito (ONOO⁻) (Steele *et al.*, 2010), lo que también favorecería la replicación intracelular de este patógeno (Bryk *et al.*, 2000; Roop *et al.*, 2009).

Por último, cabe señalar el papel que ejerce el S-LPS en la inhibición de la presentación de antígenos por parte de los macrófagos a los linfocitos T CD4+. Se ha observado que cuando el S-LPS de *B. abortus* es fagocitado por macrófagos, éste sigue la ruta clásica endocítica empleada por las proteínas antigénicas, pero a un ritmo mucho más lento debido a la resistencia que presentan las cadenas polisacáridicas O a ser degradadas por la célula hospedadora (Forestier *et al.*, 1999). Al cabo de unas 6 - 24 horas, las moléculas de S-LPS, que se encuentran alojadas en compartimentos celulares enriquecidos en complejos mayores de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), son recicladas hacia la membrana del macrófago. En ella, junto con los complejos MHC-II, forman agrupaciones denominadas macrodominios (Forestier *et al.*, 1999; Forestier *et al.*, 2000) que se caracterizan por ser estructuras eléctricamente densas, poco fluidas, estables a lo largo del tiempo y resistentes a detergentes (Lapaque *et al.*, 2006). Estos macrodominios forman una barrera que interfiere en la presentación de péptidos antigénicos a través de los complejos MHC-II entre el macrófago y los linfocitos T CD4+, impidiendo que se produzca entonces, una respuesta inmune efectiva del hospedador (Forestier *et al.*, 2000). Se puede considerar por tanto, como otra estrategia empleada por el género *Brucella* para poder sobrevivir y replicarse intracelularmente en los macrófagos por periodos prolongados de tiempo (Lapaque *et al.*, 2005; Lapaque *et al.*,

2006).

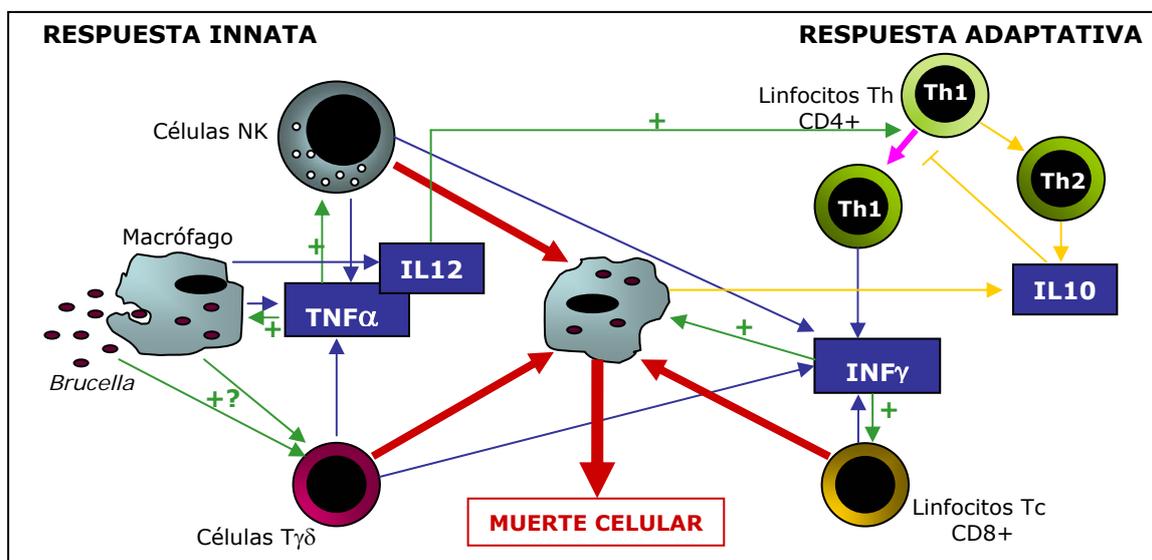


Figura 2. Principales citoquinas secretadas en respuesta a una infección por *Brucella* spp. y su papel en el control del proceso infeccioso. Tras producirse una infección por *Brucella* spp., diversos componentes celulares inmunológicos sintetizan una serie de citoquinas (flechas azules) encargadas de activar y organizar una respuesta inmune adecuada frente al patógeno (flechas verdes). Entre estas citoquinas destaca la producción de interleucina 12 (IL12), responsable de dirigir al sistema inmune hacia una respuesta adaptativa principalmente celular (flecha rosa) y no humoral (flechas amarillas), y de factor de necrosis tumoral (TNF α) e interferón gamma (INF γ) que potencian la función citotóxica ejercida por las células NK, las células T $\gamma\delta$ y los linfocitos T CD8+ con el fin de eliminar todas aquellas células infectadas por el patógeno (flechas rojas).

2.1.3 El lipopolisacárido y su papel en la internalización y multiplicación intracelular de *Brucella* spp. en células fagocíticas.

- El tráfico intracelular del género *Brucella* hasta su nicho replicativo.

Es bien conocida en la actualidad, la capacidad que presentan las especies de *Brucella* en fase lisa para entrar, sobrevivir y multiplicarse en células fagocíticas no profesionales como trofoblastos de la placenta (Meador and Deyoe, 1989; Samartino and Enright, 1993) y células epiteliales (Shepard, 1959; Detilleux *et al.*, 1990; Pizarro-Cerdá *et al.*, 2000; Ferrero *et al.*, 2009) así como también, en células fagocíticas profesionales como células dendríticas y macrófagos (Roop *et al.*, 2004; Billard *et al.*, 2005). La consecución de un nicho replicativo en los macrófagos, principales células hospedadoras de este patógeno, le va a proporcionar a este microorganismo una protección frente al complemento y a anticuerpos durante su diseminación por el hospedador, y la capacidad para mantenerse durante largos periodos de tiempo en el organismo afectado, con la consiguiente cronificación de la infección. Esta habilidad que presentan las estirpes de *Brucella* en fase lisa implica un proceso complejo, en el cual, este patógeno interfiere con

las funciones propias de la célula hospedadora, llegando incluso a controlar su propio tráfico intracelular. Así, cuando una especie lisa de *Brucella* es fagocitada por el macrófago, sigue una ruta endocítica en la cual evita degradaciones hidrolíticas por fusión con los lisosomas, favoreciendo en los estadios tempranos de la infección, su supervivencia intracelular (Pizarro-Cerdá *et al.*, 1998b; Comerci *et al.*, 2001; Celli, 2006). Se ha demostrado que esta ruta intracelular que permite la supervivencia de *Brucella* spp. dentro del macrófago está relacionada con una puerta de entrada a las células fagocíticas modulada por microdominios lipídicos denominados "lípidos rafts" (Kim *et al.*, 2002; Naroeni and Porte, 2002; Watarai *et al.*, 2002a; Watarai *et al.*, 2002b). Éstos son zonas o balsas de la membrana del macrófago enriquecidas en moléculas de colesterol, glicoesfingolípidos (como el gangliósido GM₁) y proteínas glicosilfosfatidilinositol de anclaje a la membrana (proteína GPI) (Shin and Abraham, 2001a; Shin and Abraham, 2001b; Pike 2003). Parece ser que la presencia de estos "lípidos rafts" en la membrana de las vacuolas intracelulares que transportan intracelularmente a *Brucella* spp., está involucrada en la restricción de las fusiones con los lisosomas y en la obtención de un nicho replicativo (Naroeni *et al.*, 2001; Porte *et al.*, 2003; Celli and Gorvel, 2004). También se ha observado que la internalización del género *Brucella* por esta vía es dependiente de procesos de polimerización de F-actina (Kusumawati *et al.*, 2000) y de actividad quinasa proporcionada por las enzimas fosfatidilinositol 3 quinasas (PI3Ks) de Clase I localizadas cerca de la membrana plasmática de la célula hospedadora (Pei *et al.*, 2008a; Qin *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2009).

Una vez que la bacteria es internalizada en el macrófago, ésta se localiza en compartimentos membranosos denominados BCV ("*Brucella*-containing vacuole"). Éstos sufren interacciones con endosomas tempranos de la ruta endocítica, adquiriendo en su membrana los marcadores Rab5 y EEA-1 (Pizarro-Cerdá *et al.*, 1998a; Chaves-Olarte *et al.*, 2002; Celli *et al.*, 2003) (Figura 3). A continuación, hasta 12 horas post-infección (p.i.), las BCVs interactúan con endosomas tardíos y lisosomas, acumulando en su membrana la glicoproteína LAMP-1 y otros marcadores como Rab7 y RILP, y produciéndose además su acidificación (Pizarro-Cerdá *et al.*, 1998a; Arenas *et al.*, 2000; Celli *et al.*, 2003; Starr *et al.*, 2008) (Figura 3). Varios han sido los genes relacionados en la protección de *Brucella* spp. frente a esta disminución de pH del ambiente que la rodea. Algunos de éstos son *hdeA* (Valderas *et al.*, 2005), *asp24* (Lin and Ficht, 1995; Kahl-McDonagh and Ficht, 2006; Kahl-McDonagh *et al.*, 2006), *cydB* (Endley *et al.*, 2001) o *hfq* (Robertson and Roop, 1999), aunque el mecanismo de actuación de sus productos todavía se desconoce. Parece ser además que en esta resistencia que muestra *Brucella* spp. no interviene la enzima ureasa, la cual sí que protege a la bacteria frente a los pH ácidos que se encuentra durante su paso por el tracto gastrointestinal cuando es ingerida oralmente (Bandara *et al.*, 2007; Sangari *et al.*, 2007; Paixão *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que el acontecimiento de todas estas interacciones con la consiguiente acidificación de la vacuola, es imprescindible para que pueda producirse posteriormente una correcta maduración de las BCVs (Porte *et al.*, 1999; Starr *et al.*, 2008). Esta fase de maduración se caracteriza por una pérdida progresiva de LAMP-1 de la membrana de la vacuola, la cual probablemente se inicia cuando las BCVs interceptan la ruta secretora de la célula mediante interacción con dominios especializados del retículo endoplasmático denominados "sitios de salida" o ERES ("endoplasmic reticulum exit sites") (Celli *et al.*, 2003; Celli *et al.*, 2005). Esta fusión con el retículo endoplasmático conduce a la generación de un orgánulo que posee unas condiciones permisivas para la replicación de *Brucella*, llamado fagosoma replicativo o BCV replicativa (Pizarro-Cerdá *et al.*, 1998a; Celli *et al.*, 2003). Se ha observado que esta fusión, dependiente de la actividad de una pequeña GTPasa (Sar1) y del complejo COPII (Aridor *et al.*, 2001; Celli *et al.*, 2005), hace que las vacuolas adquieran en su membrana marcadores propios del retículo endoplasmático como calnexina, calreticulina, sec61 β o PDI (Celli, 2006) (Figura 3). En este punto de la ruta, se cree que la supervivencia de la bacteria se ve favorecida al generarse más fagosomas replicativos mediante la fisión de una BCV en dos vacuolas hijas mediada por un aporte membranosos por parte del retículo endoplasmático (Celli, 2006).

Aparte del beneficio obvio que obtiene *Brucella* spp. mediante esta alteración de la ruta endocítica intracelular minimizando la fusión de la vacuola que la transporta con lisosomas, se ha observado que las interacciones que realizan las BCVs con el retículo endoplasmático proporcionan una fuente de hierro a la bacteria, la cual proviene de la degradación de los grupos hemo realizada en los macrófagos. De esta forma, a pesar de estar sometida a un fuerte grado de estrés nutricional durante su tránsito intracelular, *Brucella* spp. suple sus necesidades en cuanto a este micronutriente, el cual es esencial para que pueda llevar a cabo su replicación dentro del macrófago (Roop *et al.*, 2009).

Por otro lado, se ha demostrado que en condiciones opsonizantes, las especies lisas de *Brucella* penetran al macrófago principalmente a través del empleo de los receptores Fc (Coppolino *et al.*, 2001; Naroeni and Porte, 2002; Porte *et al.*, 2003). Adicionalmente, mediante experimentos realizados en monocitos humanos, se ha observado que bajo estas condiciones, las BCVs que transportan a una estirpe lisa virulenta de *Brucella* (*B. abortus* 2308), también sufren asociaciones con endosomas tardíos y lisosomas y llegan incluso a acidificarse, pero no son capaces de interactuar con el retículo endoplasmático (Bellaire *et al.*, 2005). En ellas, *B. abortus* 2308 todavía es capaz de sobrevivir e incluso, de replicarse coincidiendo con una subida de pH, lo que ayuda a explicar la habilidad que posee esta especie para persistir por largos periodos de tiempo en el organismo hospedador (Bellaire *et al.*, 2005).

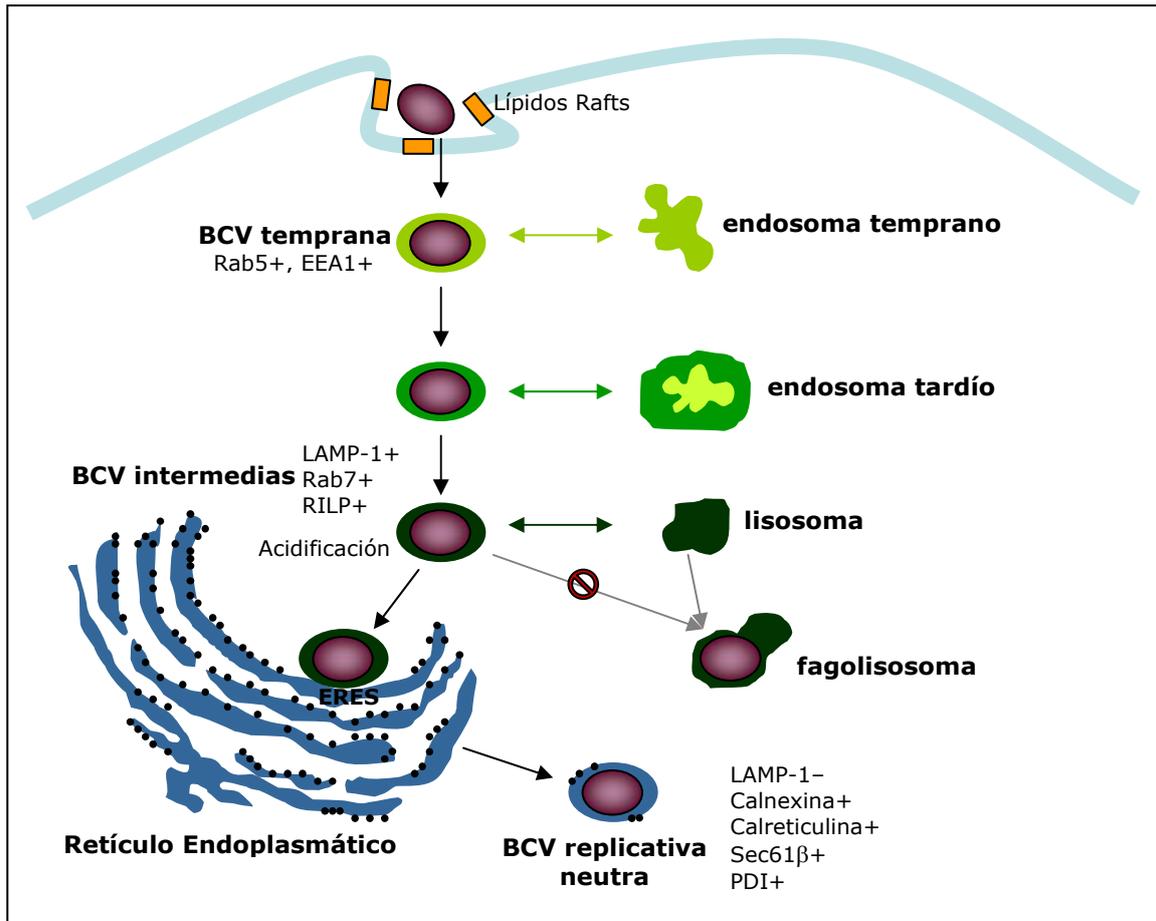


Figura 3. Ruta endocítica intracelular seguida por especies lisas de *Brucella* en el macrófago. Una vez que la bacteria penetra en la célula fagocítica mediante una vía de entrada mediada por los "lípidos rafts", ésta se localiza en compartimentos membranosos denominados BCVs ("Brucella-containing vacuoles"). Durante su tránsito intracelular, estas vacuolas sufren interacciones con diferentes componentes líticos, acidificándose y adquiriendo en sus membranas diversos marcadores. Dichas asociaciones y la bajada de pH son imprescindibles para que las BCVs no se fusionen con los lisosomas y consigan interceptar la ruta secretoria de la célula a través de los dominios ERES ("endoplasmic reticulum exit sites") del retículo endoplasmático. Esta fusión conduce finalmente a la generación de la denominada BCV replicativa que posee unas condiciones óptimas para la supervivencia y multiplicación intracelular de la bacteria. Esquema tomado y modificado de Starr *et al.*, 2008.

- Papel del S-LPS en la entrada de *Brucella* spp. en macrófagos.

En la actualidad se han propuesto dos posibles receptores ligados a los "lípidos rafts" que estarían implicados en la penetración de estirpes lisas de *Brucella* por esta ruta al macrófago. Uno de ellos es el receptor "Scavenger" de Clase A (SR-A), el cual establece uniones con las moléculas de LPS del patógeno (Kim *et al.*, 2004). Más recientemente, se ha señalado un nuevo modelo de entrada a través de interacciones entre la proteína priónica celular PrPc del macrófago y la chaperona Hsp60 expuesta en la superficie bacteriana (Watarai *et al.*, 2003). Sin embargo, todavía existen controversias científicas sobre el papel que pueda ejercer la proteína PrPc en la infección por *Brucella* (Celli and Gorvel, 2004; Fontes *et al.*, 2005).

Recientemente se ha sugerido que el núcleo oligosacarídico de las moléculas de LPS de especies lisas de *Brucella* podrían ejercer un papel relevante en la ruta de entrada en el macrófago mediada por los dominios lipídicos (Monreal *et al.*, 2003; González *et al.*, 2008). Sin embargo, como un factor mucho más importante en esta entrada, se ha señalado la presencia de las cadenas polisacarídicas *O* en el LPS, ya que al parecer, éstas podrían establecer interacciones con los "lípidos rafts" (Porte *et al.*, 2003). Esta hipótesis se basa en la grave atenuación en la virulencia mostrada por mutantes rugosos de cepas lisas de *Brucella*, portadores de alteraciones en genes implicados en la síntesis de cadenas *O*. Estos genes han sido identificados mediante caracterización genotípica y fenotípica, y codifican enzimas tales como una perosamina sintetasa (Godfroid *et al.*, 1998), una fosfoglucomutasa (Ugalde *et al.*, 2000), una glicosiltransferasa (McQuiston *et al.*, 1999), una fosfomanomutasa (Allen *et al.*, 1998) y una formiltransferasa (Lacerda *et al.*, 2010). A diferencia de las cepas parentales, todas estos mutantes rugosos son incapaces de sobrevivir en el modelo murino y presentan diferencias en cuanto a su comportamiento intracelular en cultivos celulares (Allen *et al.*, 1998; Godfroid *et al.*, 1998; McQuiston *et al.*, 1999; Foulongne *et al.*, 2000; Ugalde *et al.*, 2000; Porte *et al.*, 2003; Jiménez de Bagüés *et al.*, 2004; González *et al.*, 2008; Lacerda *et al.*, 2010). Además algunos de estos mutantes rugosos penetran en los macrófagos en una proporción mayor que la observada en las cepas lisas parentales correspondientes, sin requerir para ello, la vía de entrada mediada por los "lípidos rafts" ni la actividad de las enzimas PI3Ks de Clase I (Porte *et al.*, 2003; Rittig *et al.*, 2003; Pei and Ficht, 2004; Pei *et al.*, 2008a; Qin *et al.*, 2008). Esta distinta ruta de entrada en las células fagocíticas condiciona que las vacuolas que transportan a las cepas mutantes rugosas no eviten la fusión con los lisosomas de la célula hospedadora, siendo por tanto, destruida la bacteria (Porte *et al.*, 2003).

Por otra parte, se ha demostrado que la rápida eliminación de estos mutantes rugosos por parte del organismo, podría estar condicionada por la muerte celular de los macrófagos. A diferencia de lo observado en procesos infecciosos por especies lisas de *Brucella*, estas cepas mutantes rugosas causan muerte celular de las células fagocíticas por procesos de apoptosis, oncosis o necrosis, lo que conlleva que sean liberadas tempranamente al medio extracelular y destruidas por diferentes mecanismos bactericidas (Gross *et al.*, 2000; Fernández-Prada *et al.*, 2003; Pei and Ficht, 2004; Pei *et al.*, 2006; Pei *et al.*, 2008b; Chen and He, 2009). Los mecanismos y genes responsables de esta citotoxicidad todavía no han sido identificados, aunque se han encontrado evidencias que indican que es dependiente del Sistema de Secreción de Tipo IV (T4SS) y que requiere la existencia de una síntesis proteica activa por parte de la bacteria (Pei *et al.*, 2006; Pei *et al.*, 2008b).

Por último, otra característica diferencial que se ha observado que presentan estas cepas mutantes rugosas y que afecta negativamente a su supervivencia

intracelular, es la capacidad que poseen para inducir una fuerte activación de los macrófagos, puesta en evidencia por la producción de distintas citoquinas inflamatorias y de óxido nítrico que incrementan su actividad bactericida (Rittig *et al.*, 2003; Pei *et al.*, 2008a; Lacerda *et al.*, 2010; Surendran *et al.*, 2010).

2.2 Proteínas de la membrana externa mayoritarias del género *Brucella*.

2.2.1 Una introducción general.

Las proteínas de membrana externa (PMEs) del género *Brucella* fueron inicialmente estudiadas debido al fuerte potencial que presentaban como antígenos inmunogénicos y protectores. Así, a primeros de los años 80, se identificaron las primeras PMEs a partir de fracciones insolubles de dodecil sulfato de sodio (SDS-I) de la pared celular de *B. abortus* 99 (Dubray and Bézard, 1980; Dubray and Charriaut, 1983). En ellas se observó la presencia de dos PMEs mayoritarias, las cuales se encontraban estrechamente asociadas al péptidoglucano, siendo necesaria una digestión con lisozima para separarlas de él (Dubray and Bézard, 1980). Estas dos proteínas, con una masa molecular aparente de 25 - 27 y 36 - 38 kDa, fueron posteriormente de nuevo identificadas por Verstreate *et al.* en 1982 mediante extracciones con otros detergentes. Se designaron entonces dos grupos de proteínas mayoritarias: el grupo 2 constituido por las proteínas de 36 - 38 kDa y el grupo 3, constituido por las de 25 - 27 kDa. Adicionalmente, se creó también el grupo 1, en el cual se incluyeron proteínas que presentaban una abundancia minoritaria en la composición de la membrana externa, con una masa molecular aparente de 89 - 94 kDa (Verstreate *et al.*, 1982).

Los genes *omp2a* y *omp2b*, que codifican las PMEs del grupo 2, fueron los primeros en ser clonados y secuenciados (Ficht *et al.*, 1988; Ficht *et al.*, 1989). Se ha visto que estos dos genes, orientados en direcciones opuestas, se encuentran ubicados muy cercanos en el genoma de *Brucella* (separados únicamente por 900 pb), presentando además un alto grado de identidad entre ellos (>85 %) (Ficht *et al.*, 1989). Ambos genes han sido muy útiles en la tipificación molecular por PCR-RFLP (reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción) de diferentes especies y biovariedades de *Brucella*, ya que poseen un cierto grado de polimorfismo debido, al menos en parte, a un fenómeno de conversión génica entre los dos genes homólogos (Ficht *et al.*, 1996; Ficht *et al.*, 1990; Cloeckart *et al.*, 1995a; Cloeckart *et al.*, 1996a; Vizcaíno *et al.*, 2000; Paquet *et al.*, 2001; Cloeckart *et al.*, 2001; Cloeckart *et al.*, 2002). Hasta el momento, y a pesar de que se ha conseguido la expresión de los dos genes en *E. coli*, en *Brucella* spp. solamente se ha podido detectar el producto de *omp2b*: una proteína con actividad porina de 36 kDa, siendo la única constituyente del grupo 2 de las PMEs (Douglas *et al.*, 1984; Ficht *et al.*, 1989; Marquis y

Ficht, 1993; Cloeckaert *et al.*, 1995b).

En lo que se refiere al grupo 3 de PMEs, aparte de la inicialmente descubierta en *B. abortus* (Dubray and Bézard, 1980) y hoy conocida como Omp25 (de Wergifosse *et al.*, 1995), se incluyó en él, otro miembro identificado a partir de fracciones SDS-I de *B. melitensis* B115. Esta PME, mayoritaria y con una masa molecular aparente de 31 – 34 kDa, se encuentra también fuertemente asociada al péptidoglucano (Cloeckaert *et al.*, 1992b; Cloeckaert *et al.*, 1995b; Vizcaíno *et al.*, 1996; Cloeckaert *et al.*, 2002). Además se ha observado que posee la capacidad de formar oligómeros resistentes a la desnaturalización por dodecil sulfato de sodio (SDS) a bajas temperaturas, por lo que se ha sugerido que podía tratarse de una porina, ya que esta característica se ha descrito en varias proteínas bacterianas de este tipo (Vizcaíno *et al.*, 1996). Actualmente, esta PME se conoce como Omp31 (Vizcaíno *et al.*, 1996).

Se ha observado que estas proteínas mayoritarias, cuando son sometidas a electroforesis en geles de acrilamida y Western Blot, presentan una variación en la masa molecular aparente y muestran un perfil de bandas múltiples. La causa de este fenómeno todavía no ha podido ser clarificada, aunque se ha relacionado con la unión de las proteínas a subunidades de péptidoglucano de diferentes tamaños (Sowa *et al.*, 1991; Cloeckaert *et al.*, 1992b), con la formación de oligómeros (Vizcaíno *et al.*, 1996) que puedan modificar su punto isoeléctrico (Connolly *et al.*, 2006) y con la fase de crecimiento en la que se encuentre la bacteria (Gallot-Lavallée *et al.*, 1995). En el caso de la proteína Omp25, se han encontrado indicios de que podría tratarse de una glicoproteína, por lo que el perfil múltiple de bandas podría deberse a una heterogeneidad en la parte oligosacárida.

Por otra parte, tanto Omp25 como Omp31, poseen un cierto grado de homología con otras proteínas de microorganismos incluidos también en las α -proteobacterias. Así, Omp25 y Omp31 presentan un porcentaje de identidad cercano al 40 % con la proteína RopB (Roest *et al.*, 1995a; Roest *et al.*, 1995b; Vizcaíno *et al.*, 1996), un miembro de la familia de PMEs RopB, recientemente caracterizada en *Rhizobium leguminosarum* (Foreman *et al.*, 2010). Además, también se ha observado que la proteína Omp31 muestra alrededor de un 32 % de identidad con HbpA, la cual pertenece a la familia de proteína fijadoras de hemina Hbp de *Bartonella quintana* (Carroll *et al.*, 2000; Minnick *et al.*, 2003). Debido a esto, se han realizado diversos estudios en los cuales se ha comprobado que la proteína Omp31 de *B. suis* posee una cierta capacidad para unir hemina, y que la expresión del gen que la codifica, se induce cuando la bacteria se cultiva en condiciones con limitación de hierro (Delpino *et al.*, 2006).

En la última década, tras la publicación de la secuenciación de los genomas de varias cepas de *Brucella*, tales como *B. melitensis* 16M (DeVecchio *et al.*, 2002), *B. suis* 1330 (Paulsen *et al.*, 2002) o *B. abortus* 9-941 (Chain *et al.*, 2005), se descubrió la existencia de cinco genes que codificaban proteínas homólogas a las dos PMEs del grupo

3 previamente mencionadas (Salhi *et al.*, 2003; Vizcaíno *et al.*, 2004). En la actualidad, estas cinco proteínas denominadas Omp31b, Omp25b, Omp25c, Omp25d y Omp22, junto con Omp25 y Omp31, constituyen la familia de PMEs Omp25/Omp31 (Salhi *et al.*, 2003; Vizcaíno *et al.*, 2004). Tanto las proteínas que componen dicha familia, como los genes que las codifican, han sido objeto de numerosos estudios que, como se expone en el siguiente apartado, han demostrado su relevancia en distintos aspectos.

2.2.2 Características de las proteínas de membrana externa que componen la familia Omp25/Omp31.

El análisis de la secuencia de aminoácidos que poseía cada componente, reveló el porcentaje de identidad existente entre las siete proteínas que conforman esta familia. Así, Omp25 y Omp31 presentan un 34 %; Omp25b, Omp25c y Omp25d, un 56 - 58 % entre ellas y aproximadamente un 40 % con Omp25; Omp31 y Omp31b, un 67 % entre sí y un 30 % respecto a Omp25 y finalmente, Omp22 (también conocida como Omp3b) muestra alrededor de un 25 % de identidad con las proteínas Omp25 y Omp31, siendo la menos relacionada con los otros miembros (Salhi *et al.*, 2003; Vizcaíno *et al.*, 2004). Se ha comprobado además que todas ellas presentan características típicas de proteínas que son transportadas hasta la membrana externa de bacterias Gram negativas, como un residuo fenilalanina en su extremo C-terminal y un motivo común en el extremo N-terminal (AXAAD), correspondiente al punto de corte del péptido señal (Struyvé *et al.*, 1991; Pugsley, 1993; Salhi *et al.*, 2003; Vizcaíno *et al.*, 2004).

- Utilidad como antígenos de diagnóstico y vacunas subcelulares.

Como ya se ha indicado previamente, uno de los principales inconvenientes que presentan las cepas lisas vacunales atenuadas de *Brucella* que se emplean actualmente para la profilaxis de la enfermedad, es que inducen la producción de anticuerpos frente al S-LPS en el animal vacunado. Este hecho imposibilita la diferenciación entre los animales vacunados y los infectados por cepas lisas de *Brucella* mediante el diagnóstico serológico tradicional, ya que éste se basa en la detección de anticuerpos anti-LPS generados durante el proceso de infección. Por ello, una posible alternativa para evitar dicho problema, sería el desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico que se fundamenten en antígenos que no desencadenen una respuesta inmune en el animal vacunado. Por la localización que presentan, las PMEs mayoritarias de *Brucella* spp. son unas buenas candidatas para suplir este papel, y para además, constituir posibles antígenos protectores que permitan la obtención de nuevas vacunas subcelulares recombinantes más específicas y sin los inconvenientes que presentan las vacunas actuales.

En las últimas décadas, se han realizados diversos estudios que han puesto de manifiesto la escasa relevancia que presentan las PMEs como antígenos protectores y de diagnóstico frente a infecciones producidas por cepas lisas de *Brucella*. Se ha sugerido que probablemente, esto se deba a que las cadenas polisacáridicas *O* del S-LPS enmascaran las PMEs, dificultando tanto la generación de una respuesta inmune específica frente a ellas como su accesibilidad a los anticuerpos (Cloeckaert *et al.*, 1990; Cloeckaert *et al.*, 1991; Jacques *et al.*, 1992; Bowden *et al.*, 1995a; Bowden *et al.*, 1998; Guilloteau *et al.*, 1999; Vizcaíno *et al.*, 2001b). Por el contrario, en las cepas rugosas de *Brucella*, tales como *B. ovis* y *B. canis*, este problema no se presenta ya que su LPS carece de cadenas *O*, por lo que las PMEs, al estar expuestas en la superficie bacteriana, pueden tener un papel más importante como antígenos para el diagnóstico serológico y desarrollo de vacunas más específicas.

Dentro de las proteínas mayoritarias del género *Brucella*, la más estudiada en este campo ha sido la proteína Omp31, perteneciente a la familia de PMEs Omp25/Omp31. Así, investigaciones realizadas mediante el empleo de la técnica de Western Blot y proteínas recombinantes, han revelado que la proteína Omp31 de *B. ovis* podría constituir un buen antígeno de diagnóstico frente a las infecciones causadas por esta especie rugosa en carneros (Kittelberger *et al.*, 1998; Vizcaíno *et al.*, 2001b). En contraste, la proteína Omp31 recombinante de *B. melitensis* no ofreció tan buenos resultados, probablemente debido a las diferencias antigénicas que existen entre ambas proteínas, puestas de manifiesto mediante reactividad con anticuerpos (Vizcaíno *et al.*, 2001b). Por otra parte, el interés que ofrecía la proteína Omp31 como un antígeno protector frente a *B. ovis*, fue inicialmente estudiado mediante inmunización pasiva de ratones con un AcM frente a esta proteína (Bowden *et al.*, 1995b; Bowden *et al.*, 2000). Posteriormente, se demostró que la proteína recombinante Omp31 de *B. melitensis*, sola o asociada con R-LPS, inducía protección frente a la infección causada por *B. ovis* en ratón (Estein *et al.*, 2003). Además se ha observado que dicha proteína genera una respuesta inmune específica humoral y celular en carneros, aunque todavía no se ha demostrado que sea capaz de proteger frente a la infección por *B. ovis*, tal y como sucede en ratón (Estein *et al.*, 2004). También se ha probado una vacuna de ADN basada en el gen *omp31* en ratón, y se ha observado que a pesar de que induce una respuesta inmune humoral baja, genera una importante respuesta T-citotóxica específica que protege frente a la infección por *B. ovis* e incluso, por la cepa lisa *B. melitensis* H38S (Cassataro *et al.*, 2005a; Gupta *et al.*, 2007). En los últimos años, se han llevado a cabo diversas investigaciones enfocadas a mejorar la capacidad protectora de dicha vacuna de ADN. Así, se ha comprobado que la utilización como vacuna de una quimera compuesta por la enzima lumazina sintasa de *Brucella* (una proteína altamente inmunogénica) y por el epítipo de reconocimiento de 36 aminoácidos presente en la parte más hidrofílica de la proteína Omp31 (Vizcaíno *et al.*, 1996; Vizcaíno *et al.*, 2001b), es más eficaz frente a la

infección por *B. melitensis* y *B. ovis* en ratón, e incluso, por ésta última en carneros (Cassataro *et al.*, 2005b; Cassataro *et al.*, 2007a; Cassataro *et al.*, 2007b; Estein *et al.*, 2009). También mediante el empleo de una vacuna de ADN, se han obtenido datos que señalan una posible actividad protectora de la proteína Omp25 frente a la infección por *B. melitensis* 16M en ratón (Commander *et al.*, 2007).

- Polimorfismo de ADN.

Tras la descripción del género *Brucella* como monoespecífico mediante los análisis de hibridación ADN –ADN llevados a cabo (Verger *et al.*, 1985; Verger *et al.*, 1987), se han realizado numerosos estudios encaminados a encontrar marcadores moleculares estables capaces de diferenciar las seis especies clásicas del género y sus biovariedades. Esta diferenciación molecular resulta muy importante para la caracterización de aislados de *Brucella* y descripción de nuevas especies ya que es más sensible, reproducible, rápida y específica que las pruebas fenotípicas realizadas tradicionalmente. En este aspecto, los genes de la familia *omp25/omp31*, al igual que los genes *omp2a* y *omp2b*, han sido de gran utilidad debido al polimorfismo que presentan (Cloeckert *et al.*, 1995a; Vizcaíno *et al.*, 1997; Vizcaíno *et al.*, 1999; Cloeckert *et al.*, 2001; Vizcaíno *et al.*, 2004).

Diversos estudios de polimorfismo de ADN han demostrado que, a pesar de que los genes de la familia *omp25/omp31* se encuentran bastante conservados dentro del género *Brucella*, existen pequeñas variaciones entre las especies que repercuten de manera importante en las proteínas que codifican (Vizcaíno *et al.*, 2000; Vizcaíno *et al.*, 2004). Así, se ha descubierto que la proteína Omp31 no se sintetiza en ninguna de las cepas de referencia de las distintas biovariedades de *B. abortus* debido a una delección en su ADN de 25 kb (Vizcaíno *et al.*, 1997; Vizcaíno *et al.*, 1999; Vizcaíno *et al.*, 2001a) que involucra al gen *omp31* y también, a otros 22 genes hipotéticos, homólogos a genes implicados en la síntesis de un polisacárido en otras bacterias (Vizcaíno *et al.*, 1999; Vizcaíno *et al.*, 2001a). Además se ha comprobado que *B. ovis* posee 9 sustituciones nucleotídicas con respecto al gen *omp31* de *B. melitensis*, que hacen que la proteína que codifica se diferencie en 7 aminoácidos de la Omp31 de *B. melitensis* (Vizcaíno *et al.*, 2001b). Este hecho conduce a la existencia de diferencias antigénicas entre las dos proteínas, las cuales podrían implicar también, una distinta inmunogenicidad de ambas en el transcurso de la infección. Algo similar se ha descrito para la proteína Omp25; se ha demostrado que el gen *omp25* de *B. ovis* porta una delección de 36 pb en la región terminal 3', la cual, también modifica las propiedades antigénicas que presenta la proteína Omp25 con respecto a la perteneciente a *B. melitensis* (Cloeckert *et al.*, 1996b). Además, se ha observado mediante Western Blot, que dicha delección causa una disminución de cerca de 1 kDa en la masa aparente de la proteína Omp25 de *B. ovis*,

reflejada en la aparición de una banda de 24 kDa en lugar de la de 25 kDa correspondiente a la misma proteína de *B. melitensis* (Cloeckert *et al.*, 1996b).

En cuanto al resto de los componentes de la familia de proteínas de membrana externa Omp25/Omp31, poco es lo que se conoce de ellas, aunque las cinco PMEs han sido detectadas experimentalmente en al menos, una especie de *Brucella*. Así, Omp31b ha sido identificada en *B. abortus* y en *B. suis* (Salhi *et al.*, 2003; Connolly *et al.*, 2006); Omp25b en *B. melitensis* y *B. suis* (Wagner *et al.*, 2002; Salhi *et al.*, 2003; Eschenbrenner *et al.*, 2006), Omp25c en *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* (Wagner *et al.*, 2002; Salhi *et al.*, 2003; Connolly *et al.*, 2006) y Omp22 en *B. abortus* (Guzmán-Verri *et al.*, 2002; Connolly *et al.*, 2006). En el caso de la proteína Omp25d, su detección ha resultado ser más complicada, teniéndose solamente indicios de su producción en *B. suis* (Salhi *et al.*, 2003). Sin embargo, hasta el momento, todavía no existe ningún trabajo enfocado específicamente al análisis de la presencia de cada una de las PMEs que componen esta familia en las diferentes especies de *Brucella*.

La realización de un trabajo por parte de nuestro grupo dirigido a estudiar el polimorfismo de ADN de la familia de genes *omp25/omp31*, ha conseguido ofrecer una información adicional sobre la distribución de estas otras cinco PMEs en el género *Brucella*. Este estudio reveló que los genes que las codifican se encuentran bastante conservados en este género, aunque presentan algunas diferencias importantes entre especies con implicaciones en la proteína codificada (Vizcaíno *et al.*, 2004). Entre éstas, destacan:

- La existencia de una delección de 232 pb en el extremo 5' terminal del gen *omp31b* de *B. melitensis*, que elimina tanto el sitio de unión al ribosoma como el codón de inicio de la traducción de la proteína, impidiendo probablemente que se sintetice la proteína Omp31b en esta especie. Además, tanto en *B. ovis* como en *B. canis*, debido a una sustitución nucleotídica, el gen *omp31b* presenta un codón prematuro de parada de la traducción que acorta la proteína y que hace que, probablemente, la proteína Omp31b no se localice en la membrana externa de estas dos especies al perderse el residuo fenilalanina terminal presente en las PMEs y que es esencial para una correcta translocación de la proteína (Struyvé *et al.*, 1991).

- El hallazgo de una delección de 15 kb en *B. ovis* que incluye a *omp25b*, por lo que esta proteína no se hallaría presente en la membrana externa de esta especie rugosa (Vizcaíno *et al.*, 2004). Además, en este estudio se pudo observar que esta delección afectaba también a otra serie de genes, entre los que se encontraban *wboA* y *wboB*, implicados en la síntesis de las cadenas polisacáridas O del lipopolisacárido (McQuiston *et al.*, 1999; Vemulapalli *et al.*, 2000; González *et al.*, 2008). Esto explicaría el fenotipo rugoso que presenta *B. ovis*, sin embargo, la presencia de estos dos genes en la bacteria mediante complementación, no confirió el fenotipo liso a esta especie (Vizcaíno *et al.*, 2004). Por tanto, otros genes involucrados en la síntesis del lipopolisacárido en fase lisa

se hallan defectuosos o ausentes en *B. ovis*, tal y como se ha demostrado recientemente (Zygmunt *et al.*, 2009). Adicionalmente, se ha señalado que este fragmento de ADN que se encuentra deletado en *B. ovis*, podría tratarse de una isla genómica, ya que cumple las características descritas para las mismas (Hentschel and Hacker, 2001; Rajashekara *et al.*, 2004; Vizcaíno *et al.*, 2004; Rajashekara *et al.*, 2008). Así, se ha sugerido que esta isla genómica podría haber sido adquirida por el ancestro común de *Brucella* mediante transferencia horizontal, y posteriormente, haberse deletado en *B. ovis* (Vizcaíno *et al.*, 2004).

- Por otro lado, en *B. abortus*, *B. canis* y en algunas cepas aisladas de mamíferos marinos, se detectó la presencia de una inserción o una delección de un nucleótido en el gen *omp25b*, que hace que la proteína sintetizada sea significativamente más corta y que además, pierda el residuo fenilalanina C- terminal necesario para ser exportada a la membrana externa (Struyvé *et al.*, 1991). Por ello, no se espera la presencia de la proteína Omp25b en la membrana de dichas cepas. En algunas cepas aisladas de cetáceos, se observó incluso, una inversión de un fragmento de ADN de 1747 pb en la zona donde se ubica el gen *omp25b* y que también provocaría en estas cepas, la síntesis de una Omp25b truncada y posiblemente no funcional.

- En cuanto a los genes *omp25c*, *omp25d* y *omp22*, se vio que estaban bastante conservados en este género, por lo que se espera que las PMEs que codifican se encuentren formando parte de la membrana externa de las seis especies clásicas de *Brucella* y de cepas procedentes de mamíferos marinos, con la excepción quizás, de la ausencia de Omp22 en algunas cepas aisladas de cetáceos (Vizcaíno *et al.*, 2004).

Por último, cabe señalar que, en los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios de polimorfismo que incluyen los genes que componen la familia *omp25/omp31*, y que han permitido el hallazgo de marcadores específicos que permiten identificar mediante PCR múltiple, las seis especies clásicas del género *Brucella*, e incluso también, las nuevas especies descritas recientemente (García-Yoldi *et al.*, 2005; García-Yoldi *et al.*, 2006; Dawson *et al.*, 2008; López-Goñi *et al.*, 2008; Mayer-Scholl *et al.*, 2010).

- Implicación en la virulencia.

Como ya se ha mencionado anteriormente, las PMEs se encuentran expuestas en la superficie de la bacteriana y entran en contacto directo con las células y los efectores de la respuesta inmune del organismo hospedador, por lo que también son unas buenas candidatas a ser importantes factores de virulencia de las especies de *Brucella*. Por tanto, su estudio dentro de este campo es de gran interés, ya que puede proporcionar un conocimiento más amplio sobre los mecanismos de virulencia empleados por este género, que podría además, permitir el desarrollo de nuevas vacunas atenuadas mejores a las existentes actualmente.

En los últimos años se han llevado a cabo varias investigaciones con el objeto de determinar la influencia que ejercen las PMEs de la familia Omp25/Omp31 en la virulencia del género *Brucella*. Así, por ejemplo, se ha observado que cepas mutantes de *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. ovis* que no sintetizan la proteína Omp25, se encuentran atenuadas en ovejas (*B. melitensis*), en cabras (*B. abortus*) y en ratón (todas ellas) (Edmonds *et al.*, 2001; Edmonds *et al.*, 2002a; Edmonds *et al.*, 2002b). Hasta el momento no se conoce con exactitud la razón de esta atenuación, pero podría estar relacionada con el hecho de que se ha demostrado que la proteína Omp25 de *B. suis* se encuentra involucrada en la inhibición de la producción de TNF α por parte de macrófagos humanos (Jubier-Maurin *et al.*, 2001). De acuerdo con esto, en infecciones causadas por cepas mutantes $\Delta omp25$, las células inmunes llevarían a cabo una completa síntesis de esta citoquina proinflamatoria y se activarían correctamente los mecanismos antibacterianos de defensa del organismo hospedador, los cuales podrían ser responsables de la atenuación mostrada por estos mutantes de *Brucella*. Asimismo, también se ha comprobado que la proteína Omp25 está implicada en la permeabilidad de *B. suis* en medio ácido, el cual, es necesario para que esta bacteria inicie con éxito el parasitismo intracelular (Boigegrain *et al.*, 2004). Por otra parte, se ha observado que en cepas mutantes de *B. abortus* 2308 en el sistema regulador de dos componentes *bvrB/bvrS* que se hallan atenuadas (Sola-Landa *et al.*, 1998), se expresa menos el gen *omp25* y la proteína Omp25 prácticamente no se sintetiza (Guzmám-Verri *et al.*, 2002; Viadas *et al.*, 2010). Por ello, se ha sugerido que la reducción de la virulencia de estos mutantes podría ser debida, al menos en parte, a la ausencia de esta proteína en la bacteria. Sin embargo, resultados obtenidos en otros estudios han demostrado que cepas de *B. abortus* 2308 y *B. ovis* PA que portan el gen *omp25* inactivado, no se encuentran atenuadas en ratón (Caro-Hernández *et al.*, 2007; Manterola *et al.*, 2007), lo que descarta la implicación de la proteína Omp25 en la virulencia de estas cepas.

En cuanto a la otra proteína mayoritaria que compone esta familia de PMEs, Omp31, se sabe que no es necesaria para la virulencia de *B. abortus*, ya que en esta especie no está presente el gen que la codifica debido a una delección en su genoma. Vizcaíno *et al.*, 1997; Vizcaíno *et al.*, 1999; Vizcaíno *et al.*, 2001a). Asimismo, se ha demostrado que tampoco afecta a la virulencia de la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 en ratón (Cloeckart *et al.*, 2004), aunque cabe destacar que dicha cepa presenta niveles de la proteína Omp31 inferiores a los observados en la cepa parental de la que procede, por lo que no puede descartarse que este hecho esté relacionado con la atenuación de esta cepa (Eschenbrenner *et al.*, 2002). Por otro lado, también se ha comprobado en nuestro laboratorio, que la ausencia de esta proteína en la membrana externa de la cepa *B. ovis* PA, a pesar de que reduce en un logaritmo los niveles máximos de colonización esplénica de la bacteria en ratón, no disminuye su persistencia en bazo (Caro-Hernández *et al.*, 2007).

En contraste, se ha demostrado que la inactivación de los genes *omp25d* y *omp22* en *B. ovís* PA provoca una fuerte atenuación de la virulencia de esta cepa naturalmente rugosa en ratón (Caro-Hernández *et al.*, 2007). Así, la cepa mutante $\Delta omp22$ presentó unos niveles muy bajos de colonización esplénica en la primera semana post-infección (p.i.), siendo completamente eliminada del bazo en la segunda semana p.i., mientras que el mutante $\Delta omp25$ no se detectó a partir de la tercera semana p.i. (Caro-Hernández *et al.*, 2007). El hecho de que ambos mutantes mostraran defectos en su membrana externa menores o iguales a los observados en otras cepas mutantes en genes de la misma familia que no se estaban atenuadas (Caro-Hernández *et al.*, 2007) hace pensar que las proteínas Omp25d y Omp22 podrían estar directamente involucradas en la virulencia de *B. ovís* PA, pudiendo tener un papel importante en la penetración y/o en la multiplicación de este microorganismo en las células hospedadoras. Por el contrario, en el caso de los mutantes de *B. abortus* 2308 en el sistema regulador de dos componentes *bvrR/bvrS* (Sola-Landa *et al.*, 1998) mencionados anteriormente, a pesar de que se ha observado que tampoco sintetizan la proteína Omp22 (Guzmán-Verri *et al.*, 2002) y que se ha llegado a pensar que su ausencia podría estar relacionada con la atenuación que muestran dichas cepas en ratón, no se ha podido demostrar su implicación en la virulencia de esta cepa lisa (Manterola *et al.*, 2007).

2.3 Otros factores de virulencia de *Brucella* spp..

2.3.1 El Sistema de Secreción de Tipo IV.

El Sistema de Secreción de Tipo IV (T4SS) es un complejo multiproteico situado en la membrana de los microorganismos, cuya función principal es la de secretar macromoléculas al exterior. Se ha observado que este sistema se encuentra presente en patógenos Gram negativos, como *Agrobacterium tumefaciens*, *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pylori* o *Legionella pneumophila*, en los cuales interviene transfiriendo moléculas de ADN, toxinas o proteínas efectoras desde el patógeno bacteriano a las correspondientes células hospedadoras (Ward *et al.*, 1988; Weiss *et al.*, 1993; Berger and Christie, 1994; Andrews *et al.*, 1998; Segal *et al.*, 1998; Backert *et al.*, 2000; Odenbreit *et al.*, 2000; Schulein and Dehio, 2002). El T4SS mejor estudiado hasta el momento es el perteneciente a *A. tumefaciens*. Está formado por 11 proteínas que se disponen de la siguiente manera: VirB6-VirB10 forman un núcleo poroso en el espacio periplásmico que atraviesa las dos membranas de la envuelta celular (Christie *et al.*, 2005); por encima de él, mayoritariamente subunidades de VirB2 y VirB5, conforman una estructura en la superficie de la bacteria mediante la cual ésta se pone en contacto con la célula hospedadora (Christie *et al.*, 2005); las proteínas VirB4 y VirB11, junto con VirD4 localizada en el citoplasma, son las que proporcionan la energía suficiente al

sistema para que ejerza su función biológica, ya que son NTPasas (Watarai *et al.*, 2002c; Atmakuri *et al.*, 2004); Virb3 parece ser una proteína de membrana interna cuyo extremo C- terminal reside en el citoplasma y que participa en la unión de las subunidades VirB2 y VirB5 (Yuan *et al.*, 2005; Mossey *et al.*, 2010); y finalmente, VirB1 es una proteína que presenta actividad lítica transglicosilasa que probablemente sea utilizada para facilitar el ensamblaje de los componentes del sistema T4SS mediante degradación del péptidoglucano (Baron *et al.*, 1997; Chumakov y Kurbanova, 1998; Höppner *et al.*, 2004; Zahrl *et al.*, 2005) (Figura 4).

En el género *Brucella*, la presencia del T4SS se detectó inicialmente en *B. suis* al identificarse en un mutante atenuado de esta cepa, las secuencias cromosómicas que se habían visto interrumpidas por inserción de un transposón. Así, se vio que éstas contenían genes homólogos a *virB9* y *virB10* de *Agrobacterium tumefaciens* (O'Callaghan *et al.*, 1999). Actualmente se sabe que el T4SS de *Brucella* spp. se encuentra codificado por el operón *virB*, el cual está formado por 12 genes (*virB1* a *virB12*) que se transcriben a partir de un único promotor localizado delante de *virB1* (Boschiroli *et al.*, 2002). En el caso de *Brucella* spp., se ha observado que la NTPasa VirD4 no se encuentra formando parte de su T4SS. Sin embargo, a cambio de la pérdida de un homólogo de esta proteína, este género presenta un gen extra en el operón: *virB12*. Se ha observado que éste codifica una proteína que presenta un motivo consenso de lipoproteínas y la secuencia señal para ser exportada a la membrana externa del microorganismo (Boschiroli *et al.*, 2002).

Hasta el momento, existen evidencias genéticas y bioquímicas que indican que el T4SS del género *Brucella* realiza una función similar a la que lleva a cabo el de *Legionella pneumophila*; secretar proteínas efectoras a la célula hospedadora que alteran el tráfico intracelular de la bacteria (Shin and Roy, 2008). Recientemente se han identificado posibles proteínas efectoras secretadas por el T4SS de *B. abortus* 2308, como una chaperona (Dnak), una peptidil-prolil isomerasa (PPIasa), una coloil-glicina hidrolasa (CGH) y dos proteínas designadas como VceA y VceC (ésta última secretada también por *B. suis* 1330) (de Jong *et al.*, 2008; Delpino *et al.*, 2009). Aunque se desconoce la función biológica que poseen estas moléculas efectoras transportadas por esta maquinaria, se ha demostrado que la expresión del operón *virB* es necesaria para que se lleven a cabo las asociaciones entre las BCVs y el retículo endoplasmático, esenciales para el desarrollo del fagosoma replicativo (Comerci *et al.*, 2001; Delrue *et al.*, 2001; Celli *et al.*, 2003). Así, se ha comprobado que las vacuolas que transportan cepas mutantes en este operón de estirpes lisas de *Brucella* (*B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*) no interactúan con el retículo endoplasmático y se fusionan con los lisosomas, degradándose la bacteria en los fagolisosomas resultantes (Comerci *et al.*, 2001; Delrue *et al.*, 2001; Celli *et al.*, 2003; Starr *et al.*, 2008). De acuerdo con estos resultados, se ha observado una marcada atenuación de estas cepas mutantes en comparación con las

cepas parentales correspondientes, tanto en cultivos celulares de macrófagos (O'Callaghan *et al.*, 1999; Foulongne *et al.*, 2000; Watarai *et al.*, 2002a; Paschos *et al.*, 2006; Rajashekara *et al.*, 2006), de células Hela (O'Callaghan *et al.*, 1999; Foulongne *et al.*, 2000; Sieira *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003) y de células dendríticas (Billard *et al.*, 2005; Salcedo *et al.*, 2008), como en los modelos animales, ratón (Hong *et al.*, 2000; Sieira *et al.*, 2000; Kahl-McDonagh y Ficht, 2006; Rajashekara *et al.*, 2006) y cabra (Kahl-McDonagh *et al.*, 2006; Zygmunt *et al.*, 2006). Estos estudios parecen indicar además, que *virB1*, *virB7* y *virB12* son los genes menos esenciales para la virulencia del género *Brucella* (den Hartigh *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2005; den Hartigh *et al.*, 2008).

Por otra parte, se ha identificado en *B. suis* una proteína periplásmica denominada BvfA que aparte de ser necesaria para la virulencia de la bacteria (Lavigne *et al.*, 2005), se ha observado que el gen que la codifica muestra un patrón de regulación similar al de los genes *virB*, expresándose cuando se produce la acidificación dentro de la vacuola. Aunque se desconoce en la actualidad la función que lleva a cabo, este hecho hace pensar que se encuentra involucrada en el establecimiento del nicho de replicación intracelular de *Brucella* (Lavigne *et al.*, 2005).

Finalmente, algunos trabajos han señalado que el operón *virB* podría estar también involucrado en la entrada de las estirpes lisas de *Brucella* en los macrófagos a través de la vía mediada por los "lípidos rafts" (Kim *et al.*, 2002; Watarai *et al.*, 2002a; Watarai *et al.*, 2002b). Sin embargo, la obtención de otras evidencias experimentales contradictorias, ponen en duda la implicación del sistema T4SS en este proceso (Porte *et al.*, 2003; Celli y Gorvel, 2004). Por el contrario, sí está totalmente aceptado que este sistema desempeña un papel importante en la citotoxicidad que muestran mutantes rugosos derivados de especies lisas de *Brucella* en cultivos de macrófagos murinos (Pei *et al.*, 2008b).

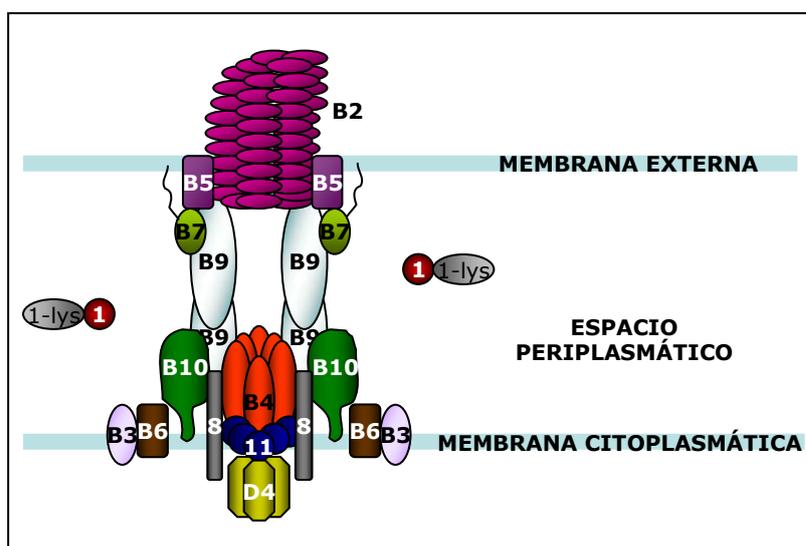


Figura 4. Modelo estructural hipotético del Sistema de Secreción de Tipo IV (T4SS) de *Agrobacterium tumefaciens*. Este sistema transportador se halla compuesto por 11 proteínas codificadas por el operón *virB* (VirB1-VirB11) y por la proteína VirD4 codificada por el operón *virD*. Esquema tomado y modificado de Christie, 2004.

2.3.2 Sistemas de regulación de la expresión génica en *Brucella* spp..

Diversos estudios han revelado la existencia de varios sistemas de regulación de la expresión génica de *Brucella* spp. implicados en la respuesta adaptativa de la bacteria a un ambiente intracelular. Entre éstos destacan: la respuesta frente a un estrés nutricional, el denominado proceso "quórum sensing" y los sistemas de regulación de dos componentes.

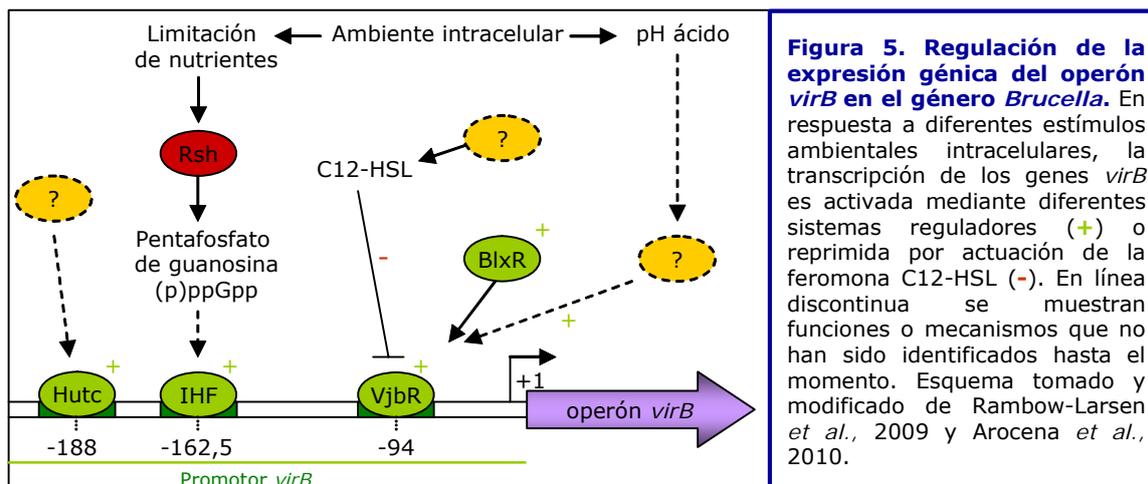
- Respuesta frente al estrés nutricional.

Durante el tránsito intracelular que realizan las estirpes lisas de *Brucella* desde que son fagocitadas hasta la BCV replicativa, el patógeno permanece en vacuolas caracterizadas por tener un pH ácido y una baja disponibilidad de nutrientes. Se ha demostrado que estas dos condiciones ambientales a las que se ve sometida la bacteria, constituyen dos importantes estímulos que inducen la expresión génica del operón *virB*. Hasta el momento, todavía no ha sido elucidado el mecanismo por el cual se produce la transcripción de los genes *virB* al producirse una acidificación de las BCVs. Por el contrario, sí que se ha descrito una vía de regulación de la expresión génica de este operón mediada por la síntesis de pentafofosfato de guanosina [(p)ppGpp] por la enzima Rsh. Parece ser que bajo condiciones de estrés nutricional, se produce a través de esta ruta, un incremento de la transcripción del denominado Factor de Integración del Hospedador (IHF), que a su vez, es responsable de activar la expresión génica de los genes *virB* (Boschiroli *et al.*, 2002; Dozot *et al.*, 2006; Rambow-Larsen *et al.*, 2009) (Figura 5).

Recientemente se ha descubierto en *B. abortus* un factor de transcripción denominado HutC que se une directamente al promotor del operón *virB* para activar su expresión (Sieira *et al.*, 2010) (Figura 5). Se ha comprobado además, que este factor actúa también como un represor de los genes implicados en la ruta de la utilización de histidina, por lo que se ha postulado que mediante esta proteína, probablemente *Brucella* sea capaz de coordinar su propio metabolismo bajo condiciones de estrés nutricional con el desarrollo de respuestas adaptativas involucradas en su capacidad de supervivencia intracelular (Sieira *et al.*, 2010).

- El sistema "quórum sensing".

Se ha demostrado que la comunicación entre los componentes de una población bacteriana es un proceso muy importante a la hora del establecimiento de interacciones simbióticas y patogénicas con el hospedador (Anand *et al.*, 2003; Sánchez-Contreras *et al.*, 2007). Esta comunicación sucede en bacterias Gram negativas a través del proceso



de regulación global denominado "quórum sensing", el cual permite la coordinación del comportamiento de una población bacteriana mediante un mecanismo de control de la expresión génica dependiente de la densidad celular (Miller and Bassler, 2001; Waters and Bassler, 2005). Fue descubierto por primera vez en el microorganismo *Vibrio fischeri* a finales de 1970 (Hastings and Nealson, 1977) y se ha observado que está basado en la síntesis, detección y respuesta a pequeñas moléculas difusoras, llamadas moléculas autoinducoras, y que normalmente son acil-homoserina-lactonas (A-HSLs) (Fuqua *et al.*, 2001; Camilli and Bassler, 2006). Una de estas A-HSLs, la denominada N-dodecanoil-homoserina-lactona (C12-HSL), se ha logrado purificar en sobrenadantes de cultivos de *B. melitensis* (Taminiau *et al.*, 2002). Sin embargo, el gen responsable de la producción de esta A-HSL (*luxI*) no se ha podido identificar en su genoma (Taminiau *et al.*, 2002). Una posible explicación que se ha propuesto para ello, es la presencia en esta especie de otra sintetasa diferente que todavía permanece sin ser descubierta (Weeks *et al.*, 2010). Por otra parte, las concentraciones de C12-HSL que se han logrado obtener *in vitro*, son muy bajas en comparación con la producción de esta molécula por otras bacterias. Se ha sugerido también, que este hecho podría tratarse de una estrategia de la bacteria para favorecer su supervivencia intracelular, ya que se ha descubierto que C12-HSL activa la síntesis de TNF α por parte de los macrófagos (Gomi *et al.*, 2006).

Hasta el momento, se han identificado en *B. melitensis* 16M, dos factores de transcripción que intervienen en este proceso "quórum sensing": VjbR y BlxR (también llamado BabR) (Delrue *et al.*, 2005; Rambow-Larsen *et al.*, 2008), los cuales presentan un dominio de unión al ADN en el extremo C-terminal y otro dominio de unión homoserina-lactona en el extremo N-terminal (Rambow-Larsen *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que VjbR es un factor transcripcional que activa la expresión de un gran número de genes que codifican desde proteínas de membrana externa, lipoproteínas, adhesinas, hasta genes implicados en el metabolismo de la bacteria y en la

biosíntesis del flagelo (Delrue *et al.*, 2005; Uzureau *et al.*, 2007; Uzureau *et al.*, 2010; Weeks *et al.*, 2010). Aunque se ha descrito que el género *Brucella* está compuesto por microorganismos no móviles, se ha observado que éstos poseen la capacidad genética para sintetizar un flagelo. De hecho, bajo ciertas condiciones de crecimiento en cultivo, se ha comprobado que *B. melitensis* 16M ensambla un orgánulo polar completo y móvil (Fretin *et al.*, 2005). Aparte de VjbR, se ha identificado otra proteína denominada FctR, que podría intervenir también en la regulación de la biosíntesis de estos componentes estructurales flagelares a través de otras rutas (Leónard *et al.*, 2007).

Adicionalmente, varios estudios han revelado que el factor de transcripción VjbR también activa la expresión de los genes *virB* en *B. melitensis* 16M (Delrue *et al.*, 2005). Recientemente se ha identificado en el promotor del operón *virB* de esta cepa, una secuencia de 9 pb (GCCCCCTCA) que es reconocida específicamente por VjbR. Además, se ha observado que esta secuencia es idéntica a la mitad del motivo que constituye el sitio de unión de MrtR, un regulador de transcripción implicado en el proceso "quórum sensing" que controla la nodulación en el microorganismo *Mesorhizobium tianshanense* (Arocena *et al.*, 2010). Asimismo, se ha comprobado que en el proceso "quórum sensing" de *B. melitensis* 16M, la C12-HSL se une al factor VjbR para mediar la represión de la expresión del operón *virB* (Uzureau *et al.*, 2007) (Figura 5).

Por otro lado, se ha sugerido también que VjbR podría corregular la expresión del operón *virB* junto con la de aquellos genes que codifican proteínas que son secretadas por el sistema T4SS. De hecho, se ha observado que *vceA* y *vceC*, que codifican dos proteínas descritas como secretadas por este sistema, presentan un motivo regulador para la unión de VjbR (de Jong *et al.*, 2008). Todos estos datos, junto con la marcada atenuación en la virulencia que exhiben las cepas mutantes $\Delta vjbR$ de *B. melitensis* 16M en cultivos celulares y en ratón (Delrue *et al.*, 2005; Arenas-Gamboa *et al.*, 2008; Rambow-Larsen *et al.*, 2008), señalan a VjbR como uno de los factores más importantes que regula factores involucrados en la virulencia del género *Brucella*. De hecho, se han incluido en el estudio de nuevas vacunas mejoradas, cepas mutantes en el gen que lo codifica (Arenas-Gamboa *et al.*, 2008; Arenas-Gamboa *et al.*, 2009).

Finalmente, se ha observado que la proteína BlxR también se encuentra implicada en la regulación de numerosos genes involucrados en el metabolismo, virulencia y respuesta al estrés de *B. melitensis* 16M (Rambow-Larsen *et al.*, 2008; Uzureau *et al.*, 2010). Sin embargo, su ausencia no causa una disminución de la capacidad de colonización esplénica de la bacteria en ratón (Rambow-Larsen *et al.*, 2008). Recientemente se ha comprobado mediante diversos estudios de expresión génica que VjbR y BlxR que no llevan a cabo funciones redundantes en el microorganismo ya que forman parte de dos circuitos de regulación transcripcional implicados en la adaptación de *Brucella* sp. a diferentes ambientes durante el periodo de infección (Rambow-Larsen *et al.*, 2008; Uzureau *et al.*, 2010; Weeks *et al.*, 2010).

- Sistemas reguladores de dos componentes.

Los sistemas de dos componentes son el mecanismo predominante para la transducción de señales en bacterias y están típicamente compuestos por una proteína histidina quinasa sensora y un factor de regulación de la expresión génica. Mediante la utilización de estos sistemas, la bacteria es capaz de ajustar individualmente la transcripción de ciertos genes en respuesta a un estímulo ambiental. En el género *Brucella* se ha detectado la presencia potencial de más de 20 sistemas de dos componentes mediante el análisis de su genoma, sin embargo pocos son los que han sido confirmados y descritos hasta el momento (Rambow-Larsen *et al.*, 2009).

El análisis de diversas cepas mutantes de *B. abortus* 2308 que mostraban una reducida resistencia al péptido catiónico polimixina B, condujo al descubrimiento en este género del denominado sistema regulador de dos componentes BvrR/BvrS (Sola-Landa *et al.*, 1998). Un estudio filogenético reveló además, que éste presentaba homología con los sistemas de dos componentes ChvI/ChvG y ChvI/ExoS de *Agrobacterium tumefaciens* y *Sinorhizobium meliloti* respectivamente, los cuales están involucrados en las relaciones de patogenicidad y de simbiosis que establecen estas bacterias con las células eucariotas vegetales (Charles and Nester, 1993; Cheng and Walter, 1998).

El estudio de las cepas mutantes en el sistema regulador de dos componentes *bvrR/bvrS* de *B. abortus* 2308 que se hallaban atenuadas en cultivos celulares y en ratón (Sola-Landa *et al.*, 1998), revelaron que este sistema se encuentra implicado en el control de la expresión de genes responsables de mantener la integridad de la envuelta celular de esta bacteria (Guzmán-Verri *et al.*, 2002; López-Goñi *et al.*, 2002). Así, se ha observado que la disrupción del sistema BvrR/BvrS en *B. abortus* 2308 altera la expresión de genes que codifican proteínas de membrana externa, como Omp25 y Omp22 (Guzmán-Verri *et al.*, 2002; Lamontagne *et al.*, 2007; Viadas *et al.*, 2010), y de genes que se hallan involucrados en la acilación del lípido A (Mantelora *et al.*, 2005). Debido a esto último, estas cepas mutantes poseen un lípido A compuesto por ácidos grasos con cadenas más cortas que las observadas en las cepas parentales correspondientes. Esta diferente composición altera la permeabilidad de la membrana de los mutantes $\Delta bvrR/\Delta bvrS$, provocando un aumento de su sensibilidad a la acción bactericida de los péptidos catiónicos y que podría explicar en parte, la atenuación que muestran (Mantelora *et al.*, 2005). En cambio, se ha demostrado que la ausencia de Omp25 y Omp22 en la membrana externa de *B. abortus* 2308 no está relacionada con la atenuación que presentan estas cepas mutantes $\Delta bvrR/\Delta bvrS$ en virulencia (Manterola *et al.*, 2007). Cabe destacar que Salhi *et al.* en 2003 también obtuvieron un mutante atenuado de *B. suis* en este sistema de dos componentes en el cual, sin embargo, no observaron que la expresión del gen *omp25* se hallara alterada en comparación con la de la cepa parental.

Por otra parte, se ha demostrado que mutantes en este sistema regulador de dos componentes de *B. abortus* 2308 no incorporan ni activan pequeñas GTPasas de la subfamilia Rho (como cdc2) requeridas para la polimerización de actina, por lo que se muestran incapaces de penetrar en células HeLa en cultivo, permaneciendo unidos a la superficie celular (Guzmán-Verri *et al.*, 2001). Además, a pesar de que todavía se desconoce el estímulo ambiental al que responde este sistema regulador, se cree que podría ser a un pH ácido tal y como sucede con el perteneciente a *Agrobacterium* (Li *et al.*, 2002). De ser verdad, aparte de ser crucial este sistema en *B. abortus* 2308 para el mantenimiento de su homeostasis celular y la invasión de células hospedadoras, constituiría también un importante factor en su adaptación y desarrollo de un nicho replicativo intracelular.

En los últimos años se han descrito otros sistemas reguladores de dos componentes en *Brucella* spp.. Uno de ellos, denominado PdhS-histidina quinasa muestra homología con el sistema PleC-DivJ de *Caulobacter crescentus* implicado en la formación de células hijas asimétricas (Hallez *et al.*, 2004). Esta división asimétrica también se ha observado en *B. abortus* 544, la cual se ha demostrado que se encuentra controlada por el mencionado sistema PdhS-histidina quinasa (Hallez *et al.*, 2007; Mignolet *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha descubierto la presencia en *B. melitensis* y en *B. abortus* de un sistema fotosensor constituido por un complejo proteico denominado LOV-HK (Swartz *et al.*, 2007). Éste está compuesto por un dominio LOV (sensor de Luz, Oxígeno y Voltaje) y un dominio histidina quinasa en los extremos N-terminal y C-terminal, respectivamente. Cuando el complejo LOV-HK detecta luz, absorbe fotones y emplea esa energía para crear un enlace entre sí misma y con una molécula del cofactor flavina mononucleótido (FMN). Esto da como resultado, un incremento de la actividad enzimática quinasa del fotosensor que termina repercutiendo en cambios en la expresión génica de la bacteria. Se ha observado que cepas mutantes de *B. abortus* que portan defectos en este fotosensor se encuentran atenuadas en cultivos de macrófagos y en ratón (Swartz *et al.*, 2007). Estos resultados se repiten cuando la cepa silvestre se cultiva en condiciones de oscuridad, por lo que parece claro la existencia de un estrecho vínculo entre el papel realizado por el fotosensor LOV-HK y un aumento en la virulencia de la bacteria inducido por exposición a luz visible (Swartz *et al.*, 2007, Rambow-Larsen *et al.*, 2009).

2.3.3 Los glucanos cíclicos.

Los β -(1,2) glucanos cíclicos (C β G) constituyen otro factor de virulencia descrito en el género *Brucella*. Éstos son polímeros de glucosa localizados en el espacio periplasmático que también están presentes en otras α -proteobacterias relacionadas filogenéticamente con este género, como son *Agrobacterium tumefaciens* o *Sinorhizobim*

meliloti. La producción de los C β G en estos microorganismos se encuentra osmoregulada y es llevada a cabo por las enzimas codificadas por los genes *chvB* y *ndvB*, respectivamente (Iñón de Iannino *et al.*, 1998; Iñón de Iannino *et al.*, 2000). Se ha comprobado que la presencia de los C β G en *A. tumefaciens* y *S. meliloti* es necesaria para que dichas bacterias puedan establecer correctamente interacciones patogénicas o simbióticas con las células hospedadoras (Puvanesarajah *et al.*, 1985; Dylan *et al.*, 1986; Breedveld and Millar, 1994). Además, se ha observado que en el caso de *A. tumefaciens*, estos compuestos están también involucrados en el ensamblaje de su flagelo (Breedveld and Millar, 1994).

En *Brucella* se ha descubierto que la producción de los C β G no está sometida a una regulación osmótica (Briones *et al.*, 1997) y que la enzima responsable de su síntesis se halla codificada por el gen *cgs* (Iñón de Iannino *et al.*, 1998; Ciocchini *et al.*, 2004; Ciocchini *et al.*, 2006; Guidolin *et al.*, 2009). Éste se ha observado que se encuentra altamente conservado ya que es capaz de complementar cepas mutantes Δ *chvB* de *A. tumefaciens* y Δ *ndvB* de *S. meliloti* (Iñón de Iannino *et al.*, 1998). Se ha demostrado que la disrupción del gen *cgs* en *B. abortus* ocasiona una ligera atenuación en la virulencia que presenta la bacteria en ratón (Briones *et al.*, 2001). Un estudio realizado utilizando un mutante Δ *cgs* de *B. abortus* 2308 ha establecido una posible relación entre la capacidad que poseen los C β G para extraer moléculas de colesterol y el papel que pueden llevar a cabo en la virulencia de esta cepa. Así, parece ser que los C β G alteran los dominios lipídicos ricos en colesterol que están presentes en las membranas de las BCVs y previenen que éstas se fusionen con los lisosomas (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005). De este modo, contribuyen a que la bacteria alcance el fagosoma replicativo, favoreciendo en definitiva, su supervivencia intracelular. A día de hoy, aunque se ha llegado a identificar un transportador de C β G encargado de conducirlos hasta el espacio periplásmico y codificado por el gen *cgt*, se desconoce el mecanismo por el cual son liberados al interior de la BCV (Roset *et al.*, 2004).

Por otro lado, se ha observado que una fracción de los C β G se encuentra substituida con residuos succinílicos en el género *Brucella*, lo que confiere a estos compuestos un carácter aniónico. Mediante el empleo de una cepa mutante de *B. abortus* 2308 en el gen *cgm*, el cual codifica la enzima succiniltransferasa encargada de hacer las mencionadas modificaciones, se ha demostrado que este carácter aniónico de los C β G posee un papel relevante en la adaptación de la bacteria a un ambiente hipo-osmótico. (Roset *et al.*, 2006). En este estudio se sugiere además, que *Brucella* sp. no se ve sometida a este tipo de estrés durante el tráfico intracelular ya que no se observaron diferencias en la virulencia entre la cepa mutante y la cepa parental (Roset *et al.*, 2006).

2.3.4 La proteína transportadora BacA.

En los últimos años se ha identificado en *B. abortus* 2308 un gen que muestra una elevada homología con el gen *bacA* de *Sinorhizobium meliloti*, el cual, es esencial para que exista un correcto establecimiento de la relaciones endosimbióticas que lleva a cabo este microorganismo con células de plantas de alfafa (LeVier *et al.*, 2000). Se ha observado que en *S. meliloti* este gen codifica una proteína transportadora implicada posiblemente en la modificación del LPS (Glazebrook *et al.*, 1993; LeVier and Walter, 2001), por lo que podría tener un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la envuelta celular. En *B. abortus* 2308, *bacA* también codifica una proteína de la membrana citoplasmática que podría estar involucrada en el transporte de los ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFAs) ($C \geq 28$) que componen el lípido A (Ferguson *et al.*, 2004). Aunque hasta el momento se desconoce el mecanismo molecular de actuación de esta proteína, se ha demostrado que su ausencia provoca un aumento de la sensibilidad de la bacteria a un pH ácido, al etanol, a ciertos detergentes y a altas temperaturas de crecimiento, tal y como sucede en *S. meliloti* (Roop *et al.*, 2002). Por ello, se ha sugerido que la proteína BacA en *B. abortus* 2308 también podría estar relacionada con el mantenimiento de la integridad de la envuelta celular (Roop *et al.*, 2002). Asimismo, se ha comprobado que cepas mutantes $\Delta bacA$ de esta estirpe lisa de *Brucella* presentan atenuación en la virulencia en cultivos celulares de macrófagos y en ratón (LeVier *et al.*, 2000; Parent *et al.*, 2007). Este hecho se ha relacionado con una posible incapacidad de estos mutantes para poder adaptarse a las condiciones ácidas que se encuentran en el interior de las BCVs durante su tránsito intracelular (Roop *et al.*, 2002; Bellaire *et al.*, 2005). Por otra parte, se ha observado que las cepas de *B. abortus* 2308 que portan un gen *bacA* no funcional, inducen en ratón una respuesta proinflamatoria más fuerte que la cepa parental y que puede contribuir también a que estos mutantes sean incapaces de mantener infecciones crónicas en el modelo murino (Parent *et al.*, 2007).

Finalmente, se han obtenido datos que indican que estas cepas mutantes $\Delta bacA$ de *B. abortus* 2308 podrían ser unas buenas candidatas a vacunas. Así, se ha demostrado que estas cepas mutantes, las cuales son eliminadas del bazo de ratones experimentalmente infectados a las 8 semanas p.i., inducen en estos animales una fuerte respuesta humoral y celular específica frente a *Brucella* (Roop *et al.*, 2002). Además, se ha comprobado que proporcionan en ratón una protección frente a una infección por la cepa parental equivalente a la observada en experimentos llevados a cabo con la cepa vacunal *B. abortus* S19 (Roop *et al.*, 2002).

3. ESPECIES NATURALMENTE RUGOSAS DE *Brucella*.

Como ya se ha mencionado previamente, *B. ovis* y *B. canis* son dos especies naturalmente rugosas que forman parte del género *Brucella*, que carecen por tanto, de cadenas polisacáridas *O* en el lipopolisacárido presente en su membrana externa. Sin embargo, el que tengan un carácter rugoso no es un impedimento para que ambas especies se muestren virulentas en sus respectivos hospedadores y en modelos experimentales animales, a diferencia de lo que sucede en cepas mutantes rugosas obtenidas de estirpes lisas de *Brucella*.

B. canis fue aislada por primera vez por Leland Carmichael en el año 1966 a partir de tejidos fetales procedentes de un criadero de perros de Estados Unidos en el cual, sucedían brotes severos de abortos epizooticos (Carmichael, 1966). Hoy se sabe que es el agente causal de la brucelosis canina, la cual es especialmente común en México, Sudamérica y en los estados del sur de Estados Unidos (Wanke, 2004). Los perros son los hospedadores naturales de este patógeno, en los cuales causa abortos en las hembras gestantes, y epididimitis, orquitis y prostatitis en diferentes grados de severidad en machos (Wanke, 2004). Debido a ello, causa grandes pérdidas económicas en criaderos ya que provoca una fuerte disminución de la fertilidad del animal.

Las principales vías de contagio descritas para la brucelosis canina son la oral, a través de la ingesta de alimentos contaminados tales como, placentas, fetos o leche, y la venérea, a través del semen de machos infectados (Wanke, 2004). El diagnóstico de la enfermedad se lleva a cabo mediante el aislamiento microbiológico del agente a través de hemocultivos, sin embargo, debido a que es un proceso lento y que la bacteremia puede ser intermitente, se emplean alternativamente otras pruebas serológicas que determinan la presencia de anticuerpos frente a *B. canis* en el animal. Entre ellas se encuentran: la prueba de aglutinación en tubo, de inmunodifusión en gel, diversos tests de ELISA, ensayos de inmunofluorescencia indirecta y la prueba de aglutinación rápida en placa (RSAT). Ésta última se utiliza oficialmente en Estados Unidos para descartar rápidamente aquellos animales que no sufren la enfermedad y como antígeno emplea una suspensión de *B. ovis* teñida con Rosa de Bengala que da reacción cruzada con *B. canis* (Damp *et al.*, 1973; Carmichael and Joubert, 1987; Wanke, 2004). Aparte de estas pruebas serológicas, actualmente también se están desarrollando otras basadas en técnicas moleculares que permitan diagnosticar la enfermedad de una forma más rápida y precisa (García-Yoldi *et al.*, 2006; Keid *et al.*, 2007a; Keid *et al.*, 2007b; Huber *et al.*, 2009; Keid *et al.*, 2009; Keid *et al.*, 2010; Mayer-Scholl *et al.*, 2010).

Por otro lado, a pesar de que el hombre es bastante resistente a la infección por *B. canis* y que se necesita una exposición masiva de microorganismos para producirse la enfermedad, se han descrito casos esporádicos de brucelosis humana causada por este patógeno. Éstos normalmente se han dado en personas que tienen un estrecho contacto

con el animal infectado, como pueden ser veterinarios, trabajadores de criaderos de perros o técnicos de laboratorio (Wanke, 2004). Sin embargo, recientemente se ha descubierto un caso de infección en un paciente infectado por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Lucero *et al.*, 2010). Los síntomas que produce *B. canis* en el hombre generalmente, son más leves que los provocados por otras especies de *Brucella*, siendo en la mayoría de los casos, un síndrome febril prolongado con un aumento del tamaño de los nódulos linfáticos. Por ello, en muchas ocasiones las infecciones por este patógeno no son diagnosticadas y pasan desapercibidas (Wanke, 2004).

Actualmente, no existe ninguna vacuna específica frente a *B. canis*, por lo que la principal estrategia llevada a cabo en el control y prevención de la enfermedad suele ser la castración en machos infectados y/o separación o eliminación de los animales afectados.

B. ovis es un cocobacilo que requiere para su crecimiento un suplemento de suero en el medio de cultivo y una atmósfera con 5 – 10 % de CO₂. Se trata de la especie de *Brucella* que infecta mamíferos terrestres más divergente (Cloeckart *et al.*, 1995b; Cloeckart *et al.*, 1996b; Ficht *et al.*, 1996; Michaux-Charachon *et al.*, 1997; Vizcaíno *et al.*, 2004), y es la responsable de causar la denominada epididimitis contagiosa del carnero, una enfermedad infectocontagiosa de distribución mundial. A diferencia de otras especies de *Brucella* que poseen un rango más amplio de animales susceptibles a su infección y que normalmente se localizan en tejidos placentarios, *B. ovis* presenta una preferencia restringida de hospedador, el carnero, y un marcado tropismo por sus órganos reproductores, en los que causa epididimitis, vesiculitis seminal y orquitis. Como consecuencia de la infección, se produce una disminución en la fertilidad de los machos infectados por la bacteria debido a una mala calidad del semen. Cabe destacar que también se han descrito casos de infecciones por *B. ovis* en ovejas, en las cuales provoca abortos esporádicos y nacimientos de corderos débiles (Paolicchi, 2001).

La principal vía de contagio de la infección causada por *B. ovis* es mediante transmisión sexual, siendo el carnero un diseminador activo a través de su semen. En cambio, la adquisición de la enfermedad por vía oral no parece ser relevante en el caso de *B. ovis*. Esto podría estar relacionado, al menos en parte, a que esta especie carece de actividad ureasa debido a una delección en su genoma que afecta a los genes *ureG2* y *ureT*, los cuales son necesarios en otras especies de *Brucella* para hacer frente a los medios ácidos gastrointestinales (Bandara *et al.*, 2007; Sangari *et al.*, 2007; Tsolis *et al.*, 2009; Sangari *et al.*, 2010). Sin embargo, se han descrito casos donde la infección se ha transmitido a través de pastos y fuentes de agua contaminados con secreciones y/o excreciones corporales (Quispe *et al.*, 2002), a través de un contagio directo entre carneros en sistemas de explotación con servicio estacionado (Paolicchi, 2001), e incluso,

a través de ovejas infectadas donde la bacteria ha permanecido de una estación reproductiva a otra (Paolicchi, 2001).

En el diagnóstico de la brucelosis ovina causada por *B. ovis*, como en el caso de *B. canis*, también se recurre normalmente al empleo de pruebas serológicas que utilizan antígenos de superficie obtenidos de la bacteria (O.I.E., 2004). Entre éstas destacan: la fijación de complemento (FC) (Myers *et al.*, 1972), la prueba de inmunodifusión en gel (AGID), que emplea como antígeno, el extracto salino de *B. ovis* (Myers, 1973) y el ELISA indirecto, en el cual, se han utilizado como antígenos, células de *B. ovis* sonicadas, extracto salino de este microorganismo y R-LPS, entre otros (Marín *et al.*, 1989; Ficapal *et al.*, 1995; Vigliocco *et al.*, 1997). Esta última prueba es la que presenta más sensibilidad y especificidad, permitiendo además, el procesamiento simultáneo de un gran número de muestras. Alternativamente, en los últimos años se han desarrollado otras pruebas complementarias basadas en métodos moleculares que resultan ser rápidas, específicas y muy sensibles. Así, se ha demostrado que la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) presenta una gran sensibilidad a la hora de la detección de *B. ovis* en el semen de carneros (Manterola *et al.*, 2003; García-Yoldi *et al.*, 2006; Mayer-Scholl *et al.*, 2010).

El control de la epididimitis contagiosa del carnero causada por *B. ovis* se lleva a cabo fundamentalmente a través de programas de prevención y erradicación de la enfermedad. La medida que se toma en aquellos países donde la incidencia de la enfermedad es baja se basa principalmente en el sacrificio de los animales infectados. Sin embargo, este procedimiento resulta antieconómico y poco viable en aquellos donde el predominio de la infección es elevado (Blasco, 1990). En estos casos, la vacunación es la única medida de control disponible, aunque hasta el momento, no existe tampoco ninguna vacuna que sea específica frente a *B. ovis*.

Desde los años 60 del pasado siglo se está empleando en la profilaxis de la brucelosis ovina causada por *B. ovis*, la vacuna atenuada *B. melitensis* Rev1 (Blasco, 1997). A pesar de que su administración tanto por vía subcutánea como por vía conjuntival en carneros resulta ser efectiva en la protección frente a la infección (García-Carrillo, 1981; Fensterbank *et al.*, 1982; Fensterbank *et al.*, 1985; Blasco *et al.*, 1987; Marín *et al.*, 1990; Schurig *et al.*, 2002), presenta varios inconvenientes que hacen que no sea una vacuna completamente idónea. Algunos de estos problemas son: un alto riesgo de aborto cuando se administra en ovejas gestantes (Blasco, 1997; Schurig *et al.*, 2002), interferencia en el diagnóstico de animales infectados por cepas lisas del género *Brucella* debido a que en los vacunados induce la producción de anticuerpos frente a su lipopolisacárido en fase lisa (Blasco, 1997) y un cierto riesgo de infección en su manipulación para el hombre (Blasco and Díaz, 1993), acentuado por la resistencia que presenta esta cepa a la estreptomicina, uno de los antibióticos empleados comúnmente en el tratamiento de la brucelosis humana (Skalsky *et al.*, 2008). A esto hay que sumar

que la inocuidad de esta vacuna en machos aún no está clara (Marín *et al.*, 1990) y que su uso se encuentra prohibido en países donde las infecciones por *B. melitensis* se consideran erradicadas.

Por tanto, un aspecto importante dentro de la investigación en brucelosis, es la obtención de vacunas que sean específicas y efectivas frente a *B. canis*, y especialmente, frente a *B. ovis*, para poder ser usadas en la profilaxis de la enfermedad que causan. Sin embargo, hasta el momento se desconocen prácticamente los mecanismos que emplean estas dos especies naturalmente rugosas para establecer su proceso infeccioso en el organismo hospedador. Por ello, el hallazgo de posibles factores que se encuentren implicados en la virulencia de *B. ovis* y *B. canis* podría permitir la obtención de vacunas frente a estas especies, y adicionalmente, también podría ayudar a esclarecer las diferencias de patogenicidad y de preferencia de hospedador que existen entre las distintas especies de *Brucella*.

Objetivos

Los mecanismos de virulencia detallados anteriormente se han estudiado fundamentalmente en cepas lisas del género *Brucella*, en las que se ha demostrado que las cadenas polisacáridicas O del LPS son indispensables para el establecimiento del proceso infeccioso. Sin embargo, existen especies de *Brucella* naturalmente rugosas que son virulentas tanto en sus hospedadores primarios como en modelos experimentales animales y que además, provocan importantes problemas económicos y casos esporádicos de infecciones en humanos. Las vacunas existentes en la actualidad se han diseñado para la prevención de infecciones por cepas lisas de *Brucella* y su empleo para la profilaxis de la brucelosis causada por cepas rugosas presenta graves inconvenientes. Por ello, el estudio de los factores de virulencia de *B. ovis* y *B. canis* es un aspecto importante de la investigación en brucelosis, tanto para un mejor conocimiento de las interacciones patógeno-hospedador como para el desarrollo de nuevas vacunas específicas que eviten los inconvenientes que presentan las empleadas en la actualidad.

Considerando lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo de investigación nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- I. Análisis del comportamiento intracelular que muestran las cepas naturalmente rugosas *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66 en células fagocíticas profesionales, así como el estudio de posibles mecanismos de infección empleados por dichas cepas.**

- II. Estudio de la expresión de los genes que codifican las PME's de la familia Omp25/Omp31 en distintas especies del género *Brucella* y análisis del papel de algunos de los miembros de esta familia en la virulencia tanto, de las cepas naturalmente rugosas *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66, como de estirpes lisas de este género.**

- III. Estudio del papel del operón *virB* y de los genes *vjbR*, *cgs* y *bacA* (todos ellos implicados en la virulencia de cepas lisas de *Brucella*) en el establecimiento del proceso infeccioso de la cepa naturalmente rugosa *B. ovis* PA.**

Materiales y Métodos

1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS.

1.1 Cepas de *Brucella* spp.

Las cepas silvestres de *Brucella* que se han empleado en la realización del presente trabajo (Tabla I) proceden de la Colección de Cultivos de *Brucella* del Institut National de la Recherche Agronomique de Nouzilly, Francia (*Brucella* Culture Collection of Nouzilly; BCCN).

Tabla I. Cepas de *Brucella* utilizadas en este estudio.

Especies y cepas	Hospedador	Origen ^a	Tipo de LPS ^b y otras características
<i>B. melitensis</i>			
16M ^d	Caprino	BCCN R1	S-LPS
Rev1 ^c		BCCN V4a	
B115		BCCN R19	
<i>B. abortus</i>			
544 ^d	Vacuno	BCCN R4	S-LPS
2308		BCCN R10	S-LPS
B19 ^c		BCCN V1	S-LPS
RB51 ^c		BCCN V5	R-LPS
45/20		BCCN V2	R-LPS
<i>B. suis</i> 1330^d	Porcino	BCCN R12	S-LPS
<i>B. neotomae</i> 5K33^d	Rata del desierto	BCCN R16	S-LPS
<i>B. canis</i> RM6/66^d	Perro	BCCN R18	R-LPS
<i>B. ovis</i>			
PA	Ovino	BCCN76-250	R-LPS
PNV31A		Caro-Hernández <i>et al.</i> , 2007	PA con <i>omp31</i> inactivado. Kan ^r
PNV31A-com		Caro-Hernández <i>et al.</i> , 2007	PNV31A complementada ^e . Kan ^r y Amp ^r
PNV25A		Caro-Hernández <i>et al.</i> , 2007	PA con <i>omp25</i> inactivado. Kan ^r
PNV25A-com		Caro-Hernández <i>et al.</i> , 2007	PNV25A complementada ^e . Kan ^r y Amp ^r
PNV25cA		Caro-Hernández <i>et al.</i> , 2007	PA con <i>omp25c</i> inactivado. Kan ^r
PNV25cA-com		Caro-Hernández <i>et al.</i> , 2007	PNV25cA complementada ^e . Kan ^r y Amp ^r
PNV25dA		Caro-Hernández <i>et al.</i> , 2007	PA con <i>omp25d</i> inactivado. Kan ^r
PNV25dA-com		Caro-Hernández <i>et al.</i> , 2007	PNV25dA complementada ^e . Kan ^r y Amp ^r
PNV22A		Caro-Hernández <i>et al.</i> , 2007	PA con <i>omp22</i> inactivado. Kan ^r
PNV22A-com		Caro-Hernández <i>et al.</i> , 2007	PNV22A complementada ^e . Kan ^r y Amp ^r
PNV31b-com		Nuestro laboratorio	PA complementada ^e con <i>omp31b</i> de <i>B. abortus</i> 544. Amp ^r
PNV998-10		Vizcaíno <i>et al.</i> , 2004	PA complementada con pNV998-10 ^f . Kan ^r

^a BCCN, *Brucella* Culture Collection of Nouzilly, Francia.

^b S-LPS, Lipopolisacárido en fase lisa ; R-LPS, Lipopolisacárido en fase rugosa

^c Cepa vacunal

^d Cepa de referencia

^e Cepas mutantes complementadas con el correspondiente gen silvestre clonado en pBBR1MCS-4.

^f Plásmido portador de un fragmento de 15kb de *B. melitensis* 16M que está ausente en *B. ovis* y que contiene *omp25b*).

1.2 Cepas de *Escherichia coli*.

En los trabajos de clonación molecular se emplearon diferentes cepas de *E. coli*, cuyas características se recogen en la Tabla II.

Tabla II. Cepas de *E. coli* utilizadas en el presente trabajo.

Cepas de <i>E. coli</i>	Genotipo Relevante	Fuente o Referencia
<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F' traD36, proAB, lacI^qZΔM15]</i>	Promega Corp.
<i>E. coli</i> CC118 λpir	<i>Δ(ara leu), araD, ΔlacX74, galE, galK, thi-1, phoA20, rpsE, rpoB, argE(Am), recA1, λpir</i>	Herrero <i>et al.</i> , 1990
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>hsdS, gal (λ cIts857, ind-1, Sam7, nin-5, lacUV5-T7 gene 1)</i>	Studier and Moffatt, 1986

Todas las cepas bacterianas empleadas y obtenidas en el presente trabajo se almacenaron en ultracongeladores a -80 °C en viales con dimetil sulfóxido (DMSO) al 7 % (v/v) con la finalidad de mantenerlas durante largos periodos de tiempo.

2. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO.

2.1 *Brucella* spp.

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento y mantenimiento de las cepas de *Brucella* fueron caldo Triptona de Soja (TSB; Pronadisa) o agar Tripticaseína de Soja (TSA; Pronadisa), suplementados con extracto de levadura al 0,3 % (p/v) (YE, Yeast extract; Pronadisa) y suero de caballo descomplementado por calentamiento a 56 °C durante 1 hora al 5 % (v/v) (HS, Horse serum; Gibco-BRL) (medios TSB-YE-HS o TSA-YE-HS). Para la selección de colonias de *Brucella* mutantes o complementadas, los medios de cultivo se suplementaron con preparaciones de kanamicina (Sulfato ácido, SIGMA-ALDRICH) y/o ampicilina (Sal sódica, SIGMA-ALDRICH), según el caso, a una concentración final de 50 µg/ml. En los experimentos llevados a cabo en la Unidad de Sanidad Animal del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) de Aragón, el medio empleado fue Blood Agar Base Nº 2 (BAB; Biolife) suplementado con un 5 % de suero de ternera (Seromed, Biochrom) (medio BAB-S).

En todos los casos, la temperatura de incubación fue de 37 °C, en una atmósfera con 10 % de CO₂ (excepto para *B. canis*). Los cultivos que se realizaron en medio líquido se llevaron a cabo en agitadores orbitales a 116 rpm y su crecimiento se controló midiendo la turbidez que presentaban los cultivos por absorbancia a una longitud de onda de 600 nm (D.O._{600 nm}). Para ello, se empleó el espectrofotómetro "CO8000 Biowave Personal Cell Density Meter" (WPA, Biochrom).

Todos los experimentos se realizaron partiendo de un precultivo en medio sólido de las cepas congeladas, incubado durante un periodo de 3 días.

2.2 *Escherichia coli*.

Para el crecimiento de *E. coli* se empleó el medio Luria Bertani (LB), compuesto por extracto de levadura al 1 % (p/v) (Pronadisa), triptona al 1 % (p/v) (Pronadisa) y cloruro sódico al 1 % (p/v) (Panreac). En el caso de su uso en estado sólido, se suplementó con agar (Pronadisa) a una concentración final de 15 g/ml.

Cuando fue necesario seleccionar clones bacterianos mediante resistencia a antibióticos, los medios se suplementaron con kanamicina y/o ampicilina a una concentración final de 50 µg/ml. Cuando fue preciso diferenciar clones con o sin actividad β-galactosidasa, las placas de LB se suplementaron 15 minutos antes de la siembra con 80 µl de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) 0.1 M y 20 µl de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) 50 mg/ml.

Los cultivos de *E. coli*, tanto en medio sólido como en medio líquido (en agitación), se incubaron a una temperatura de 37 °C.

3. MATERIALES Y TÉCNICAS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

3.1 Vectores de clonación empleados.

- pGEM[®]-T y pGEM[®]-T Easy.

Vectores bacterianos linearizados de 3003 y 3018 pb respectivamente (Figura 6A y 6B), comercializados por Promega Corp. Proceden del vector pGEM[®]-5Zf(+) digerido con *EcoRV*, al que se le ha añadido un residuo de timina en cada extremo 3' generado. Debido a la presencia de estas bases, la clonación de productos de PCR se ve facilitada ya que la mayoría de las ADN polimerasas añaden una desoxiadenosina en los extremos 3' de los fragmentos amplificados.

Ambos contienen en su secuencia el origen de replicación ColE1 de *E. coli*, el gen *bla*, que codifica una β-lactamasa que confiere resistencia a ampicilina (Amp^r), el origen de replicación del fago f1, los promotores y los puntos de inicio de la transcripción de las ARN polimerasas T3 y SP6, que permiten las síntesis de ARN *in vitro*, y un sitio de clonación múltiple insertado en la fase de lectura abierta del gen *lacZ*. Este gen, inducible por IPTG, codifica el péptido α de la β-galactosidasa, enzima que al actuar sobre el sustrato X-Gal, origina un producto de color azul. Esto permite la selección de clones que portan plásmidos recombinantes, ya que la inserción de un fragmento de ADN en dicha región, inactiva el gen *lacZ*, y las colonias poseen un color blanco frente a aquellas que portan el plásmido sin inserto, que poseen un color azul (selección blanco-azul).

- **pGEM[®]-7Zf (+).**

Vector circular de 2997 pb (Promega Corp.) (Figura 6C) que deriva del vector pGEM[®]-3Zf (+) y que posee el origen de replicación ColE1 de *E. coli*, el gen que codifica la β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina (Amp^r), el origen de replicación del fago f1, promotores de las ARN polimerasas T3 y SP6 y un sitio de clonación múltiple insertado en la fase de lectura abierta del gen *lacZ*, el cual permite la identificación de los clones portadores de un plásmido recombinante mediante la selección blanco-azul.

- **pUC19.**

Vector circular de 2686 pb (Fermentas) (Figura 6D) que contiene el origen de replicación procedente del plásmido pBR332, un gen que confiere resistencia a ampicilina (Amp^r) y un sitio múltiple de clonación insertado en la secuencia del gen *lacZ*, lo que permite el uso de la selección blanco-azul para la identificación de clones portadores de plásmidos recombinantes.

- **pUC4K.**

Vector circular de 3914 pb (Amersham Biosciences) (Figura 6E) que, además de contener en su secuencia un origen de replicación y el marcador de selección *bla* (Amp^r), porta el gen aminoglicósido 3-fosfotransferasa que confiere resistencia a la kanamicina (Kan^r). Éste se encuentra flanqueado en sus dos extremos por sitios de corte para las enzimas de restricción *Pst*I, *Sal*I, *Bam*HI y *Eco*RI, lo que permite el uso del gen como fuente de modificación para otros vectores.

- **pCVD442.**

Plásmido que posee un tamaño de 6.2 kb (Donnenberg and Koper, 1991) (Figura 6F) y que se construyó mediante la clonación del gen *sacB*, obtenido mediante *Pst*I de pUM24 (Ried and Collmer, 1987), en el plásmido pGP704 (Miller and Mekalanos, 1988) digerido parcialmente con la misma enzima de restricción. Este plásmido confiere resistencia a ampicilina (Amp^r) y sensibilidad a la sacarosa debido a la presencia del gen *sacB* de *Bacillus subtilis*. Éste último codifica la enzima levansacarasa que cataliza la hidrólisis de sacarosa en levanos (polímeros de fructosa de alto peso molecular), los cuales son tóxicos para bacterias Gram negativas (Gay *et al.*, 1985). Este plásmido posee además el origen de transferencia *mobRP4* para procesos de conjugación. A la hora de su replicación, pCVD442 requiere una cepa λ *pir*, como lo es *E. coli* CC118, ya que el origen de replicación que porta es el denominado *oriR6K*, el cual necesita la proteína π codificada por el gen *pir*.

- **pCVDKan-D.**

Este plásmido procede de PCVD442 al cual, mediante digestión enzimática

con *AspI* y *NdeI*, se le ha extraído el gen de resistencia a ampicilina que porta y en su lugar, se ha clonado en orientación directa a *sacB* y después de realizar un tratamiento con Klenow para generar extremos romos, un inserto Kan^r procedente del vector pUC4K digerido con *HincII* (Figura 7).

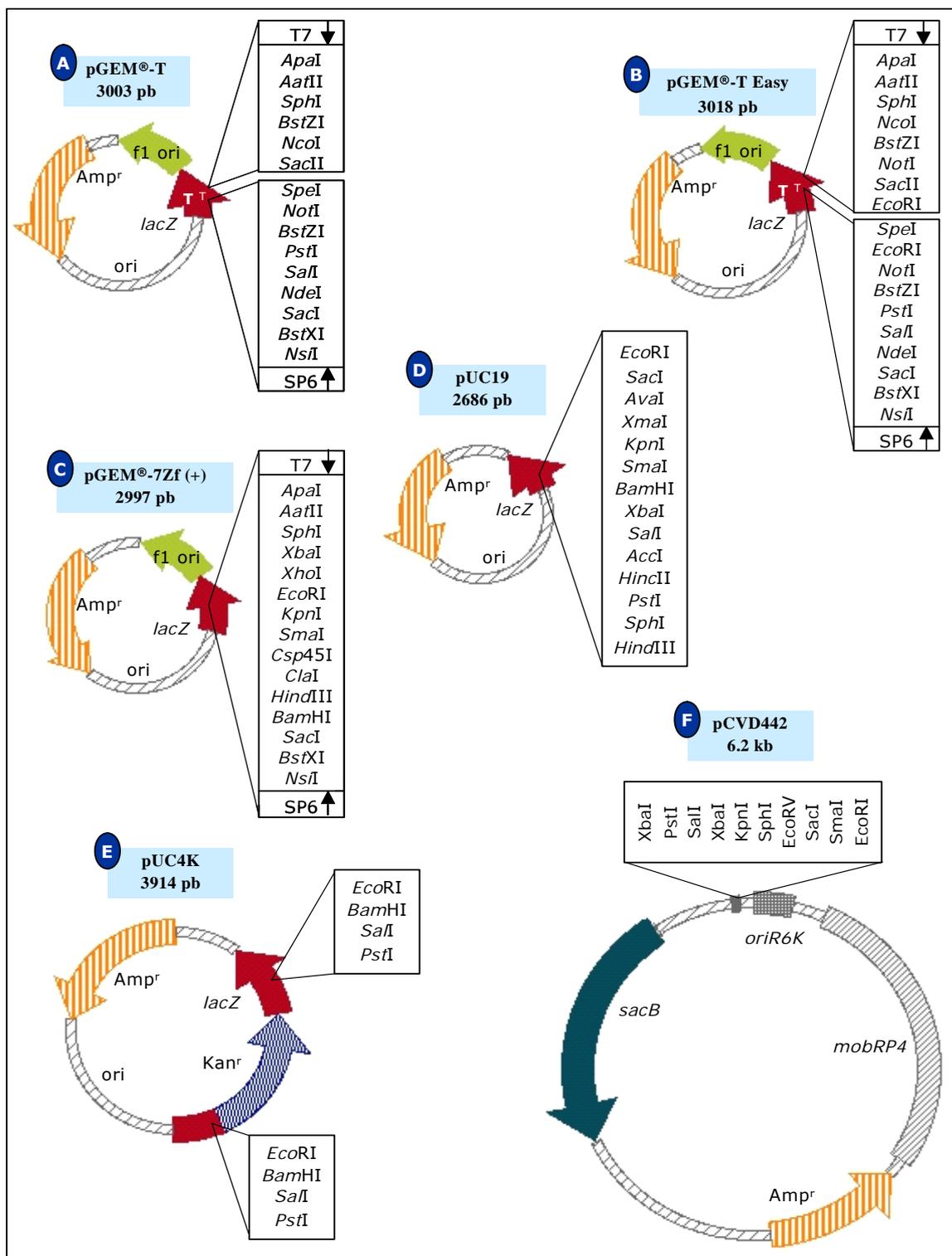
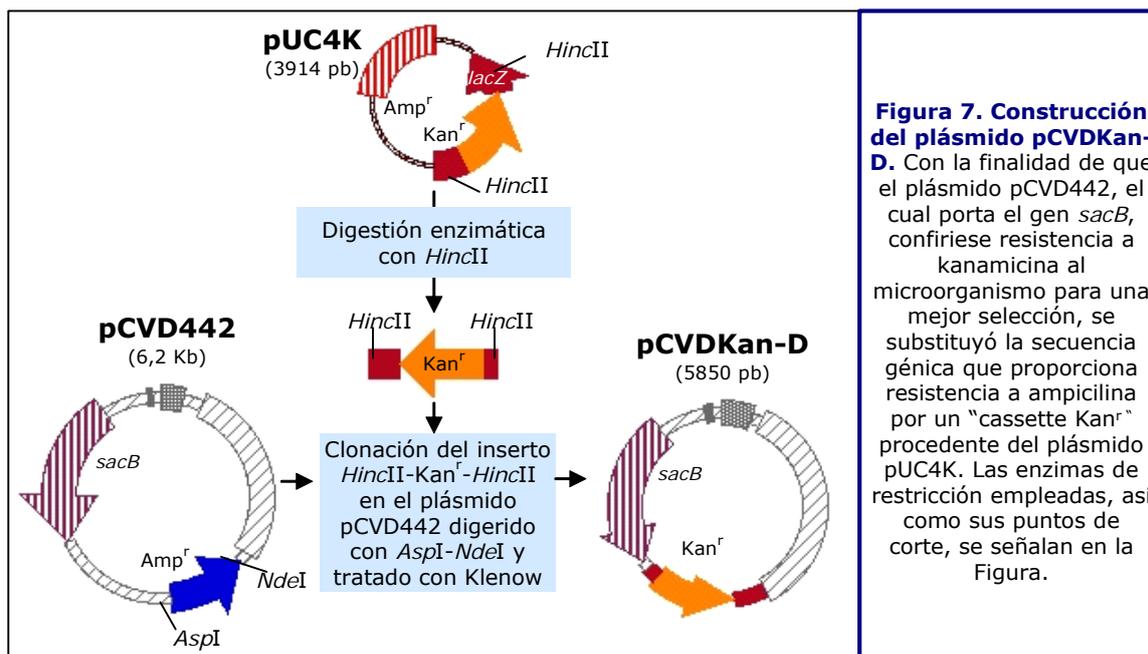


Figura 6. Representación gráfica de los vectores de clonación empleados en el presente trabajo.



- pBBR1MCS2 y pBBR1MCS4.

Plásmidos derivados del pBBR1MCS (Kovach *et al.*, 1994), al que se le han insertado genes de resistencia a antibióticos: pBBR1MCS2 (de 5144 pb) (Figura 8A) confiere resistencia a kanamicina (Kan^r) mientras que pBBR1MCS4 (de 4950 pb) (Figura 8B), a ampicilina (Amp^r). Portan también los genes *rep* y *mob*, necesarios para los procesos de replicación y conjugación y poseen un sitio de clonación múltiple en el gen *lacZ*, lo que permite la selección blanco-azul. Ambos plásmidos han demostrado ser además, estables *in vitro* e *in vivo* en *Brucella* spp. (Kovach *et al.*, 1995).

- pTrcHisA y pTrcHisB.

Vectores de 4.4 kb (Invitrogen, San Diego, CA) (Figura 8C) de expresión que se emplean para la purificación de proteínas recombinantes en *E. coli*. Estos plásmidos portan un sitio de clonación múltiple (MCS) dentro de un marco de lectura abierta (ORF), en el cual se insertan los genes de interés. Previamente al MCS y en dirección 5' - 3' desde el promotor, se encuentran también en dicha ORF: un codón de inicio de la traducción (ATG), una secuencia que codifica seis residuos de histidina en serie (6xHis), un epítipo Xpresstm que permite el reconocimiento mediante anticuerpos de la proteína expresada y un sitio de corte para la enzima enterokinasa (EK) (Figura 8C). De esta forma, se logra obtener una proteína recombinante que porta en su extremo N-terminal, una cola de fusión de histidinas que facilita posteriormente su purificación mediante el empleo de columnas de afinidad. Entre ambos vectores, la única diferencia que existe es el espacio que hay entre la secuencia que codifica el péptido N-terminal y el MCS para poder facilitar la clonación correcta (en fase) del gen de la proteína de interés.

La expresión del gen recombinante se encuentra sometida al control del promotor de expresión *trc* [un híbrido derivado de los promotores *trp* y *lac* (Amann *et al.*, 1983)]. Éste está regulado por el operador *lac*, el cual, se encuentra reprimido por el factor de transcripción codificado por el gen *lacI^f*. Cuando se añade IPTG al medio, éste desplaza del operador al represor, lo que permite que suceda la expresión de la ORF.

Adicionalmente, en la secuencia de estos vectores destaca la presencia de un origen de replicación ColE1, un activador de la transcripción (*g10*), un sitio de unión al ribosoma (RBS), un minicistron que potencia la transcripción y una secuencia de terminación de la transcripción (*rrnB* TT) (Li *et al.*, 1984). Como marcador de selección, estos vectores portan el gen *bla*, que confiere resistencia a ampicilina (*Amp^r*) (Figura 8C).

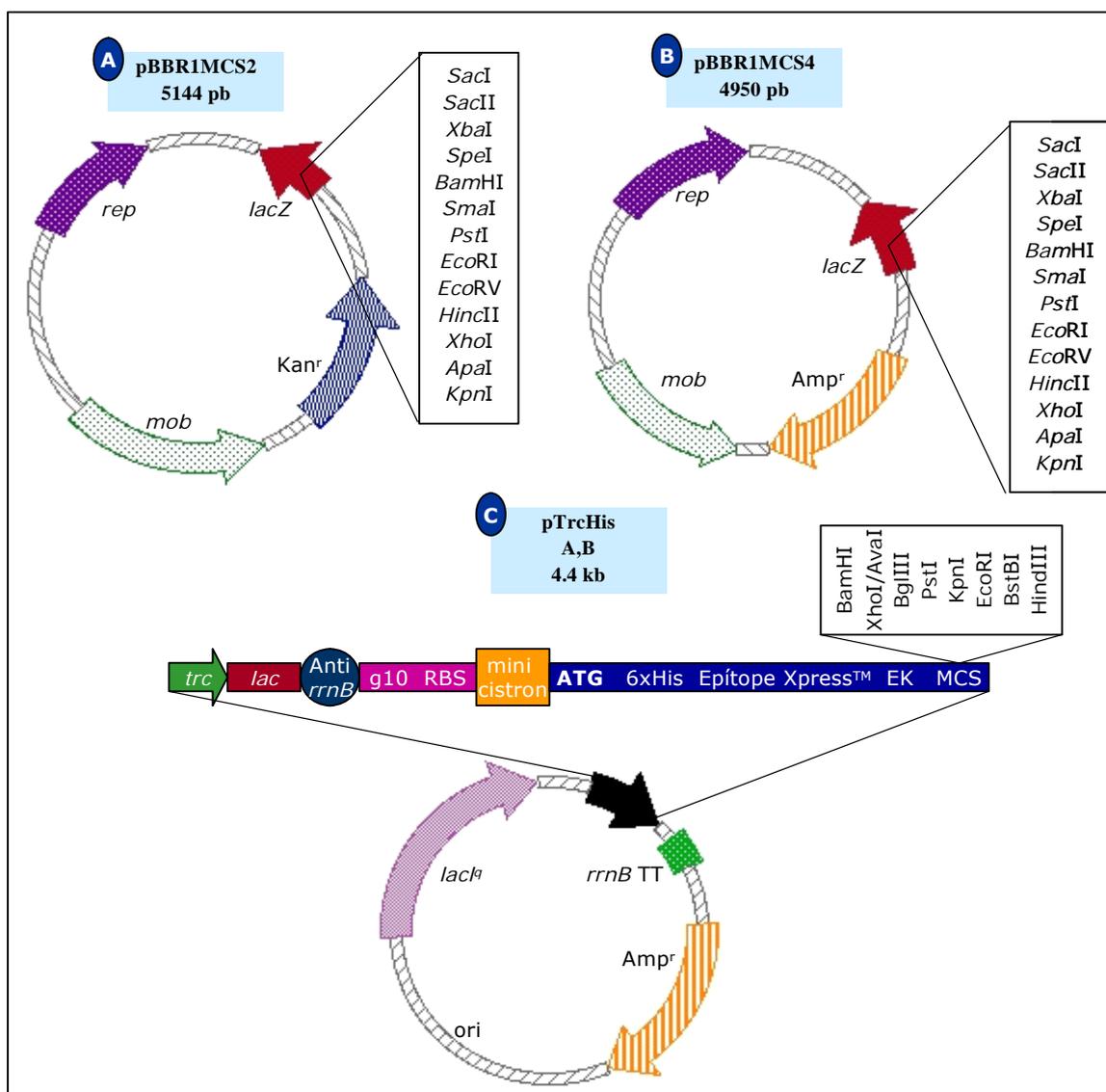


Figura 8. Representación gráfica de los vectores pBBR1MCS2, pBBR1MCS4, pTrcHisA y pTrcHisB empleados en el presente trabajo.

3.2 Cebadores empleados.

En las Tablas III, IV, V y VI se especifican las secuencias de los cebadores (Roche-TIB Molbiol) empleados en las distintas reacciones de PCR y de secuenciación de ADN. Las zonas subrayadas hacen referencia a sitios de corte para diversas enzimas de restricción que se añadieron en los extremos de los cebadores al ser necesarios en algunas ocasiones.

TABLA III. Cebadores utilizados en la clonación de los genes de la familia *omp25/omp31* para la purificación de PMEs recombinantes.

Cebadores empleados en la construcción de plásmidos destinados a la purificación de proteínas recombinantes		
Nombre	Secuencia nucleotídica 5' -> 3'	Gen diana (Posición desde ATG)
31bMAT- <i>Bgl</i> II	<u>AGA TCT</u> GCC GAC ATC ATC GTT GCT	<i>omp31b</i> (+82)
31bR2- <i>Sfu</i> I	<u>TTC GAA</u> CTC CAG CAA GCC ATT CGC	<i>omp31b</i> (+978)
25bcMAT- <i>Bam</i> HI	<u>GGA TCC</u> GCT GAC GCC GTC ATT GAA	<i>omp25b</i> (+66) y <i>omp25c</i> (+66)
25bR- <i>Sfu</i> I	<u>TTC GAA</u> CGC CAT CGC ATT CCG TTG	<i>omp25b</i> (+779)
25cR- <i>Sfu</i> I	<u>TTC GAA</u> TAT TGG GTG AGG ATT GAC	<i>omp25c</i> (+739)
25dMAT- <i>Bam</i> HI	<u>GGA TCC</u> GCG GAT GCC ATT GTT GCG	<i>omp25d</i> (+66)
25dR- <i>Sfu</i> I	<u>TTC GAA</u> CTG AAG GGT AAA TGC GGC	<i>omp25d</i> (+786)
22MAT-F	GCC GAC ATG ATG GGA AGG	<i>omp22</i> (+73)
22R	GTT TGA ATC CCG GCT GTT	<i>omp22</i> (+765)
Cebadores utilizados en secuenciación		
Nombre	Secuencia nucleotídica 5' -> 3'	Plásmido diana
His-F	AAA AGC GAA GCG GCA CTG	pTrcHis A y B
His-R	GTT CGG CAT GGG GTC AGG	pTrcHis A y B

TABLA IV. Cebadores destinados a la construcción de plásmidos que portan genes inactivados pertenecientes a la familia *omp25/omp31*.

Cebadores empleados en la construcción de plásmidos recombinantes portadores de $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$		
Nombre	Secuencia nucleotídica 5' -> 3'	Gen diana/plásmido (Posición desde ATG)
Omp25c-F	CTG TGT CCT GTT TGC TAC	<i>omp25d</i> (-1042)
25cd-MUT R	TTG CCG CTT CCA TCA GGT	<i>omp25d</i> (+1661)
22-MUT F	GGC AAA GAA GAA GGA TAC	<i>omp22</i> (-949)
22-MUT R	CTG CTG GAA TGC CCT GAA	<i>omp22</i> (+1108)
KanF- <i>Nae</i> I	ACT <u>GCC GGC</u> CAC AGG AAA CAG CTA TGA CCA	plásmido pUC4K
KanR- <i>Rsr</i> II	TCT <u>CGG ACC GCT</u> CGT GAA GAA GGT GTT GCT	plásmido pUC4K
Cebadores utilizados en secuenciación y reacciones de PCR		
Nombre	Secuencia nucleotídica 5' -> 3'	Gen diana (Posición desde ATG)
25cd-MUT F3	ACG AAA CAG GCC GAA GCC	<i>omp25d</i> (-1281)
25c-R	CGC CAT CGC ATT CCG TTG	<i>omp25d</i> (-215)
25d-R	CTG AAG GGT AAA TGC GGC	<i>omp25d</i> (+786)
25cd-MUT R3	CCA GCA CGA GAA ACC AGT	<i>omp25d</i> (+1112)
25cd-MUT R2	GAA CCC TGC CAG TAG GAA	<i>omp25d</i> (+1842)
22-MUT F2	ATG TGA AGG TTC TTG CCG	<i>omp22</i> (-1158)
22-MUT F3	TCC TCG TCC ATA ACC ACC	<i>omp22</i> (-368)
22R	GTT TGA ATC CCG GCT GTT	<i>omp22</i> (+764)
22-MUT R2	TGC GTG TTC ATG CCT CAT	<i>omp22</i> (+1310)
Universal - F	GTT TTC CCA GTC ACG AC	plásmido pGEM [®] -T Easy
Universal - R	CAG GAA ACA GCT ATG AC	plásmido pGEM [®] -T Easy

TABLA V. Cebadores utilizados en la obtención de cepas mutantes de *B. ovís* PA en genes implicados en la virulencia de estirpes lisas de *Brucella*.

Cebadores empleados en la construcción de un mutante polar de <i>B. ovís</i> PA en el operón <i>virB</i>		
Nombre	Secuencia nucleotídica 5' -> 3'	Gen/plásmido diana (Posición desde ATG)
<i>virBMUT-F</i>	ACT GTT GCA CCT CAG ACT	<i>virB1</i> (+11)
<i>virBMUT-R</i>	CGT CGC CAG AAA ACC ATT	<i>virB4</i> (+1077)
KanF- <i>Mlu</i> I	<u>ACG CGT</u> CAG GAA ACA GCT ATG ACC	plásmido pUC4K
KanR- <i>Eco</i> NI	<u>CCT CGA TAA GGC</u> TCG TGA AGA AGG TGT TG	plásmido pUC4K
Cebadores usados para la construcción de las cepas mutantes no polares Δ<i>virB</i>R, Δ<i>cgs</i>, Δ<i>bacA</i> y Δ<i>virB2</i> de <i>B. ovís</i> PA (los nucleótidos resaltados en negrita son secuencias complementarias a los oligos X-R Ovl)		
Nombre	Secuencia nucleotídica 5' -> 3'	Gen/plásmido diana (Posición desde ATG)
<i>vjbRMUT-F</i>	AGA AAG GCG AGC TTC GTT	<i>vjbR</i> (-942)
<i>vjbRMUT-R</i>	CAC GCT GAT TGT CGC AAA	<i>vjbR</i> (+1671)
<i>vjbR-F</i> Ovl	GTT CAT TTT CCG AAT TAC GGC ATT ATC GAT ATG CCC	<i>vjbR</i> (+768)
<i>vjbR-R</i> Ovl	GTA ATT CGG AAA ATG AAC	<i>vjbR</i> (+42)
<i>cgsMUT-F</i>	CGT GTG CTT TTG CTG GAT	<i>cgs</i> (-1000)
<i>cgsMUT-R</i>	CAC GAT CAG AAG ATT GCC	<i>cgs</i> (+9513)
<i>cgs-F</i> Ovl	ATG CCC GAA TTG TCT TCT GTA GAG CTT CCC AAA CAG	<i>cgs</i> (+8583)
<i>cgs-R</i> Ovl	AGA AGA CAA TTC GGG CAT	<i>cgs</i> (0)
<i>bacAMUT-F</i>	CTT TTC GAT GGG GTA TGG	<i>bacA</i> (-1001)
<i>bacAMUT-R</i>	TTT TGC CGT TAC GAG CCT	<i>bacA</i> (+2229)
<i>bacA-F</i> Ovl	GCG TCA TTT TTC CCC CGT GCA GCC ATT CAT GGC GAG	<i>bacA</i> (+1182)
<i>bacA-R</i> Ovl	ACG GGG GAA AAA TGA CGC	<i>bacA</i> (+5)
<i>virBMUT-F</i>	ACT GTT GCA CCT CAG ACT	<i>virB1</i> (+11)
<i>virB-R3</i>	GGT GCC CAG ATA TTC ATC	<i>virB4</i> (+666)
<i>virB2-F</i> Ovl	ATG AAA ACC GCT TCC CCC GCC GCC GAA ATT GCC TCT	<i>virB2</i> (+287)
<i>virB2-R</i> Ovl	GGG GGA AGC GGT TTT CAT	<i>virB2</i> (0)
Oligonucleótidos utilizados en secuenciación y reacciones de PCR de comprobación		
Nombre	Secuencia nucleotídica 5' -> 3'	Gen diana/plásmido (Posición desde ATG)
Universal - F	GTT TTC CCA GTC ACG AC	plásmido pGEM [®] -T Easy
Universal - R	CAG GAA ACA GCT ATG AC	plásmido pGEM [®] -T Easy
<i>virB2-F2</i>	CAC TAC CCA ATA ATG ACC	<i>virB1</i> (-115)
<i>virB2-R2</i>	TGA CAG ACC GGC GAA GTT	<i>virB4</i> (+1185)
<i>virB2-F3</i>	AAC TTT ACG GGC GGC TTC	<i>virB1</i> (+362)
<i>virB2-R3</i>	GGT GCC CAG ATA TTC ATC	<i>virB3</i> (+666)
<i>virB2-F4</i>	CGG ATT CTA CCT CAC CTA	<i>virB2</i> (+38)
<i>virB2-R4</i>	GAT GGC ACG GAA CAA GGT	<i>virB4</i> (+198)
<i>vjbR-F2</i>	AGA GGC ATC GAA CCG TTT	<i>vjbR</i> (-1038)
<i>vjbR-R2</i>	GAG GTG AAG GAT GAA TTG	<i>vjbR</i> (+1783)
<i>vjbR-F3</i>	TTG CAG CAC GCT TTT ACG	<i>vjbR</i> (-507)
<i>vjbR-R3</i>	GAA ACC ATC ATC GCG GAA	<i>vjbR</i> (+1254)
<i>vjbR-F4</i>	GCG CTT CTA ACC CGC ATC	<i>vjbR</i> (+101)
<i>cgs-F2</i>	TGC GCT GGA GCT TCT TGA	<i>cgs</i> (-1119)
<i>cgs-R2</i>	CTT GCC CTT CGA TTT CCA	<i>cgs</i> (+9656)
<i>cgs-F3</i>	TGA TTG CAA GCC GCC GTT	<i>cgs</i> (-586)
<i>cgs-R3</i>	AGC GAA GCT CGT TGA TGA	<i>cgs</i> (+9132)
<i>cgs-F4</i>	GTA AAA GTG GTT GCG GGT	<i>cgs</i> (+8470)
<i>bacA-F2</i>	TAT CTC GTA GGC GCG GTC	<i>bacA</i> (-1110)
<i>bacA-R2</i>	ATC TCC GCC ATA TTC AAC	<i>bacA</i> (+2327)
<i>bacA-F3</i>	GGC TTT GGC TAT GTC ATC	<i>bacA</i> (-626)
<i>bacA-R3</i>	GGC CGA TGC CTA TCG AAA	<i>bacA</i> (+1829)
<i>bacA-F4</i>	CTG ATC CCG TCG ATT GTC	<i>bacA</i> (+1023)

TABLA VI. Cebadores usados en la construcción de los plásmidos empleados para la complementación de las cepas mutantes $\Delta vjbR$, Δcgs y $\Delta virB2$ de *B. ovis* PA obtenidas en este estudio.

Cebadores utilizados para la construcción de los plásmidos empleados en la complementación de las cepas mutantes $\Delta vjbR$, Δcgs y $\Delta virB2$ de <i>B. ovis</i> PA		
Nombre	Secuencia nucleotídica 5' -> 3'	Gen diana/plásmido (Posición desde ATG)
<i>vjbR</i> -F comp	TTC GGG ACA ATG TGG AGT	<i>vjbR</i> (-305)
<i>vjbR</i> -R comp	CTG AAA CGC GTC TGA GCT	<i>vjbR</i> (+861)
<i>cgs</i> -F comp	TTT GCA TCC GTG ATC TCG	<i>cgs</i> (-291)
<i>cgs</i> -R comp	TCC ATA AAC AGA CAG GCC	<i>cgs</i> (+8952)
<i>virB2</i> -F comp	TCG CAC ACC ATA GAC GCA	<i>virB2</i> (-336)
<i>virB2</i> -R comp	GAT TCC TGT GGT GCC GTT	<i>virB2</i> (+336)

3.3 Plásmidos obtenidos.

A continuación se recogen en diversas Tablas, los plásmidos obtenidos en el presente trabajo. Todos ellos se encuentran además representados en los apartados en los cuales se detalla su construcción.

Tabla VII. Relación de plásmidos obtenidos con el fin de purificar PMEs recombinantes pertenecientes a la familia Omp25/Omp31.

Plásmidos obtenidos para la purificación de proteínas recombinantes de la familia Omp25/Omp31	
Nombre	Breve Descripción
pNV31b303	Región de <i>omp31b</i> correspondiente a la proteína madura (sin péptido señal) de <i>B. abortus</i> 544, amplificada mediante 31bMAT- <i>Bgl</i> II + 31bR2- <i>Sfu</i> I y clonada en pGEM [®] -T Easy en orientación inversa a <i>lacZ</i> . Amp ^r
pNV25b304	Región de <i>omp25b</i> correspondiente a la proteína madura (sin péptido señal) de <i>B. ovis</i> PA, amplificada mediante 25bcMAT- <i>Bam</i> HI + 25bR- <i>Sfu</i> I y clonada en pGEM [®] -T Easy en orientación inversa a <i>lacZ</i> . Amp ^r
pNV25c304	Región de <i>omp25c</i> correspondiente a la proteína madura (sin péptido señal) de <i>B. melitensis</i> 16M, amplificada mediante 25bcMAT- <i>Bam</i> HI + 25cR- <i>Sfu</i> I y clonada en pGEM [®] -T Easy en orientación inversa a <i>lacZ</i> . Amp ^r
pNV25d302	Región de <i>omp25d</i> correspondiente a la proteína madura (sin péptido señal) de <i>B. ovis</i> PA, amplificada mediante 25dMAT- <i>Bam</i> HI + 25dR- <i>Sfu</i> I y clonada en pGEM [®] -T Easy en orientación inversa a <i>lacZ</i> . Amp ^r
pNV22300	Región de <i>omp22</i> correspondiente a la proteína madura (sin péptido señal) de <i>B. ovis</i> PA, amplificada mediante 22MAT-F + 22R y clonada en pGEM [®] -T Easy en orientación directa a <i>lacZ</i> . Amp ^r
pNV31b304	Inserto <i>Bgl</i> II- <i>Sfu</i> I de pNV31b303 clonado en pTrcHis B digerido con las mismas enzimas. Amp ^r
pNV25b305	Inserto <i>Bam</i> HI- <i>Sfu</i> I de pNV25b304 clonado en pTrcHis A digerido con las mismas enzimas. Amp ^r
pNV25c306	Inserto <i>Bam</i> HI- <i>Sfu</i> I de pNV25c304 clonado en pTrcHis A digerido con las mismas enzimas. Amp ^r
pNV25d303	Inserto <i>Bam</i> HI- <i>Sfu</i> I de pNV25d302 clonado en pTrcHis A digerido con las mismas enzimas. Amp ^r
pNV22302	Inserto <i>Sph</i> I- <i>Sal</i> I de pNV22300 clonado en pUC19 digerido con las mismas enzimas. Amp ^r
pNV22303	Inserto <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III de pNV22302 clonado en pTrcHis A digerido con las mismas enzimas. Amp ^r

Tabla VIII. Listado de plásmidos construidos con la finalidad de inactivar los genes *omp25d* y *omp22* de *B. canis* RM6/66, *B. abortus* 2308 y *B. neotomae* 5K33.

Plásmidos construidos para la inactivación de los genes <i>omp25d</i> y <i>omp22</i>	
Nombre	Breve Descripción
pAM25d01	<i>omp25d</i> de <i>B. abortus</i> 2308 amplificado por PCR mediante <i>Omp25c-F</i> + <i>25cd-MUT R</i> y clonado en pGEM [®] -T Easy en orientación inversa a <i>lacZ</i> . Amp ^r
pAM25d02	pAM25d01 (digerido con <i>NdeI</i> + <i>ClaI</i> y tratado con Klenow) más inserto <i>BamHI</i> (Kan ^r) de pUC4K tratado con Klenow, clonado en dirección inversa al gen <i>omp25d</i> . Amp ^r y Kan ^r
pAM25d03	Inserto <i>SphI</i> + <i>SacI</i> de pAM25d02 (contiene $\Delta omp25d$) clonado en pCVD442 digerido con <i>SphI</i> + <i>SacI</i> . Amp ^r , Kan ^r y Sac ^s .
pAM2201	<i>omp22</i> de <i>B. abortus</i> 2308 amplificado por PCR mediante <i>22-MUT F</i> + <i>22-MUT R</i> y clonado en pGEM [®] -T Easy en orientación inversa a <i>lacZ</i> . Amp ^r
pAM2203	pAM2201 (digerido con <i>RsrII</i> + <i>StuI</i>) más inserto <i>RsrII</i> + <i>NaeI</i> (Kan ^r) de pAMKan01 en orientación inversa al gen <i>omp22</i> . Amp ^r y Kan ^r
pAM2204	Inserto <i>SphI</i> + <i>SacI</i> de pAM22d03 (contiene $\Delta omp22$) clonado en pCVD442 digerido con <i>SphI</i> + <i>SacI</i> . Amp ^r , Kan ^r y Sac ^s
pAMKan01	Gen que confiere resistencia a kanamicina amplificado de pUC4K por PCR mediante <i>KanF-NaeI</i> + <i>KanR-RsrII</i> y clonado en pGEM [®] -T en orientación inversa a <i>lacZ</i> . Amp ^r y Kan ^r

Tabla IX. Plásmidos construidos para la obtención de cepas mutantes de *B. ovis* PA en el operón *virB* y en los genes *vjbR*, *cgs*, *bacA* y *virB2*.

Plásmidos generados para la obtención de cepas mutantes de <i>B. ovis</i> PA en genes implicados en la virulencia de cepas lisas de <i>Brucella</i>	
Nombre	Breve Descripción
pNVvirPA01	Fragmento amplificado por PCR de <i>B. ovis</i> PA mediante <i>virBMUT-F</i> + <i>virBMUT-R</i> y clonado en pGEM [®] -T Easy en orientación inversa a <i>lacZ</i> . Amp ^r .
pNVvirPA02	Inserto <i>EcoRI</i> de pNVvirPA01 (contiene $\Delta virB2-3$) clonado en pGEM [®] -7Zf (digerido con <i>EcoRI</i>) en orientación inversa a <i>lacZ</i> . Amp ^r .
pNVvirPA03	Inserto <i>XbaI</i> + <i>SacI</i> de pNVvirPA02 (contiene $\Delta virB2-3$) clonado en pUC19 digerido con las mismas enzimas, en orientación directa a <i>lacZ</i> . Amp ^r .
pAMKan02	Gen que confiere resistencia a kanamicina amplificado de pUC4K por PCR mediante <i>KanF-MluI</i> + <i>KanR-EcoNI</i> y clonado en pGEM [®] -T en orientación inversa a <i>lacZ</i> . Amp ^r y Kan ^r
pNVvirPA04	pNVvirPA03 (digerido con <i>MluI</i> + <i>EcoNI</i>) más inserto <i>MluI</i> + <i>EcoNI</i> (Kan ^r) de pAMKan02 en orientación inversa a los genes <i>virB</i> . Amp ^r y Kan ^r
pNVvirPA05	Inserto <i>XbaI</i> + <i>SacI</i> de pNVvirPA04 (contiene $\Delta virB2-3$) clonado en pCVD442 digerido con <i>XbaI</i> + <i>SacI</i> . Amp ^r , Kan ^r y Sac ^s
pCVDKan-D	Plásmido pCVD442 digerido con <i>AspI</i> + <i>NdeI</i> para extraer el gen de resistencia a ampicilina, tratado con klenow e insertado en este sitio, el gen de resistencia a kanamicina procedente de la digestión del plásmido pUC4K con <i>HincII</i> . Amp ^s , Kan ^r y Sac ^s .
pNVvjbR01	$\Delta vjbR$ de <i>B. ovis</i> PA obtenido por PCR "de solapamiento" mediante <i>vjbRMUT-F</i> y <i>vjbR-R Ovl</i> + <i>vjbR-F Ovl</i> y <i>vjbRMUT-R</i> , clonado en pGEM [®] -T Easy en orientación inversa a <i>lacZ</i> . Amp ^r .
pNVvjbR03	Inserto <i>SphI</i> + <i>SalI</i> de pNVvjbR01 (contiene $\Delta vjbR$) clonado en pCVDKan-D digerido con las mismas enzimas. Kan ^r y Sac ^s .
pNVcgs01	Δcgs de <i>B. ovis</i> PA obtenido por PCR "de solapamiento" mediante <i>cgsMUT-F</i> y <i>cgs-R Ovl</i> + <i>cgs-R Ovl</i> y <i>cgsMUT-R</i> , clonado en pGEM [®] -T Easy en orientación inversa a <i>lacZ</i> . Amp ^r .
pNVcgs03	Inserto <i>SacI</i> + <i>SphI</i> de pNVcgs01 (contiene Δcgs) clonado en pCVDKan-D digerido con las mismas enzimas. Kan ^r y Sac ^s .
pNVbacA01	$\Delta bacA$ de <i>B. ovis</i> PA obtenido por PCR "de solapamiento" mediante <i>bacAMUT-F</i> y <i>bacA-R Ovl</i> + <i>bacA-R Ovl</i> y <i>bacAMUT-R</i> , clonado en pGEM [®] -T Easy en orientación inversa a <i>lacZ</i> . Amp ^r .
pNVbacA02	Inserto extraído de pNVbacA01 mediante digestión parcial con <i>EcoRI</i> que contiene $\Delta bacA$, clonado en pGEM [®] -7Zf (digerido con <i>EcoRI</i>) en orientación inversa a <i>lacZ</i> . Amp ^r .
pNVbacA03	Inserto <i>SacI</i> + <i>XbaI</i> de pNVbacA02 (contiene $\Delta bacA$) clonado en pCVDKan-D digerido con las mismas enzimas. Kan ^r y Sac ^s .
pNVvirB201	$\Delta virB2$ de <i>B. ovis</i> PA obtenido por PCR "de solapamiento" mediante <i>virBMUT-F</i> y <i>virB2-R Ovl</i> + <i>virB2-F Ovl</i> y <i>virB-R3</i> , clonado en pGEM [®] -T Easy en orientación inversa a <i>lacZ</i> . Amp ^r .
pNVvirB202	Inserto <i>EcoRI</i> de pNVvirB201 (contiene $\Delta virB2$) clonado en pGEM [®] -7Zf (digerido con <i>EcoRI</i>) en orientación directa a <i>lacZ</i> . Amp ^r .
pNVvirB203	Inserto <i>XbaI</i> + <i>SacI</i> de pNVvirB202 (contiene $\Delta virB2$) clonado en pCVDKan-D digerido con las mismas enzimas. Kan ^r y Sac ^s .

Tabla X. Listado de plásmidos generados para la complementación de las cepas mutantes $\Delta vjbR$, Δcgs y $\Delta virB2$ de *B. ovis* PA obtenidas en el presente trabajo.

Plásmidos construidos para la complementación de las cepas mutantes $\Delta vjbR$, Δcgs y $\Delta virB2$ de <i>B. ovis</i> PA	
Nombre	Breve Descripción
pNVvjbR01-COM	Fragmento amplificado por PCR de <i>B. ovis</i> PA mediante <i>vjbR</i> -F compl + <i>vjbR</i> -R compl y clonado en pGEM [®] -T Easy en orientación inversa a <i>lacZ</i> . Amp ^r .
pNVvjbR03-COM	Inserto <i>Apa</i> I + <i>Sac</i> I de pNVvjbR01 (contiene <i>vjbR</i>) clonado en pBBR1MSC2 (digerido con las mismas enzimas) en orientación directa a <i>lacZ</i> . Kan ^r .
pNVvjbR04-COM	Inserto <i>Kpn</i> I + <i>Sac</i> I de pNVvjbR03 (contiene <i>vjbR</i>) clonado en pBBR1MSC4 (digerido con las mismas enzimas) en orientación directa a <i>lacZ</i> . Amp ^r .
pNVcgs01-COM	Fragmento amplificado por PCR de <i>B. ovis</i> PA mediante <i>cgs</i> -F compl + <i>cgs</i> -R compl y clonado en pGEM [®] -T Easy en orientación directa a <i>lacZ</i> . Amp ^r .
pNVcgs02-COM	Inserto <i>Not</i> I de pNVcgs01 (contiene <i>cgs</i>) clonado en pBBR1MSC2 (digerido parcialmente con <i>Not</i> I) en orientación directa a <i>lacZ</i> . Kan ^r .
pNVvirB201-COM	Fragmento amplificado por PCR de <i>B. ovis</i> PA mediante <i>virB2</i> -F compl + <i>virB2</i> -R compl y clonado en pGEM [®] -T Easy en orientación inversa a <i>lacZ</i> . Amp ^r .
pNVvirB202-COM	Inserto <i>Apa</i> I + <i>Sac</i> I de pNVvirB201 (contiene <i>virB2</i>) clonado en pBBR1MSC2 (digerido con las mismas enzimas) en orientación directa a <i>lacZ</i> . Kan ^r .

3.4 Métodos de transformación en bacterias.

3.4.1 Transformación en *Escherichia coli*.

El proceso de transformación en *E. coli* se realizó siguiendo el método diseñado por Hanahan en 1983, basado en un choque térmico a células competentes obtenidas mediante tratamiento con CaCl₂ (método descrito por Cohen *et al.*, 1972). A la hora de llevarlo a cabo, se mezclaron, en primer lugar, las células competentes con el ADN plasmídico a introducir en la bacteria y se mantuvieron en hielo durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, las células se sometieron a un choque térmico en un baño termostático a 42 °C, durante 1 minuto, y se depositaron de nuevo en hielo 2 minutos. A continuación, se añadió 1 ml de LB y se incubaron durante 1 hora a 37 °C con el fin de permitir la expresión de los genes marcadores de resistencia a antibióticos que porta el plásmido introducido. Finalmente, la selección de los clones transformantes se realizó en placas de LB suplementadas con los antibióticos adecuados para cada caso e incubadas durante 24 horas a una temperatura de 37 °C.

3.4.2 Transformación en *Brucella* spp. por electroporación.

Este método de transformación bacteriana consiste en la administración de pulsos rápidos de una corriente eléctrica de gran voltaje con el fin de producir poros transitorios en la membrana plasmática para poder introducir ADN plasmídico en la célula. Para llevarlo a cabo, se recogió la biomasa crecida en placas de TSA-YE-HS incubadas a 37 °C durante 24 horas, en el caso de *B. canis*, *B. abortus* 2308 y *B. neotomae*, o 48 horas para *B. ovis*. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con agua estéril

(centrifugando en cada lavado a 2000 x *g*, 5 minutos) y se ajustaron a una D.O_{600 nm} adecuada, según cada cepa (ver Tabla XI). A continuación, se mezclaron 40 µl de células electro-competentes con 10 µl de solución de ADN plasmídico a introducir (preferiblemente, 3 µg de ADN). La mezcla se transfirió a una cubeta estéril de electroporación de 0,2 cm de separación entre los electrodos (*BIO RAD*) y se sometió a descarga eléctrica en el electroporador *Micropulser*TM de *BIO RAD* (Tabla XI). Seguidamente, las células se resuspendieron en 1 ml de medio líquido TSB-YE-HS, se pasaron a placas de 35 mm de diámetro para cultivo celular y se incubaron a 37 °C durante 6 horas (24 horas para *B. ovis*). Finalmente, los clones transformantes se seleccionaron en placas de TSA-YE-HS suplementadas con los antibióticos necesarios e incubadas durante 48-72 horas hasta visualizar colonias.

Tabla XI. Condiciones de electroporación utilizadas.

Cepa	D.O _{600 nm}	Pulsos (2.5 kV-5 ms)
<i>B. ovis</i>	10	1-2
<i>B. canis</i> RM6/66	10	2
<i>B. abortus</i> 2308	20	1-2
<i>B. neotomae</i> 5K33	20	2

3.5 Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*.

Para la extracción de ADN plasmídico procedente de *E. coli* con un alto grado de pureza, se empleó el *kit* "Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System" (Promega Corp.), siguiendo las instrucciones facilitadas por la casa comercial. Cuando fue necesaria la obtención de una gran cantidad de ADN plasmídico, se utilizaron las columnas de intercambio aniónico "Qiagen[®] Plasmid Midi Kit" y "Qiagen[®] Plasmid Maxi Kit" (Qiagen Inc.), aplicando una modificación al protocolo dado por el fabricante. Esta variación consistió en volver a precipitar el ADN obtenido tras la centrifugación con isopropanol. Para ello, se resuspendió el ADN en 400 µl de agua estéril y se mezcló con 45 µl de NaCl 3 M y dos volúmenes de etanol al 100 %. Posteriormente, se mantuvo 30 minutos a -20 °C y se centrifugó después 20 minutos a 16.000 x *g*. El residuo obtenido se lavó con etanol al 70 % (v/v), se dejó secar y finalmente, se resuspendió en agua estéril.

A la hora de analizar múltiples colonias resultantes de la transformación de *E. coli* con mezclas de ligaciones, se empleó el método de lisis alcalina (descrito por Birnboim and Doly, 1979), extrayendo el ADN con fenol-cloroformo-isoamílico y precipitándolo con etanol al 100 %. Este procedimiento permite conseguir ADN plasmídico con un grado de pureza suficiente para poder realizar reacciones de digestión de ADN con enzimas de restricción, siendo un método menos costoso que el anterior.

3.6 Extracción de ADN cromosómico de *Brucella* spp.

La obtención de ADN cromosómico de las diferentes especies de *Brucella* empleadas en este trabajo se realizó mediante el *kit* comercial "UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit" (MO BIO, Laboratories, Inc.), partiendo de una suspensión en agua estéril (ajustada a una D.O._{600 nm} de 4) de un cultivo en placa y siguiendo las instrucciones ofrecidas por el fabricante.

3.7 Técnicas generales de manipulación y análisis de ADN.

3.7.1 Reacciones enzimáticas.

Los diversos tratamientos enzimáticos a los que fue sometido el ADN se efectuaron teniendo en cuenta en cada caso, las recomendaciones hechas por las diferentes casas comerciales. Entre las diferentes reacciones enzimáticas realizadas en el presente trabajo se encuentran:

- [Digestión del ADN con endonucleasas de restricción](#). Estas reacciones se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones de temperatura y concentración de sales óptimas suministradas por los proveedores (Roche, New England Biolabs y Promega Corp.) y se emplearon de forma rutinaria para la caracterización física de los fragmentos de ADN, así como para la construcción de moléculas recombinantes.
- [Creación de extremos romos](#) a partir de extremos protuberantes creados en el ADN tras la digestión con ciertas enzimas de restricción. Para ello, se utilizó el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*, en presencia de dNTPs y siguiendo la metodología facilitada por el fabricante (Roche).
- [Ligación de moléculas de ADN](#) mediante el empleo de la ADN ligasa del fago T4 (Promega Corp.). Esta enzima cataliza la unión covalente de extremos cohesivos o romos de ADN mediante la formación de un enlace fosfodiéster entre los grupos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato libres.

3.7.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Esta técnica permite la amplificación de forma exponencial de ácidos nucleicos (Mullis *et al.*, 1986) y se ha utilizado en el presente trabajo con diferentes finalidades, las cuales se detallan en los Apartados correspondientes. Las diversas reacciones de PCR se llevaron a cabo siguiendo el protocolo general descrito por Sambrook and Russell en 2001. Cuando el fin de la PCR fue clonar el producto en un plásmido o su secuenciación, se empleó el *kit* "Expand™ Long Template PCR System" (Roche). Para ello, se prepararon reacciones en un volumen total de 50 µl que contenían ADN molde [plásmidico (entre 10-

50 ng), cromosómico (100 ng) o colonias aisladas de las diferentes especies de *Brucella* utilizadas resuspendidas en 10 μ l de agua estéril], 1 μ l de una preparación 100 μ M de cada uno de los dos cebadores a utilizar, 1,75 μ l de una mezcla 10 mM de los cuatro didesoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), 5 μ l de una solución 17,5 mM de $MgCl_2$ y 0,75 μ l de una mezcla de ADN polimerasas Taq y Pwo (3,5 unidades/ μ l). Cuando no fue necesario obtener productos de PCR con una alta fidelidad, se utilizó el *kit* "GoTaq[®] Green Master Mix" (Promega Corp.), el cual proporciona una mezcla de dNTPs, $MgCl_2$ y ADN polimerasa Taq en unas concentraciones óptimas para la amplificación del ADN. Además contiene dos colorantes (azul y amarillo) que permiten el análisis directo de las reacciones de PCR en geles de agarosa.

Las reacciones de PCR se efectuaron utilizando el termociclador My Cycler[™] (BIO RAD). La temperatura de anillamiento usada varió en función de los cebadores empleados (entre 58 – 60 °C), al igual que el número de ciclos (entre 30 – 35), con el fin de obtener una mayor eficiencia en la amplificación del producto.

3.7.3 Secuenciación de ADN.

El análisis de las secuencias nucleotídicas de moléculas de ADN fue llevada a cabo por el Servicio de Secuenciación Automática de ADN de la Universidad de Salamanca, por el Dr. Manuel Sánchez Hernández, mediante la utilización del secuenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). El procedimiento seguido se basa en el método de terminación de cadena diseñado por Sanger *et al.*, 1977, empleando un sistema de marcaje por fluorescencia. Cada reacción proporcionada para la secuenciación contenía entre 50 – 150 ng del ADN de interés, según se tratase de productos de PCR o de plásmidos, y 3 pmoles del oligonucleótido adecuado, en un volumen final de 8 μ l. El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas se realizó mediante los programas ABI PRISM Edit View y 4Peaks.

3.7.4 Electroforesis de ADN en gel de agarosa.

El análisis de moléculas de ADN obtenidas por tratamiento con endonucleasas de restricción, por reacciones de PCR o purificadas por otros diversos métodos se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Éstos se prepararon disolviendo por calentamiento la agarosa (Pronadisa) en TAE (Tris-acetato 40 mM, Ácido acético 20 mM y EDTA- Na^{2+} 1mM, pH 8) en una concentración al 0,8 % (p/v), y añadiendo posteriormente, una vez atemperada la solución, bromuro de etidio (1 μ g/ml). Para poder depositar correctamente las muestras a analizar en los pocillos del gel, éstas se mezclaron previamente con tampón de carga (Azul de bromofenol 0,1 % (p/v), Sacarosa 38 % (p/v) y EDTA- Na^{2+} 67 mM) que les proporciona una densidad adecuada. Las

electroforesis se realizaron a una corriente constante de entre 45 y 100 V. Los diferentes fragmentos de ADN se visualizaron por irradiación con luz ultravioleta de longitud de onda corta (~ 310 nm) en el transiluminador U.V. Gel Doc 2000 (BIO RAD) y se identificaron gracias al empleo de los marcadores de peso molecular III y VI de Roche y el marcador 1 kb DNA Ladder de Promega Corp.

3.7.5 Purificación de ADN a partir de gel de agarosa.

Para recuperar fragmentos de ADN de interés separados electroforéticamente en geles de agarosa, se empleó el *kit* comercial GeneClean[®] II (Q.BIOgene) siguiendo el procedimiento descrito por la casa comercial. Este método se basa en la unión específica y reversible del ADN a una resina de sílice en presencia de altas concentraciones de sal y permite extraer fragmentos de ADN de entre 200 pb y 20 kb.

3.7.6 Hibridación de ácidos nucleicos.

- Marcaje no radioactivo de sondas de ADN.

Este método permite obtener fragmentos de ADN marcados a lo largo de toda su extensión de una forma no radioactiva. Para ello, se empleó el *kit* "DIG DNA labeling" (Roche), que se basa en la hibridación al azar de hexanucleótidos con el ADN molde desnaturalizado y en la elongación posterior de la cadena de ADN mediante el empleo del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*. Esta reacción conlleva además, la incorporación de moléculas de digoxigenina (un hapteno esteroide) unidas covalentemente al nucleótido dUTP (DIG-11-dUTP), que sustituyen a nucleótidos dTTP. Gracias a este marcaje, se puede llevar a cabo una posterior inmunodetección con anticuerpos antidigoxigenina conjugados con la enzima fosfatasa alcalina. El procedimiento de marcaje y comprobación de la calidad de la sonda se realizó siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante.

- Blot de colonias.

Esta técnica permite determinar la presencia de secuencias específicas de ADN en colonias bacterianas crecidas en placas de cultivo, a través de la hibridación con sondas adecuadas de ADN. Para llevarla a cabo, las colonias a analizar se replicaron individualmente en placas con el medio de selección apropiado, siguiendo una plantilla numérica. Transcurrido el periodo de incubación necesario, las placas se cubrieron con una membrana de *nylon* de 82 mm de diámetro (Roche) durante 10 minutos a temperatura ambiente, con el fin de transferir las colonias. A continuación, se dio la vuelta a la membrana y se depositó sobre papeles de filtro empapados en diferentes

soluciones: en una solución de desnaturalización (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M) durante 5 minutos, en una solución de neutralización (NaCl 1,5 M, Tris-HCl 1 M, pH 7,4) durante 15 minutos y finalmente, en una solución 2xSSC (NaCl 0,3 M, Na-citrato 0,03 M, pH 7). Una vez seca la membrana, se fijó el ADN a ella mediante la exposición a luz ultravioleta durante 3 minutos. Posteriormente, se llevó a cabo una prehibridación a 68 °C durante 1 hora para bloquear zonas reactivas inespecíficas de la membrana, seguida de la hibridación con la sonda de ADN deseada marcada con digoxigenina a la misma temperatura y en agitación constante durante toda la noche. Las etapas de prehibridación, hibridación y detección de la hibridación de la sonda con los ácidos nucleicos problema se realizaron siguiendo las instrucciones y utilizando los reactivos del *kit* "DIG Nucleic Acid Detection" de Roche. Éste se basa en la fijación a la sonda de anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina. Esta enzima cataliza una reacción colorimétrica que emplea 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) y nitroazul de tetrazolio (NBT) y que da como resultado, la formación de un precipitado de color violeta que permite visualizar aquellos fragmentos de ADN que han hibridado con la sonda.

- Southern Blot.

En primer lugar, se extrajo el ADN cromosómico procedente de aquellas cepas silvestres o mutantes sometidas al estudio mediante el método descrito en el Apartado 3.6. Posteriormente, este ADN se digirió con la enzima de restricción *Hind*III y se sometió a migración electroforética en gel de agarosa junto con los marcadores moleculares III y VI de Roche (Apartados 3.7.1 y 3.7.4, respectivamente). Una vez separados los fragmentos de ADN, éstos fueron transferidos a una membrana de *nylon* por capilaridad empleando una solución NaOH 0,4 M, y posteriormente, fueron fijados a ella mediante exposición a luz ultravioleta durante 3 minutos. A continuación, se llevaron a cabo las etapas de prehibridación, hibridación y detección de la hibridación tal y como se describe en el Apartado anterior. La identificación de los fragmentos de ADN detectados se realizó mediante comparación con el tamaño de las bandas obtenidas en los carriles que portaban los marcadores moleculares hibridados con una sonda constituida por una mezcla de ambos marcados con digoxigenina.

3.8 Técnicas inmunológicas.

3.8.1 SDS-PAGE.

- Preparación de las muestras a analizar.

Las muestras que fueron objeto de estudio se prepararon procedentes de cultivo en placa, en el caso del análisis de cepas de *Brucella*, y de cultivo líquido, en el caso de

la bacteria *E. coli*. Para ello, se recogieron las células en agua estéril y se inactivaron durante 1 hora a 65 °C (únicamente para *Brucella* spp). Posteriormente, se efectuaron dos lavados con agua estéril de 5 minutos a 8.000 x *g* y se ajustó la D.O_{600 nm} (en agua) a 20 para las cepas de *Brucella* y a 6 en el caso de *E. coli*. Finalmente, las muestras se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

- SDS-PAGE

La electroforesis en gel desnaturante de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) se realizó siguiendo el método descrito por Laemmli en 1970, empleando geles contiguos de concentración y separación de proteínas, con un 4,5 % y un 14 % de acrilamida (*BIO RAD*), respectivamente. Gracias a este sistema, se consigue obtener una mejor resolución de las bandas de proteína en el gel separador de acuerdo a su tamaño molecular. Como catalizadores de la polimerización de los geles, se utilizó el persulfato amónico (SIGMA-ALDRICH) y el TEMED (*BIO RAD*).

Las muestras a analizar, preparadas como se ha indicado anteriormente, se diluyeron 1:2 en tampón de carga de Laemmli. El marcador de peso molecular empleado fue "SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Low Range" de *BIO RAD* (que comprende un rango de tamaños desde 14,4 y 97,4 kDa) diluido 1:20 en tampón de carga de Laemmli. Todas las diluciones, antes de ser sometidas a la electroforesis, se hirvieron durante 10 minutos. En geles de mayor tamaño, el volumen de muestra depositado en cada pocillo fue de 20 µl. En el caso de geles de menor tamaño, se cargaron 5 µl de marcador de peso molecular y 10 µl de cada muestra.

Para realizar la electroforesis, dependiendo de los tamaños de los geles, se emplearon las cubetas de *BIO RAD* "Protean® II xi Cell" (geles de 16 x 20 cm, con un grosor de 0,75 mm) y "Mini-PROTEAN® 3 Cell" (geles 8 x 7,3cm y 0,75 mm de espesor), usando una intensidad de corriente constante de 20 mA/gel para el primero, y 100 V/gel para el segundo. Cada litro del tampón de electroforesis usado estaba compuesto por 3,03 g de Tris-HCl (SIGMA-ALDRICH), 14,4 g de Glicina (SIGMA-ALDRICH) y 1 gramo de SDS (*BIO RAD*).

Una vez concluida la electroforesis, los geles se mantuvieron en una solución de fijación (Isopropanol 25 % (v/v) y Ácido acético 7 % (v/v), ambos de Panreac) durante 30 minutos y posteriormente, se tiñeron con Azul brillante Coomassie R-250 (*BIO RAD*) al 0,01 % (p/v) en Metanol 45 % (v/v) (Panreac) y Ácido acético 10 % (v/v) (Panreac), dejándolos toda la noche en agitación. Con el fin de salvaguardarlos en el tiempo, los geles se sumergieron en glicerol al 5 % durante 1 hora y después, se desecaron a 80 °C durante 45 minutos, en el secador de geles Model 583 (*BIO RAD*).

3.8.2 Western Blot.

Recibe el nombre de Western Blot el proceso de transferir proteínas desde un gel de poliacrilamida a un soporte sólido (Burnette *et al.*, 1981, Towbin *et al.*, 1992). Para llevarlo a cabo, una vez separadas las proteínas mediante la técnica SDS-PAGE (descrita en el Apartado 3.8.1), los geles se equilibraron en tampón de transferencia (5,81 g Tris-HCl (SIGMA-ALDRICH), 2,93 g Glicina (SIGMA-ALDRICH), 0,375 g SDS (BIO RAD) y 200 ml Metanol (Panreac) para 1 litro) durante 10 minutos. Posteriormente, se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa de 0,45 μm (BIO RAD) empleando el equipo "TE 70 PWR Semi-Dry Transfer Unit" de Amersham Biosciences, a una intensidad de corriente constante de 150 mA, durante 1 hora y 15 minutos. Con la finalidad de verificar la calidad de la transferencia, las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau (SIGMA-ALDRICH) al 0,1 % (p/v) en Ácido acético al 5 % (v/v) (Panreac) durante 10 en agitación, seguido de lavados con agua.

Para llevar a cabo la detección inmunológica de las proteínas inmovilizadas en las membranas, en primer lugar éstas se incubaron en una solución de saturación, compuesta por leche descremada en polvo (OXOID) al 1 % en TBS (Tris-HCl 20 mM (SIGMA-ALDRICH) y NaCl 500 mM (Panreac) a pH 7,5), durante 30 minutos, para bloquear los sitios activos de las membranas no ocupados por proteínas. Seguidamente, las membranas se mantuvieron expuestas durante toda la noche en agitación a los anticuerpos policlonales (AcPs) o monoclonales adecuados (AcMs), diluidos en el tampón de dilución (solución de saturación diluida 1/3 en TBS). Las diluciones empleadas fueron 1/5 para AcMs de ratón procedentes de sobrenadantes de cultivo de hibridomas (Tabla XII), 1/6000 para los AcMs procedentes de líquido ascítico (Tabla XII) y de 1/500 a 1/10 para los AcPs.

Posteriormente, tras realizar tres lavados de 5 minutos de duración con Tween 20 al 0,5 % (v/v) (Merck) en TBS, las membranas se incubaron 1 hora con anticuerpos secundarios de la clase IgG conjugados con peroxidasa, diluidos 1/500 en el tampón de dilución. Una vez transcurrido el periodo de incubación, las membranas se sometieron a 3 lavados de 5 minutos con TBS y finalmente, se revelaron con 4-cloro-1naftol al 0,05 % (SIGMA-ALDRICH) y H_2O_2 al 30 % (SIGMA-ALDRICH) en TBS, parando la reacción inmunológica con lavados con agua cuando se estimó oportuno. Todas las incubaciones realizadas a lo largo del proceso se realizaron a temperatura ambiente y con agitación constante.

3.8.3 Anticuerpos monoclonales utilizados.

En la Tabla XII se recogen todos los anticuerpos monoclonales utilizados en los diferentes Western Blot realizados en el presente trabajo.

Tabla XII. Anticuerpos monoclonales empleados en Western Blot en el presente trabajo.

Nombre	Abreviatura ^a	Especificidad	Origen	Referencia
A59/05F01/C09	AcM-C09	Anti-Omp25	Líquido ascítico	Cloeckaert <i>et al.</i> , 1990
A59/10F09/G10	AcM-G10	Anti-Omp31 <i>B. melitensis</i>	Sobrenadante de cultivo de hibridomas	Cloeckaert <i>et al.</i> , 1990
A01/08H06/G02	AcM-G02	Anti-Omp31 <i>B. ovis</i>	Sobrenadante de cultivo de hibridomas	Cloeckaert <i>et al.</i> , 1990 Vizcaíno <i>et al.</i> , 2001b

^a En el texto se utilizarán las abreviaturas de los AcMs mostradas en la Tabla.

3.8.4 Detección de citoquinas.

La cuantificación de la producción de citoquinas por macrófagos murinos J774.A1 después de ser infectados con *Brucella* spp., se llevó a cabo mediante inmunoensayos enzimáticos en sándwich comerciales (Sándwich-ELISA). Para ello, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos celulares a diferentes tiempos tras el periodo de infección con las diferentes cepas silvestres o mutantes (Apartado 8.4) y se conservaron a -80 °C hasta su utilización. Los *kits* empleados fueron "Mouse TNF α BD OptEIA ELISA Set II" y "Mouse IL12 BD OptEIA ELISA Set" (BD Biosciences Pharmingen) para el análisis del TNF α y de la IL12, respectivamente. Cada uno de ellos se llevó a cabo siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante.

4. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA EXTERNA DE LA FAMILIA Omp25/Omp31.

4.1 Genes de la familia *omp25/omp31* empleados.

Los genes de la familia *omp25/omp31* que se han utilizado en la obtención de anticuerpos policlonales se recogen en la Tabla XIII.

TABLA XIII. Identificación de los genes *omp25/omp31* empleados en la obtención de anticuerpos policlonales.

Gen de la familia <i>omp25/omp31</i>	Especie usada	Identificación / número de acceso al GenBank	Referencia	Identificación en el genoma completo de <i>B. suis</i> 1330 (Paulsen <i>et al.</i> , 2002)
<i>omp31b</i>	<i>B. abortus</i>	AY484528.1	Vizcaíno <i>et al.</i> , 2004	BRI 1622
<i>omp25b</i>	<i>B. melitensis</i>	BMI 1007	Del Vecchio <i>et al.</i> , 2002	BRI 0971
<i>omp25c</i>	<i>B. ovis</i>	AY484547.1	Vizcaíno <i>et al.</i> , 2004	BRI 0119
<i>omp25d</i>	<i>B. ovis</i>	AY484555.1	Vizcaíno <i>et al.</i> , 2004	BRI 0118
<i>omp22</i>	<i>B. ovis</i>	AY484563.1	Vizcaíno <i>et al.</i> , 2004	BRI 1284

4.2 Construcción de los plásmidos portadores de los genes codificadores de las proteínas recombinantes.

Las distintas etapas de este proceso se encuentran representadas en las Figura 9A y 9B. Así, en primer lugar se amplificaron mediante PCR las regiones correspondientes a las proteínas maduras (sin la secuencia codificante del péptido señal) de la familia Omp25/Omp31. Para ello se empleó como ADN molde: el de *B. ovis* PA para la amplificación de los genes *omp25c* (con los cebadores 25bcMAT-BamHI + 25cR-SfuI), *omp25d* (con 25dMAT-BamHI + 25dR-SfuI) y *omp22* (con 22MAT-F + 22R); el de *B. abortus* 544 para *omp31b* (con 31bMAT-BgII + 31bR2-SfuI) y el de *B. melitensis* 16M para *omp25b* (con 25bcMAT-BamHI + 25bR-SfuI). Los cebadores, detallados en la Tabla III, se diseñaron de manera que los productos de PCR obtenidos tuviesen, en el extremo 3' terminal, un sitio de corte para la enzima de restricción *SfuI* y en el extremo 5', uno para *BamHI* o *BgII*, con el fin de facilitar su posterior clonación en el vector de expresión.

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR fueron clonados, en primer lugar, en el vector pGEM-T[®] Easy, y posteriormente, en los vectores de expresión pTrcHisA o pTrcHisB mediante digestión con la pareja de enzimas *BamHI/SfuI* o *BgII/SfuI*, según el caso. De esta manera, las secuencias amplificadas correspondientes a las regiones maduras de las proteínas quedaron en fase con el codón de iniciación de la traducción que portan estos vectores de expresión (Figura 9A).

En el caso de la obtención de la proteína recombinante Omp22 se lograron mayores niveles de producción empleando una estrategia diferente. En primer lugar se clonó la región madura de la proteína Omp22 amplificada por PCR con los cebadores 22MAT-F + 22R (Tabla III) en el vector pGEM[®]-T Easy en orientación directa a *lacZ*. A continuación, se digirió el plásmido obtenido con *SphI* y *SaI* y el fragmento codificante se ligó al vector pUC19, digerido también con las mismas enzimas de restricción. Finalmente, mediante *HindIII* y *BamHI*, la secuencia amplificada fue insertada en el vector pTrcHisA (Figura 9B).

Todos los plásmidos obtenidos para la purificación de proteínas recombinantes de la familia Omp25/Omp31 se recogen en la Tabla VII del Apartado 3.3. Las construcciones se verificaron mediante secuenciación de los plásmidos finales resultantes, empleando los oligonucleótidos His-F e His-R (Tabla III).

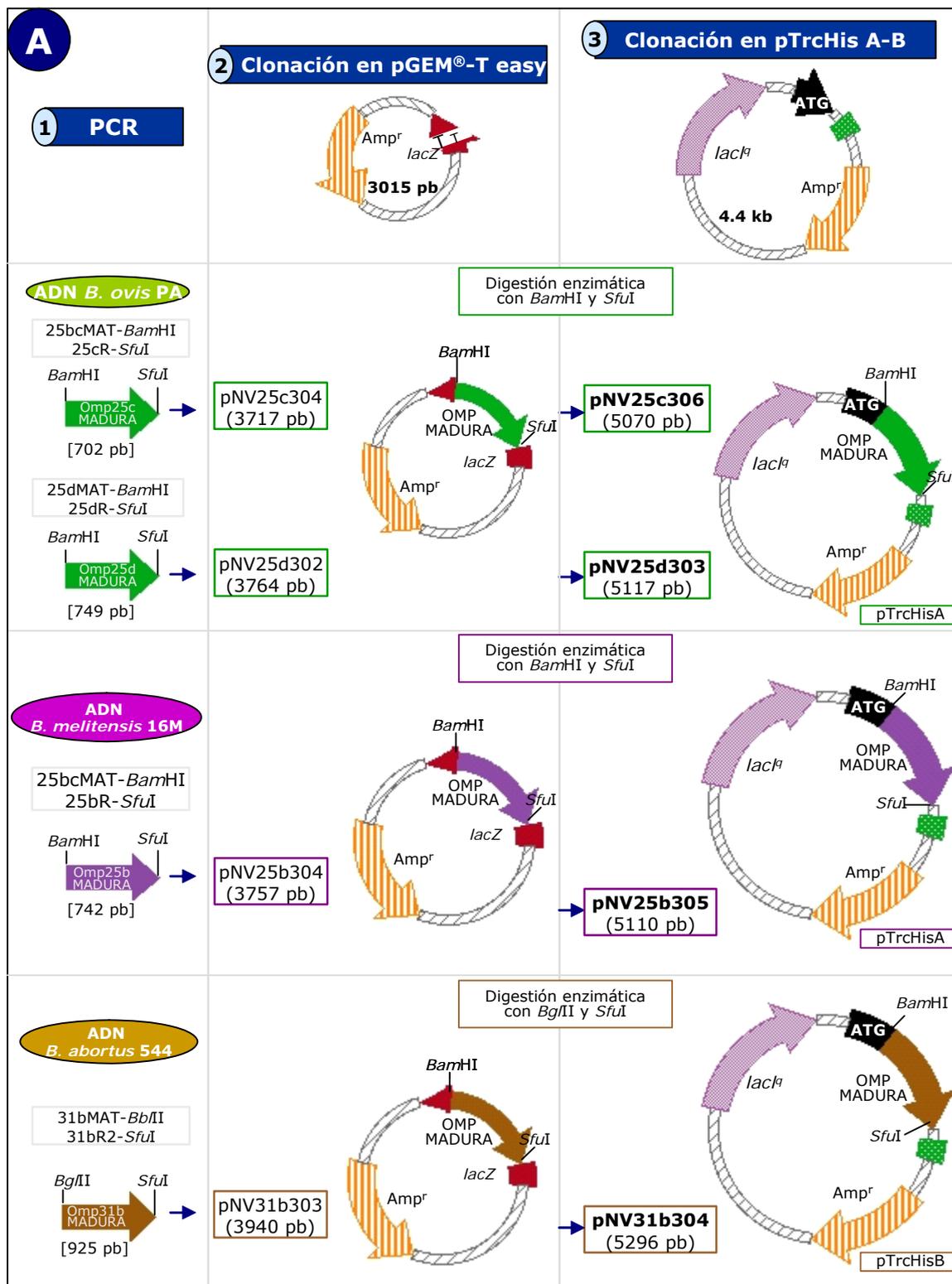


Figura 9. A. Pasos seguidos en la construcción de los plásmidos recombinantes utilizados para la purificación de las PMEs de la familia Omp25/Omp31. En primer lugar se llevaron a cabo reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos indicados con el fin de amplificar la región madura de cada PMEs de interés en cada una de las cepas de *Brucella* señaladas. Posteriormente, los productos de PCR se clonaron en el vector pGEMT®-easy en orientación inversa a *lacZ*. Finalmente, de los plásmidos resultantes se extrajeron los insertos de ADN empleando las enzimas de restricción necesarias para que posteriormente, el marco de lectura de cada gen *omp* amplificado quedara en fase con el codón de iniciación de la traducción que portan los vectores de expresión pTrcHisA y pTrcHisB.

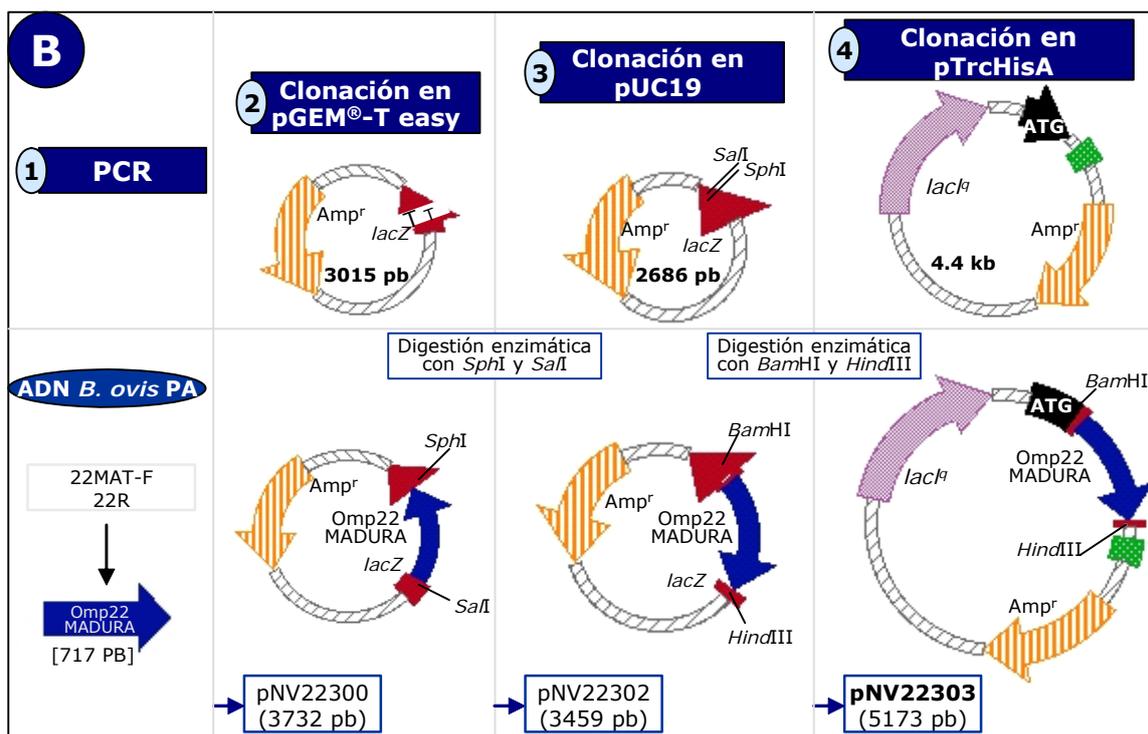


Figura 9 (Continuación). B. Estrategia seguida para la construcción del plásmido pNV22303 utilizado en la purificación de la PME Omp22 de *B. ovís* PA. Inicialmente, el producto de PCR amplificado con los cebadores 22MAT-F y 22R se clonó en orientación directa a *lacZ* en el vector pGEMT®-easy. A continuación, se extrajo el inserto de ADN mediante *Sph*I y *Sa*I y se insertó en el plásmido pUC19 digerido con las mismas enzimas de restricción. Finalmente, del plásmido recombinante resultante (pNV22302), mediante *Hind*III y *Bam*HI, se clonó la secuencia amplificada en pTrcHisA. De esta forma, el gen *omp22* quedó en fase con el codón de inicio de la traducción que porta este vector de expresión.

4.3 Inducción de la expresión de los genes recombinantes en *E. coli*.

Los vectores de expresión que contenían los genes recombinantes se introdujeron en las cepas de *E. coli* JM109 y BL21 (DE3) mediante transformación. Posteriormente, partiendo de las colonias aisladas obtenidas, se realizaron precultivos en 10 ml de medio LB suplementado con ampicilina (50 μ g/ml) y se incubaron durante toda la noche en agitación (200 rpm) a una temperatura de 37 $^{\circ}$ C. Pasado este tiempo, se midieron las D.O._{600 nm} de los precultivos y a partir de éstos, se inocularon cultivos de 50 ml (LB-ampicilina) con el volumen necesario para obtener una D.O._{600 nm} inicial de 0,05. Transcurridas dos horas de incubación a 37 $^{\circ}$ C, se añadió IPTG al cultivo a una concentración final de 1 mM para inducir la expresión, y se continuó la incubación durante 6 horas más. Finalmente, las células se recogieron por centrifugación durante 10 minutos a 10.000 \times g y el sedimento obtenido, se guardó a -20 $^{\circ}$ C hasta su utilización para la purificación de las proteínas recombinantes.

Con el fin de verificar la correcta inducción de la expresión de las proteínas recombinantes durante el proceso, se analizó (mediante SDS-PAGE y tinción con Azul brillante Coomassie R-250) parte de la masa celular obtenida una vez transcurrido el

periodo de incubación. Para ello, una alícuota del cultivo se ajustó a D.O._{600 nm} de 6 en agua estéril y se conservó a -20 °C hasta su uso. La cepa de *E. coli* BL21 (DE3) fue la que mayores niveles de síntesis presentó, excepto para las proteínas recombinantes Omp31 y Omp25d, las cuales se purificaron empleando la cepa de *E. coli* JM109.

4.4 Obtención de los extractos celulares.

Las células de *E. coli* recogidas tras la inducción con IPTG se resuspendieron en 10 ml del tampón de lisis a pH 7,8 del *kit* "ProBond™ Purification System" (Invitrogen Corp.). A continuación, los homogenizados se agitaron suavemente durante 10 minutos con el fin de romper las paredes celulares y se sonicaron en hielo, aplicándoles 3 pulsos de 5 segundos de duración cada uno de ellos mediante el aparato Sonic Dismembrator (DYNATECH) a una potencia de carga de 60 %. Para eliminar los restos celulares, se realizó una centrifugación a 3000 x *g* durante 15 minutos y el lisado obtenido (sobrenadante) se guardó a -20 °C hasta su uso.

4.5 Purificación de las proteínas recombinantes.

La purificación de las proteínas recombinantes de la familia Omp25/Omp31 que se sintetizaron en *E. coli* como proteínas de fusión con 6 residuos de histidina en el extremo N-terminal (ver Apartado 3.1), se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes, empleando el *kit* "ProBond™ Purification System" (Invitrogen Corp.). Este sistema consiste en una cromatografía de afinidad basada en la interacción de la cola de fusión de histidinas con los iones Ni²⁺ de la resina proporcionada. Para llevar a cabo la purificación, en primer lugar, se pre-equilibró la resina de Ni²⁺ contenida en las columnas tal y como indica el fabricante en el protocolo facilitado. Posteriormente, ésta se mezcló con el extracto celular obtenido como se describe en el Apartado anterior, y se dejó en agitación suave durante 10-20 minutos. Transcurrido este tiempo, para eliminar las proteínas unidas inespecíficamente, la resina fue sometida a diferentes lavados con tampones que poseen un pH decreciente. Finalmente, las proteínas recombinantes fueron extraídas de las matrices empleando el tampón de elución, con un pH de 4. Las fracciones recogidas, de 1 ml cada una de ellas, se dializaron en agua usando una membrana semipermeable (con un límite inferior de retención de aproximadamente 12.000 kDa) (SIGMA-ALDRICH) con el fin de eliminar los solutos de bajo peso molecular contenidos en el tampón de elución. Las proteínas recombinantes obtenidas en las fracciones dializadas se conservaron a -20 °C hasta su empleo.

4.6 Cuantificación de las proteínas recombinantes obtenidas.

Las fracciones proteicas dializadas obtenidas se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con Azul brillante Coomassie R-250 para verificar la correcta extracción de las proteínas recombinantes. Para determinar la cantidad obtenida, se utilizó el método descrito por Bradford en 1976, que se basa en la afinidad que poseen las proteínas por el Azul Brillante Coomassie. A la hora de llevarlo cabo, se empleó el *kit* "Bio-Rad Protein Assay" (BIO RAD).

4.7 Inmunización de conejos y obtención de anticuerpos frente a las PMEs de la familia Omp25/Omp31.

Para la obtención de anticuerpos frente a las proteínas recombinantes de la familia Omp25/Omp31 purificadas, se emplearon conejos hembra de la raza albina Neozelandesa de 2,5 kg de peso, mantenidos en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca. Tras 8 - 10 días de adaptación en el animalario desde su llegada, los conejos fueron sometidos a 3 inyecciones subcutáneas a intervalos semanales. La cantidad de cada proteína inyectada fue de 50 µg, sonicada durante 5 segundos 3 veces a una potencia de carga de 60 %, e inyectada en una emulsión preparada con adyuvante completo de Freund (SIGMA-ALDRICH) para la primera inmunización, y en el incompleto, para la segunda y tercera.

Pasada una semana tras la última inmunización, la sangre fue extraída de cada conejo mediante punción cardíaca y se mantuvo a temperatura ambiente durante las 3 primeras horas tras la extracción, y después, a 4 °C durante las siguientes 18 horas. Transcurrido este periodo de tiempo, cada muestra de sangre se centrifugó dos veces a 800 x *g* durante 4 minutos. El suero obtenido se almacenó a -20 °C hasta su uso.

4.8 Adsorción de los sueros de conejo obtenidos.

Cuando se consideró necesario, cada suero obtenido se adsorbió con la PME recombinante purificada utilizada para la generación de AcPs en conejo. Para ello, aproximadamente 10 µg de cada PME recombinante purificada (2µg/carril) se sometieron a una electroferesis en gel SDS-PAGE (Apartado 3.8.1) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Apartado 3.8.2). Posteriormente, tras teñir las membranas con Rojo Ponceau (Apartado 3.8.2), se recortó la zona donde se hallaban las bandas proteicas correspondientes a la PME recombinante purificada y se saturó incubándola durante 30 minutos en una solución de leche descremada en polvo al 1 % en TBS. Seguidamente, la membrana se incubó durante toda la noche con 3 ml del suero de

conejo obtenido frente a la PME, diluido 1/200 en la solución de saturación diluida 1/3 en TBS. Paralelamente, el suero también se incubó con una tira equivalente de membrana de nitrocelulosa que no contenía la PME recombinante purificada, como un control negativo del proceso. Transcurrido el periodo de incubación, se recuperó el suero y la membrana se chequeó mediante Western Blot para comprobar que se había producido la unión de los anticuerpos policlonales específicos frente a la PME. Este procedimiento se repitió las veces necesarias hasta que se comprobó que se habían retirado todos los AcPs del suero.

5. GENERACIÓN DE CEPAS MUTANTES EN *Brucella* spp.

5.1 Obtención de cepas mutantes en los genes *omp25d* y *omp22* en las cepas *B. canis* RM6/66, *B. abortus* 2308 y *B. neotomae* 5K33.

La estrategia seguida a la hora de obtener estas cepas mutantes fue la de reemplazar, a través de procesos de recombinación homóloga, el gen de interés silvestre por otro inactivado mediante inserción del gen que confiere resistencia a kanamicina.

5.1.1 Construcción de los plásmidos recombinantes portadores de los genes *omp25d* y *omp22* inactivados.

Con el fin de inactivar los genes *omp25d* y *omp22*, se construyeron los plásmidos pAM25d03 y pAM2204. Para ello, a partir de ADN cromosómico de la cepa *B. abortus* 2308, se amplificaron ambos genes mediante PCR, junto con una región adyacente de aproximadamente 1000 pb a ambos lados de cada uno de ellos. Los cebadores que se utilizaron para la amplificación del gen *omp25d* fueron Omp25c-F + 25cd-MUT R (Tabla IV), mientras que para la del gen *omp22* fueron 22-MUT F + 22-MUT R (Tabla IV). Todos ellos se diseñaron tomando como base las secuencias del genoma completo de *B. abortus* 2308 (Chain *et al.*, 2005).

Los fragmentos amplificados, de 2721 pb para *omp25d* y 2075 pb para *omp22*, fueron clonados en el vector pGEM-T® Easy, seleccionando, mediante extracción plasmídica y digestiones adecuadas con enzimas de restricción, aquellos clones que presentaban el inserto en orientación inversa al gen *lacZ* (Figura 10A y 10B).

A continuación, se procedió a inactivar el gen *omp25d* mediante la digestión del plásmido obtenido (pAM25d01) con las enzimas de restricción *Nde*I y *Cla*I. Paralelamente, se extrajo del plásmido pUC4K un fragmento Kan^r de 1264 pb empleando *Bam*HI, y se ligó al plásmido portador del gen deleciónado después de haber efectuado a ambos un tratamiento con la enzima Klenow y dNTPs para generar extremos romos. Tras

obtener diversas colonias transformantes (kanamicina resistentes), se seleccionó a través de diversas digestiones enzimáticas, aquella que presentaba el inserto Kan^r ligado en orientación inversa al gen *omp25d* (Figura 10A).

En el caso de la inactivación del gen *omp22*, siguiendo la anterior estrategia, no se obtuvo ningún clon que portara el inserto Kan^r en orientación inversa al gen. Debido a esto, se decidió amplificar mediante PCR el fragmento Kan^r utilizando los cebadores KanF-*NaeI* y KanR-*RsrII* (Tabla IV), que añadían en los extremos sitios de restricción adecuados para realizar después una ligación dirigida. Así, tras clonar el fragmento Kan^r en el vector pGEM-T[®] (Figura 10B), se extrajo de él mediante digestión con *RsrII* y *NaeI* y se clonó en el plásmido pAM2201 (digerido a su vez con *RsrII* y *StuI*) en orientación opuesta al gen *omp22* delecionado (Figura 10B).

Todas estas construcciones se verificaron mediante secuenciación de los plásmidos pAM25d02 y pAM2203, empleando los cebadores universales señalados en la Tabla IV.

En último lugar, con el fin de aumentar la eficiencia de obtención de cepas mutantes por recombinación homóloga, se empleó un tercer marcador de selección: el gen *sacB* que confiere sensibilidad a la sacarosa. Para ello, se extrajeron los fragmentos que portaban $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ de los plásmidos pAM25d02 y pAM2203 mediante digestión enzimática con *SphI* y *SacI*, y se clonaron en el plásmido pCVD442, digerido también con las mismas enzimas de restricción (Figura 10A y 10B). Por tanto, los plásmidos resultantes (pAM25d03 y pAM2204), además de contener los genes *omp25d* y *omp22* inactivados, confieren a la célula transformante, resistencia a ampicilina y a kanamicina y sensibilidad a la sacarosa.

Todos los plásmidos obtenidos para la obtención de esta colección de cepas mutantes se recogen en la Tabla VIII del Apartado 3.3.

5.1.2 Sustitución de los genes silvestres *omp25d* y *omp22* por los genes inactivados en las distintas cepas de *Brucella*.

Una vez obtenidos los plásmidos recombinantes que contenían los genes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$, se procedió a introducirlos por electroporación (Apartado 3.4.2) en las distintas cepas de *Brucella* para que, por un mecanismo de doble recombinación homóloga entre el cromosoma de la bacteria y el ADN de cada plásmido recombinante, se produjese la sustitución de *omp25d* y/o *omp22* por los correspondientes genes inactivados.

En la Figura 11 se detallan los distintos procesos de recombinación homóloga que pueden tener lugar dentro de la bacteria una vez introducido el plásmido recombinante. Lo más común es que suceda un entrecruzamiento simple entre la secuencia cromosómica y el plásmido a través de una de las dos regiones de ADN flanqueantes al

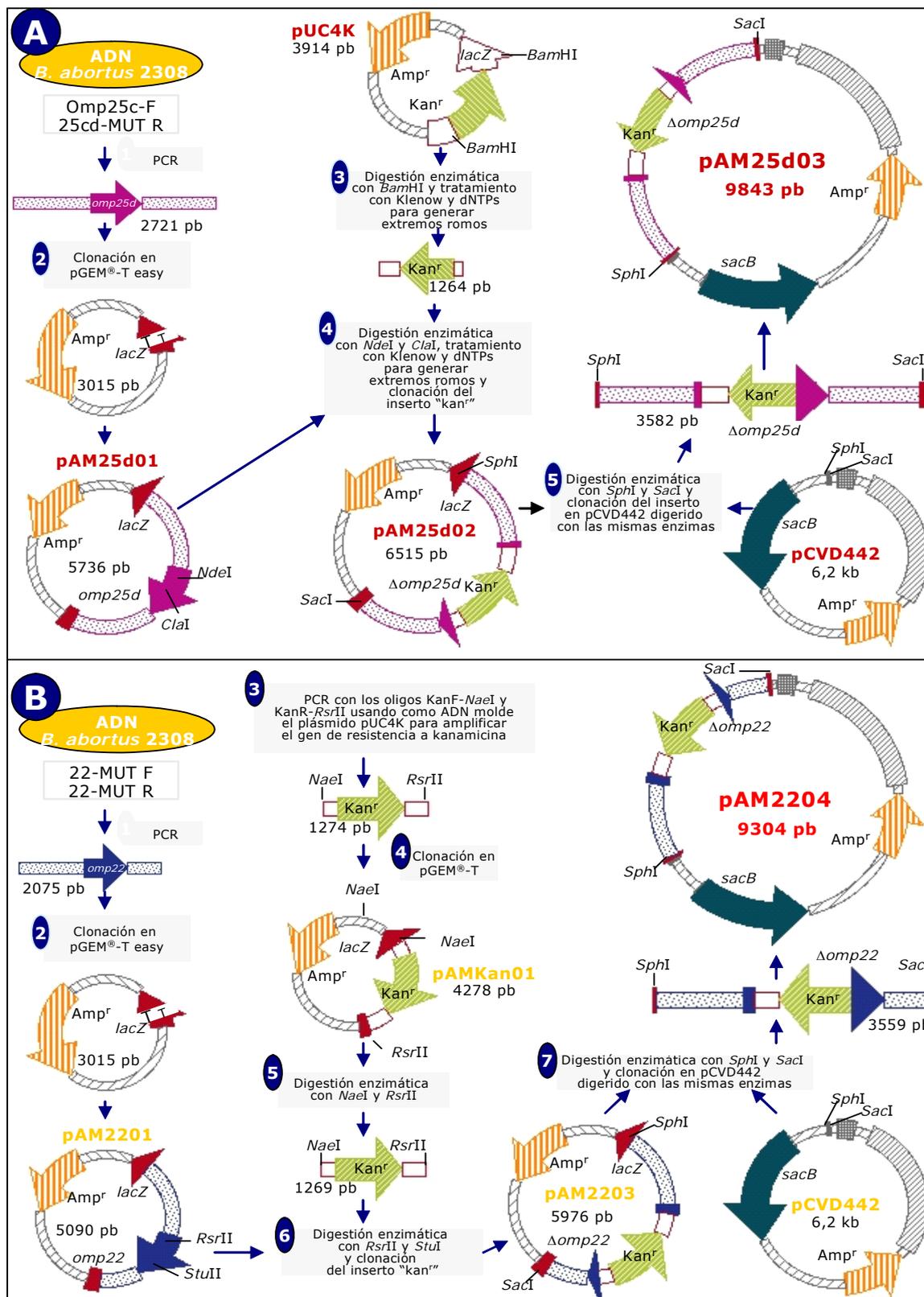


Figura 10. Estrategias utilizadas para la construcción de los plásmidos pAM25d03 (A) y pAM2204 (B) que portan, respectivamente, los genes *omp25d* y *omp22* de *B. abortus* 2308 deletados. Los genes se inactivaron por sustitución de la mayor parte de los mismos por un "cassette *Kan^r*" en orientación inversa. Adicionalmente, ambos plásmidos recombinantes portan el gen *sacB* y un gen de resistencia a ampicilina. Se muestran las enzimas de restricción con sus puntos de corte y los cebadores utilizados en este proceso.

gen, dando como resultado, la integración del plásmido en el cromosoma. De esta forma, las células que se obtienen poseen una copia del gen silvestre y una copia del gen inactivado a la vez, siendo kanamicina y ampicilina resistentes y sensibles a la sacarosa (Figura 11A y 11B). La integración del plásmido se verificó mediante reacciones de PCR y Southern Blot (Apartados 3.7.2 y 3.7.6).

Tras la integración del plásmido recombinante en el cromosoma, puede ocurrir un segundo proceso de entrecruzamiento simple entre zonas homólogas próximas correspondientes al gen silvestre y al inactivado. Este segundo entrecruzamiento puede conducir a que la bacteria revierta al genotipo silvestre o a que se origine la cepa mutante deseada (Figura 11A y 11B). La selección de las bacterias que sufren esta segunda recombinación homóloga se lleva a cabo en un medio que contenga sacarosa. En la práctica, se sembró en masa en placas de TSA-YE-HS, una de las colonias Amp^r y Kan^r obtenidas tras la electroporación. Posteriormente, tras 24-36 horas de incubación a 37°C, la biomasa se recogió en PBS y a continuación, se sembraron varias diluciones en placas de TSA-YE-HS suplementadas con sacarosa al 5 % (p/v) y se volvieron a incubar durante 48 horas en las mismas condiciones. Transcurrido este periodo de tiempo, se probó, mediante siembra por réplica, el crecimiento de varias de las colonias obtenidas (por tanto, no sensibles a la sacarosa) en medio suplementado con kanamicina y en medio suplementado con ampicilina. De esta forma, las colonias que resultaron ser Kan^r y Amp^s se seleccionaron como posibles cepas mutantes y las que no pudieron crecer en ninguno de los medios que contenían antibióticos, se seleccionaron como posibles cepas revertientes a genotipo silvestre (Figura 11A y 11B). La identidad de todas ellas se confirmó finalmente mediante análisis por PCR y Southern Blot (Apartados 3.7.2 y 3.7.6).

Como fenómeno menos común, se pueden obtener directamente cepas mutantes por sustitución del gen silvestre por el gen inactivado mediante un proceso de doble recombinación homóloga ocurrida a través las secuencias de ADN adyacentes a ambos lados del gen. De esta forma, las células que se obtienen tras realizar la electroporación son resistentes a kanamicina y sensibles a ampicilina (Figura 11C). Por este motivo, todas las células que se sometieron a diferentes procesos de electroporación fueron seleccionadas en placas de TSA-YE-HS-Kan, probando posteriormente su crecimiento en medio suplementado con ampicilina para verificar si se había producido un solo proceso de recombinación homóloga o si se había producido uno doble. En el presente trabajo, todas las cepas mutantes se obtuvieron mediante entrecruzamientos simples y se recogen en la Tabla XIV.

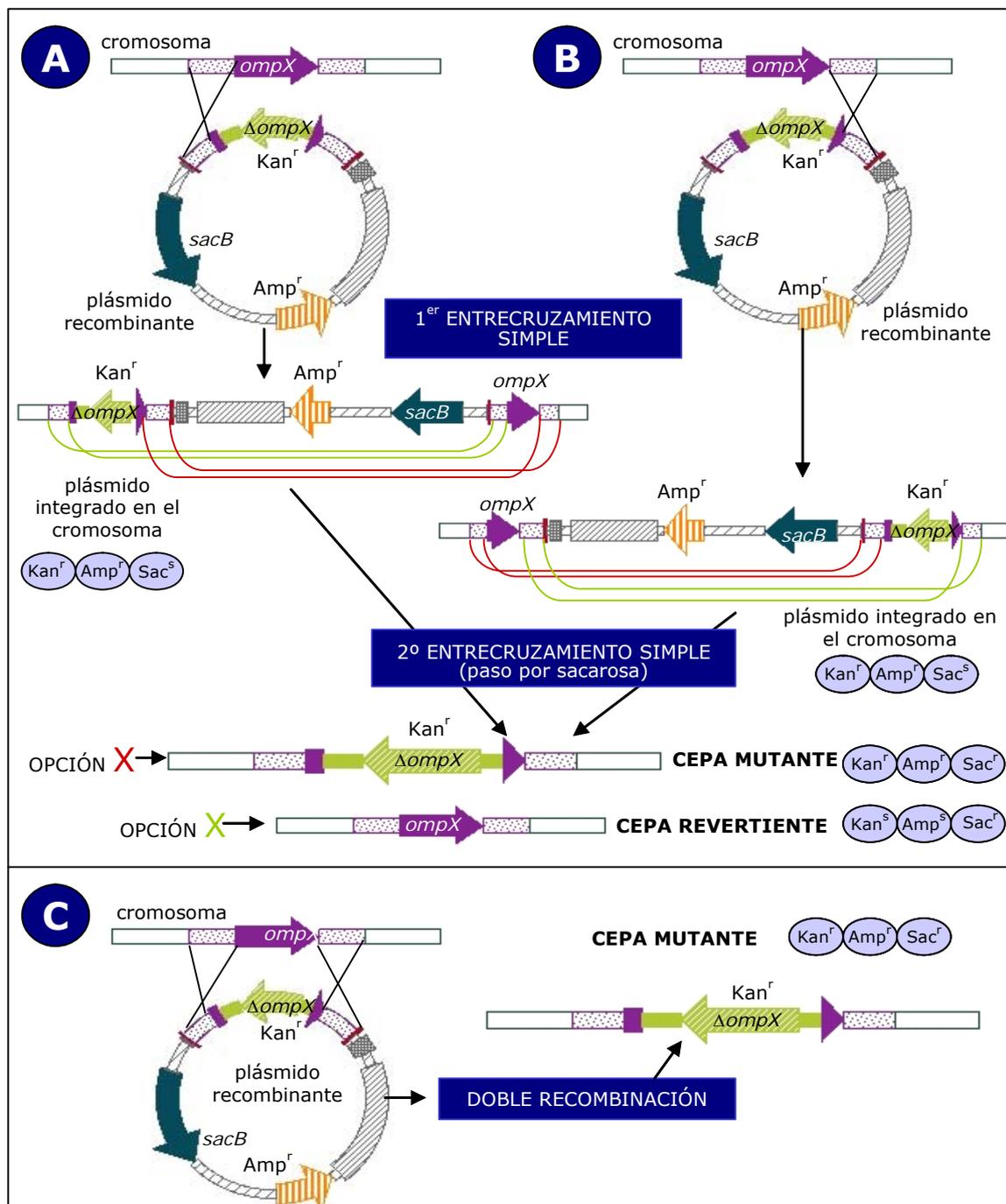


Figura 11. Representación esquemática de las posibles formas de la sustitución por recombinación homóloga del gen silvestre de interés por una copia del gen inactivado. Una vez introducido el plásmido recombinante que porta una copia del gen deletado en la bacteria por electroporación, existe la posibilidad de que suceda un entrecruzamiento simple (A o B) o uno doble (C) entre las regiones homólogas adyacentes al gen. En caso de que suceda el único evento de recombinación homóloga (A o B), las cepas resultantes poseen el plásmido recombinante integrado completamente en su cromosoma y son resistentes a kanamicina y a ampicilina y sensibles a sacarosa. Así, dichas cepas son portadoras a la vez de una copia silvestre y de una inactivada del gen de interés. A partir de ellas, mediante una siembra en medio suplementado con sacarosa, se pueden seleccionar aquellas donde ha sucedido un segundo entrecruzamiento simple. Según las zonas homólogas que recombinen se puede entonces seleccionar, o la cepa mutante buscada (*Kan^r* y *Amp^r*) o una cepa revertiente al genotipo silvestre (*Kan^s* y *Amp^s*). Por último, la cepa mutante de interés puede obtenerse también directamente si tiene lugar un proceso de doble recombinación homóloga entre las zonas de ADN homólogas del plásmido recombinante y del cromosoma bacteriano (C).

TABLA XIV. Cepas modificadas genéticamente en los genes *omp25d* y *omp22* obtenidas en el presente trabajo.

Cepas con una copia del gen silvestre y una copia del gen inactivado				
Cepa	Abreviatura usada	Breve descripción	Genotipo	Fenotipo
<i>B. abortus</i> -pAM25d03-I	<i>Ba.Δomp25d-I</i>	plásmido pAM25d03 integrado en <i>omp25d</i>	<i>omp25d::pAM25d03</i>	Amp ^r , Kan ^r , Sac ^s
<i>B. neotomae</i> -pAM25d03-I	<i>Bn.Δomp25d-I</i>	plásmido pAM25d03 integrado en <i>omp25d</i>	<i>omp25d::pAM25d03</i>	Amp ^r , Kan ^r , Sac ^s
<i>B. canis</i> -pAM25d03-I	<i>Bc.Δomp25d-I</i>	plásmido pAM25d03 integrado en <i>omp25d</i>	<i>omp25d::pAM25d03</i>	Amp ^r , Kan ^r , Sac ^s
<i>B. abortus</i> -pAM2204-I	<i>Ba.Δomp22-I</i>	plásmido pAM25d03 integrado en <i>omp25d</i>	<i>omp22::pAM22d04</i>	Amp ^r , Kan ^r , Sac ^s
<i>B. neotomae</i> -pAM2204-I	<i>Bn.Δomp22-I</i>	plásmido pAM25d03 integrado en <i>omp25d</i>	<i>omp22::pAM22d04</i>	Amp ^r , Kan ^r , Sac ^s
<i>B. canis</i> -pAM2204-I	<i>Bc.Δomp22-I</i>	plásmido pAM25d03 integrado en <i>omp25d</i>	<i>omp22::pAM22d04</i>	Amp ^r , Kan ^r , Sac ^s
Cepas mutantes con un gen <i>omp</i> inactivado y revertientes silvestres				
Cepa	Abreviatura usada	Breve descripción	Genotipo	Fenotipo
<i>B. abortus</i> -pAM25d03-M	<i>Ba.Δomp25d-M</i>	<i>omp25d</i> sustituido por el gen deletado de pAM25d03	<i>Δomp25d</i>	Amp ^s , Kan ^r , Sac ^f
<i>B. neotomae</i> -pAM25d03-M	<i>Bn.Δomp25d-M</i>	<i>omp25d</i> sustituido por el gen deletado de pAM25d03	<i>Δomp25d</i>	Amp ^s , Kan ^r , Sac ^f
<i>B. canis</i> -pAM25d03-M	<i>Bc.Δomp25d-M</i>	<i>omp25d</i> sustituido por el gen deletado de pAM25d03	<i>Δomp25d</i>	Amp ^s , Kan ^r , Sac ^f
<i>B. abortus</i> -pAM2204-M	<i>Ba.Δomp22-M</i>	<i>omp22</i> sustituido por el gen deletado de pAM2204	<i>Δomp22</i>	Amp ^s , Kan ^r , Sac ^f
<i>B. neotomae</i> -pAM2204-M	<i>Bn.Δomp22-M</i>	<i>omp22</i> sustituido por el gen deletado de pAM2204	<i>Δomp22</i>	Amp ^s , Kan ^r , Sac ^f
<i>B. canis</i> -pAM2204-M	<i>Bc.Δomp22-M</i>	<i>omp22</i> sustituido por el gen deletado de pAM2204	<i>Δomp22</i>	Amp ^s , Kan ^r , Sac ^f
<i>B. abortus</i> -pAM25d03-R	<i>Ba.Δomp25d-R</i>	Revertiente a genotipo silvestre	<i>omp25d</i>	Amp ^s , Kan ^s , Sac ^f
<i>B. neotomae</i> -pAM25d03-R	<i>Bn.Δomp25d-R</i>	Revertiente a genotipo silvestre	<i>omp25d</i>	Amp ^s , Kan ^s , Sac ^f
<i>B. canis</i> -pAM25d03-R	<i>Bc.Δomp25d-R</i>	Revertiente a genotipo silvestre	<i>omp25d</i>	Amp ^s , Kan ^s , Sac ^f
<i>B. abortus</i> -pAM2204-R	<i>Ba.Δomp22-R</i>	Revertiente a genotipo silvestre	<i>omp22</i>	Amp ^s , Kan ^s , Sac ^f
<i>B. neotomae</i> -pAM2204-R	<i>Bn.Δomp22-R</i>	Revertiente a genotipo silvestre	<i>omp22</i>	Amp ^s , Kan ^s , Sac ^f
<i>B. canis</i> -pAM2204-R	<i>Bc.Δomp22-R</i>	Revertiente a genotipo silvestre	<i>omp22</i>	Amp ^s , Kan ^s , Sac ^f

5.2 Obtención de cepas mutantes de *B. ovis* PA en genes implicados en la virulencia de cepas lisas de *Brucella*.

5.2.1 Obtención de una cepa de *B. ovis* PA con una mutación polar en el operón *virB*.

Para la construcción de este mutante polar, se amplificó mediante PCR con los cebadores *virBMUT-F* y *virBMUT-R* (Tabla V), un fragmento de ADN de 2889 pb procedente de *B. ovis* PA. Éste comprendía gran parte del gen *virB1*, los genes *virB2* y *virB3* y parte de *virB4* y fue clonado en el vector pGEM-T® Easy (Figura 12A). Debido a que este vector presenta un sitio de corte para la enzima *MluI* y que ésta debía ser usada posteriormente para la delección de parte del operón, fue necesario extraer mediante

EcoRI el fragmento amplificado e insertarlo en el mismo sitio de corte en el vector pGEM[®]-7Zf. De esta forma, se obtuvo el plásmido pNVvirPA02, el cual portaba el inserto en dirección opuesta al gen *lacZ* (Figura 12A). A continuación, dicho inserto se clonó en el vector pUC19 mediante digestión enzimática con *SacI* y *XbaI*, generándose entonces, el plásmido pNVvirPA03 (Figura 12A).

Paralelamente a esto, se amplificó por PCR el gen que confiere resistencia a kanamicina, junto con su terminador de transcripción. Para ello, se empleó como ADN molde, el plásmido pUC4K y los cebadores KanF- *MluI* y KanR-*EcoNI*, los cuales añaden sitios de restricción necesarios para realizar la posterior inactivación del operón *virB* (Tabla V). El producto de PCR obtenido, un fragmento de 1283 pb, se clonó en el vector pGEM-T[®] y seguidamente, se extrajo mediante *MluI* y digestión parcial con *EcoNI* y ligado al plásmido pNVvirPA02, cortado con las mismas enzimas de restricción (Figura 12B).

Finalmente, el fragmento amplificado e inactivado del operón *virB* se clonó mediante digestión enzimática con *SacI* y *XbaI* en el plásmido pCVD442, el cual aporta el marcador de selección *sacB* (Figura 12B) necesario en los siguientes pasos en la obtención de la cepa mutante deseada. La correcta construcción se verificó mediante secuenciación de ADN utilizando para ello los cebadores recogidos en la Tabla V.

Una vez obtenido el plásmido recombinante pNVvirPA05, éste se introdujo dentro de *B. ovis* PA mediante electroporación (Apartado 3.4.2). Por un proceso de entrecruzamiento simple entre regiones homólogas del cromosoma de la bacteria y del plásmido recombinante introducido, pNVvirPA05 se integró en el ADN de la bacteria (Ver Apartado 5.1.2). De esta forma, los clones seleccionados resultaron ser kanamicina y ampicilina resistentes. Posteriormente, tras un paso de crecimiento en medio con sacarosa, en el cual aconteció un segundo entrecruzamiento simple entre zonas homólogas cercanas, se pudo seleccionar mediante el uso de los dos diferentes antibióticos, la cepa con la mutación polar en el operón *virB* deseada (siendo Kan^r y Amp^s) y el correspondiente revertiente silvestre (siendo Kan^s y Amp^s). Tanto la integración del plásmido recombinante en el cromosoma como la obtención de las cepas mutantes y revertientes silvestres se verificaron mediante Southern Blot, diferentes reacciones de PCR y secuenciación del ADN (Apartados 3.7.2, 3.7.6 y 3.7.3) utilizando los cebadores señalados en la Tabla V.

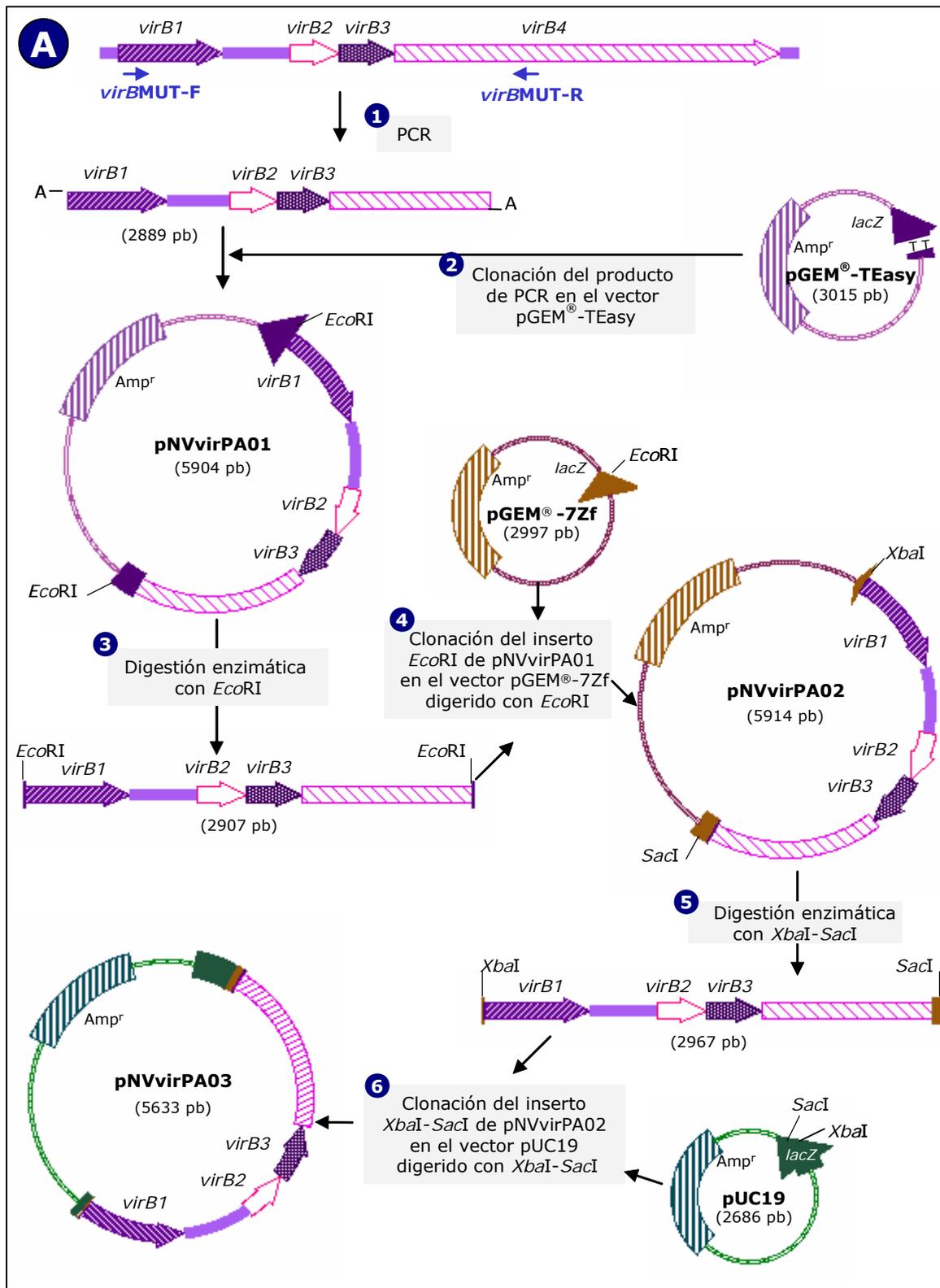


Figura 12. A. Construcción del plásmido recombinante pNVvirPA05 utilizado para la obtención de una cepa mutante polar de *B. ovis* PA en el operón *virB*. Se representan gráficamente todos los pasos seguidos para la generación del plásmido recombinante pNVvirPA03, el cual está constituido por el vector pUC19 y un fragmento de ADN amplificado por PCR que contiene los genes *virB1*, *virB2*, *virB3* y parte de *virB4*, insertado en orientación directa a *lacZ*. Se muestran los cebadores, los vectores y las enzimas de restricción empleadas, así como sus puntos de corte.

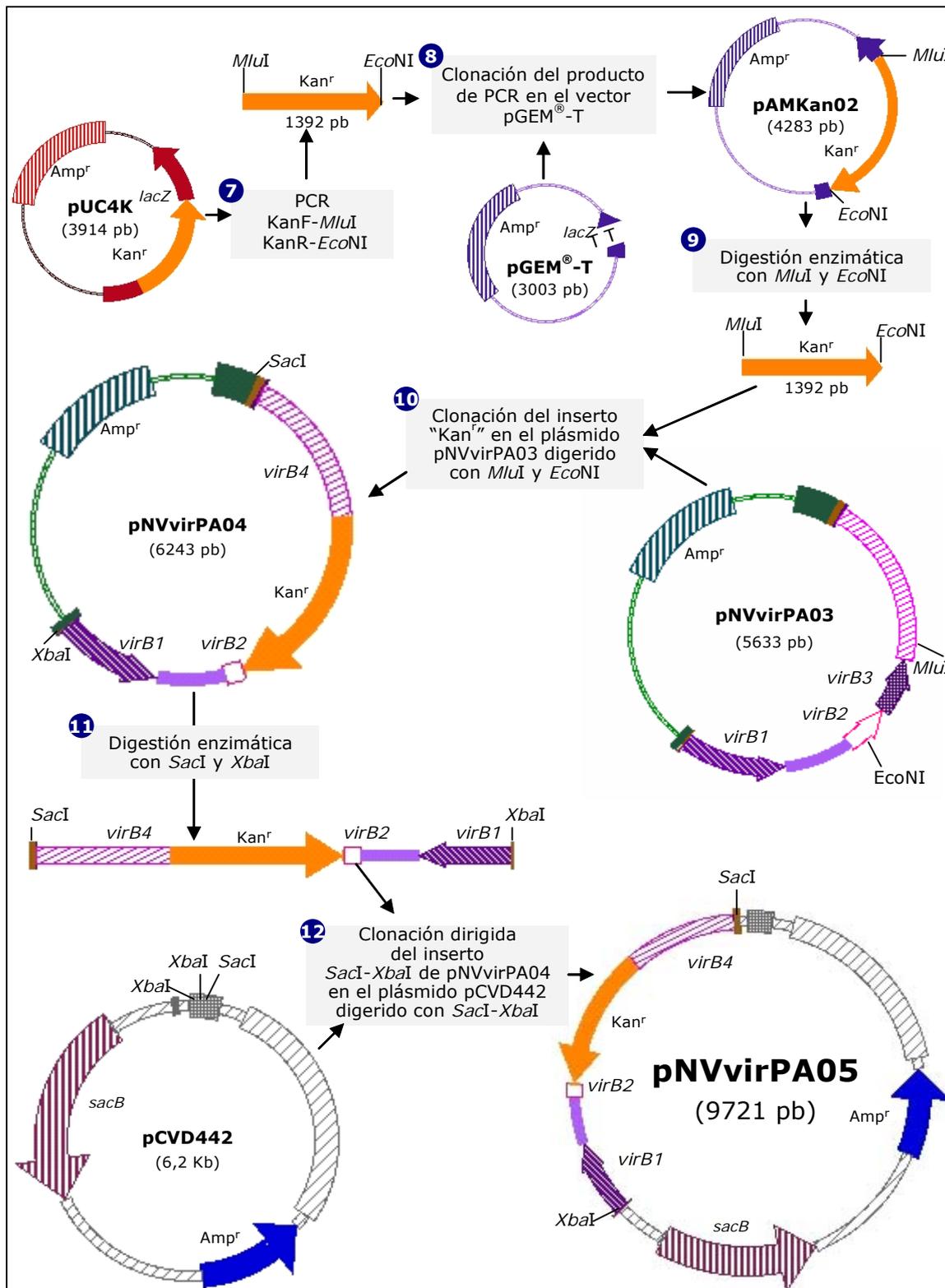


Figura 12. (Continuación) B. Construcción del plásmido recombinante pNVvirPA05 utilizado para la obtención de una cepa mutante polar de *B. ovis* PA en el operón *virB*. A partir del plásmido recombinante pNVvirPA03 se procedió a deletar parte del operón *virB* amplificado por PCR y a insertar en orientación inversa, un "cassette" de resistencia a kanamicina procedente del plásmido pAMKan02. Finalmente, el fragmento de ADN se extrajo y se clonó en el plásmido pCVD442 que porta el gen *sacB*. Igualmente se muestran los cebadores, los plásmidos y las enzimas de restricción con sus puntos de corte empleados a lo largo de la construcción.

5.2.2 Obtención de cepas mutantes no polares de *B. ovis* PA en los genes *vjbR*, *cgs*, *bacA* y *virB2*.

Para la obtención de estas cepas mutantes se empleó la denominada PCR "de solapamiento" (Ho *et al.*, 1989) para conseguir la inactivación en fase de los genes de interés sin introducir ningún gen adicional en la bacteria. Para ello, en primer lugar se realizaron dos reacciones de PCR independientes usando la enzima Pwo SuperYield DNA polimerase (Roche). En cada una de ellas, se emplearon también un cebador que anillaba externamente al gen a deletar, y otro interno, que hibridaba cercano al codón de inicio o de terminación. Estos cebadores internos tenían además la peculiaridad de que poseían una región complementaria en los extremos. Esto permitía obtener en una tercera reacción de PCR, usando únicamente los cebadores externos y mezclando los dos productos obtenidos, el gen de interés amplificado con la deleción deseada (Tabla V) (Figura 13).

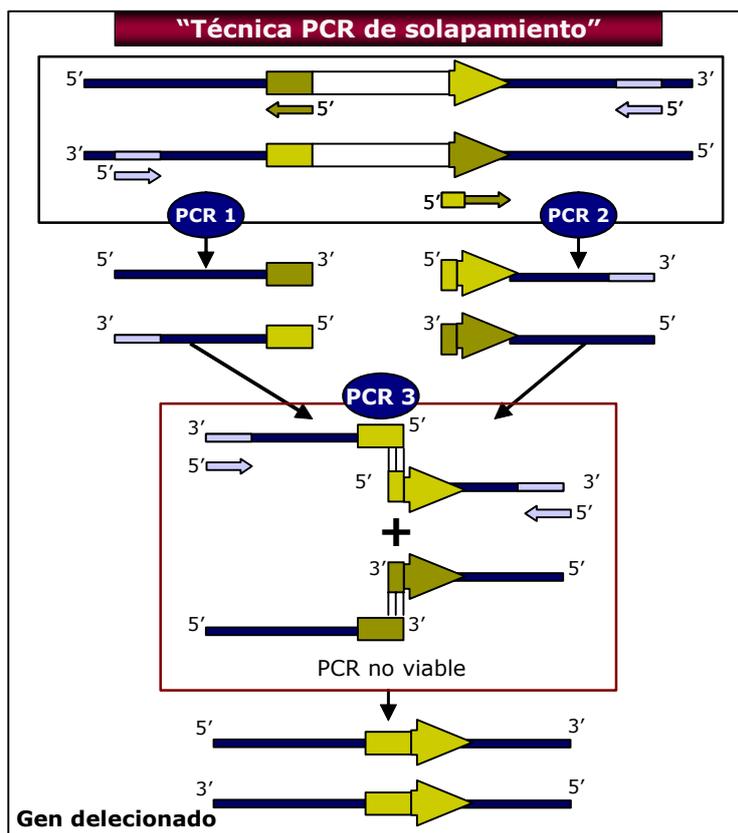


Figura 13. Descripción esquemática de la denominada PCR "de solapamiento". Esta técnica se basa en realizar en primer lugar dos reacciones de PCR independientes, empleando en cada una de ellas, un cebador externo al gen de interés y otro interno que hibride delimitando la zona del gen a deletar. Estos últimos poseen además una región complementaria entre ellos que permite posteriormente, en una tercera reacción mezclando los dos productos de PCR y utilizando los cebadores externos, obtener el gen amplificado deletado.

En líneas generales, la estrategia seguida para la construcción de los plásmidos recombinantes portadores de los genes inactivados, fue clonar en primer lugar, el fragmento obtenido mediante PCR "de Solapamiento" en el vector pGEM[®] T Easy (en

orientación inversa al gen *lacZ*), y posteriormente, en el plásmido pCVDKan-D (Figuras 14-17).

En los casos concretos de la obtención de los plásmidos finales portadores de los genes *bacA* y *virB2* delecionados (Figuras 16 y 17), fue necesario realizar un paso intermedio para poder obtener los sitios de corte para las enzimas de restricción necesarias para la última clonación. Este paso consistió en la extracción mediante *EcoRI* de los fragmentos de PCR de los plásmidos pNVvirB201 y pNVbacA01, e insertarlos posteriormente en el mismo sitio de corte de restricción en el vector PGEM[®]-7Zf, en orientación directa al gen *lacZ*. De este modo, una vez obtenidos los plásmidos pNVvirB203 y pNVbacA02, mediante digestión con *SacI* y *XbaI*, se pudieron clonar los dos genes delecionados en el plásmido final pCVDKan-D (Figuras 16 y 17).

En cada caso, los cebadores empleados en las distintas reacciones de PCR y en la secuenciación de ADN para la verificación de la correcta amplificación génica, se recogen en la Tabla V, y las enzimas utilizadas en la construcción de cada plásmido recombinante portador del gen delecionado, se detallan en las correspondientes Figuras (Figuras 14 - 17).

Una vez obtenidos todos los plásmidos recombinantes portadores de $\Delta vjbR$, Δcgs , $\Delta bacA$ y $\Delta virB2$, éstos se introdujeron en *B. ovis* PA mediante electroporación (Apartado 3.4.2). Las células sometidas a esta técnica se sembraron en este caso, en placas de TSA-YE-HS suplementadas con kanamicina, pudiendo seleccionar de este modo, únicamente aquellos clones en los que había acontecido una sola recombinación homóloga entre el ADN de la bacteria y el plásmido recombinante introducido (Ver Apartado 5.1.2). Posteriormente, gracias a que los plásmidos integrados en el cromosoma portaban el gen de sensibilidad a la sacarosa (*sacB*), tras crecimiento en medio suplementado con este azúcar, se seleccionaron células en las cuales se había producido un segundo entrecruzamiento simple entre regiones homólogas cercanas. Así, aquellos clones que eran Kan^s y Sac^r se aislaron como posibles cepas mutantes o posibles cepas revertientes silvestres (Apartado 5.1.2). Mediante Southern Blot, reacciones de PCR y secuenciación del ADN (Apartados 3.7.2, 3.7.6 y 3.7.3) empleando los cebadores señalados en la Tabla V, se verificó la identidad de los mismos.

Todas las cepas mutantes y revertientes silvestres obtenidas, así como los plásmidos generados para su construcción, se recogen en las Tablas XV y IX, respectivamente.

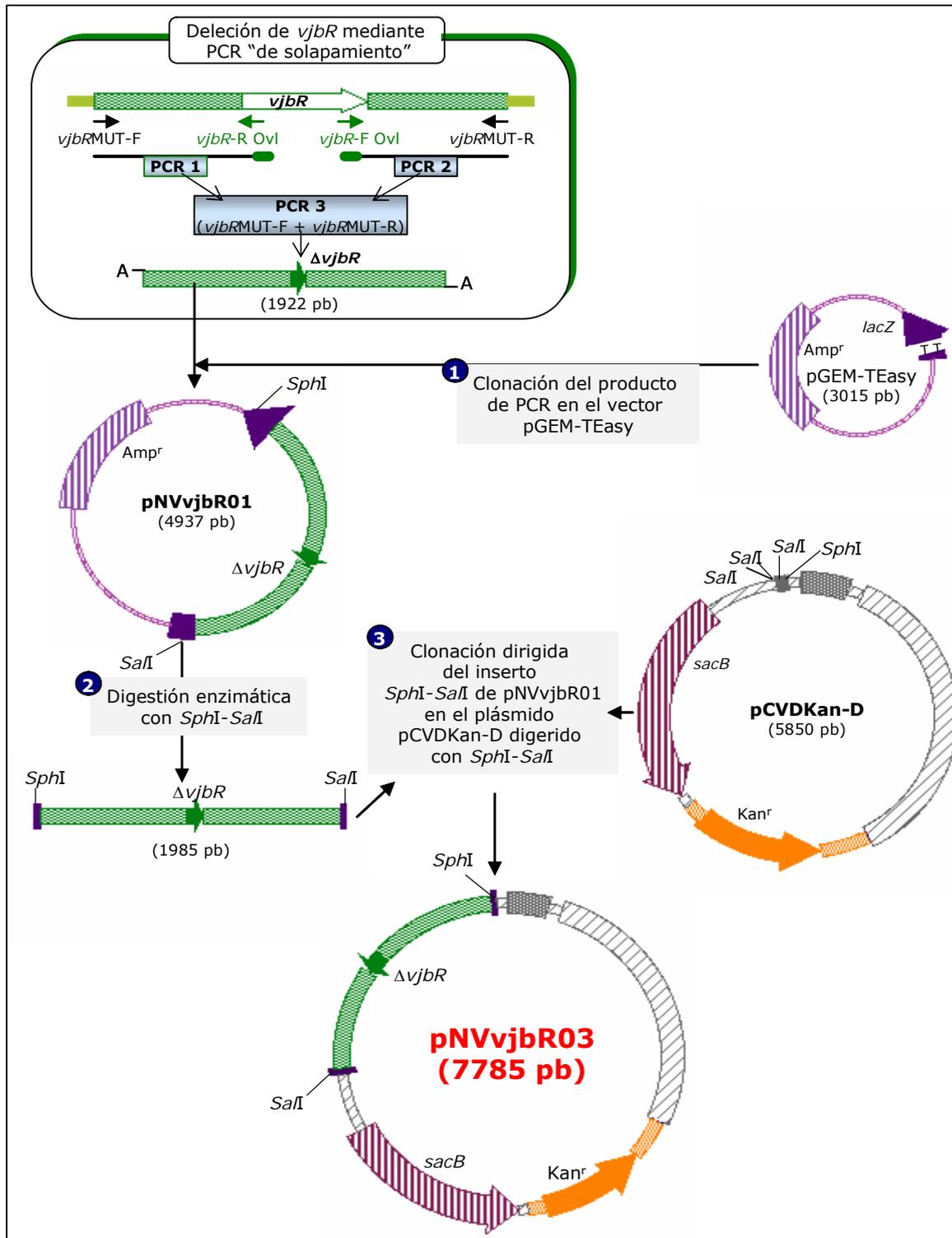


Figura 14. Representación gráfica de la estrategia seguida para la construcción del plásmido recombinante pNVvjbR03, portador del gen $\Delta vjbR$. En primer lugar, se inactivó el gen *vjbR* empleando la técnica denominada PCR "de solapamiento". El producto de PCR resultante, se clonó en el vector pGEM®-TEasy en orientación inversa a *lacZ*. Por último, se extrajo el fragmento de ADN mediante digestión enzimática de pNVvjbR02 y se clonó en el plásmido pCVDKan-D, portador de un gen que confiere resistencia a kanamicina y del gen *sacB*. Tanto las enzimas de restricción, con sus puntos de corte, como los cebadores empleados en la construcción del plásmido pNVvjbR03, se muestran a lo largo de la Figura.

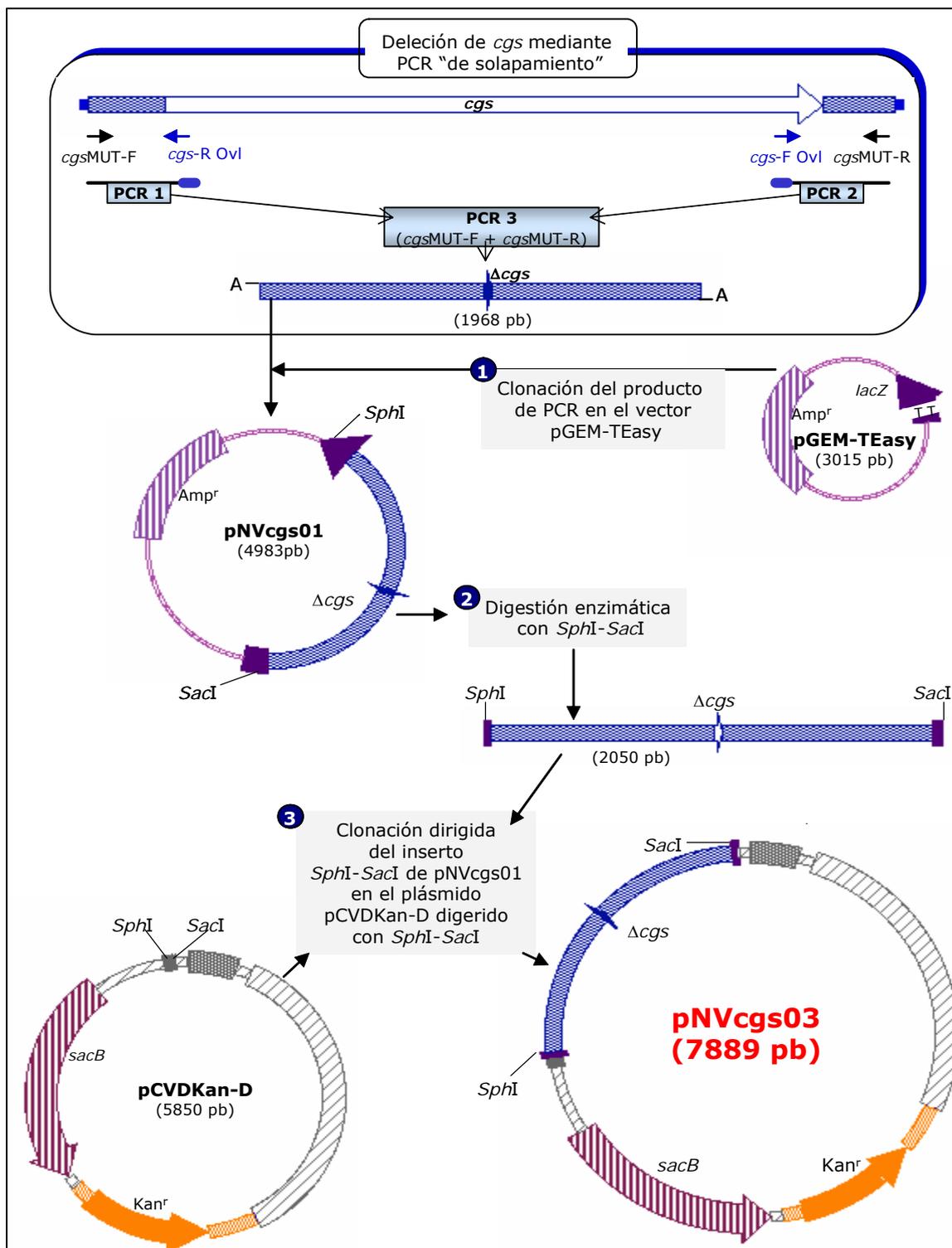


Figura 15. Representación esquemática de los pasos seguidos en la construcción del plásmido recombinante pNVcgs03, portador del gen Δcgs inactivado mediante PCR "de solapamiento". Inicialmente se clonó en el vector pGEM®-TEasy en orientación inversa a *lacZ*, el gen Δcgs obtenido en la tercera reacción de PCR. Posteriormente, se extrajo mediante digestión enzimática de pNVcgs02 y se insertó en el plásmido pCVDKan-D, en orientación inversa tanto al gen *sacB* como al gen de resistencia a kanamicina. Se muestran en la Figura todas las enzimas de restricción empleadas y sus puntos de corte, así como los cebadores utilizados en la inactivación del gen *cgs*.

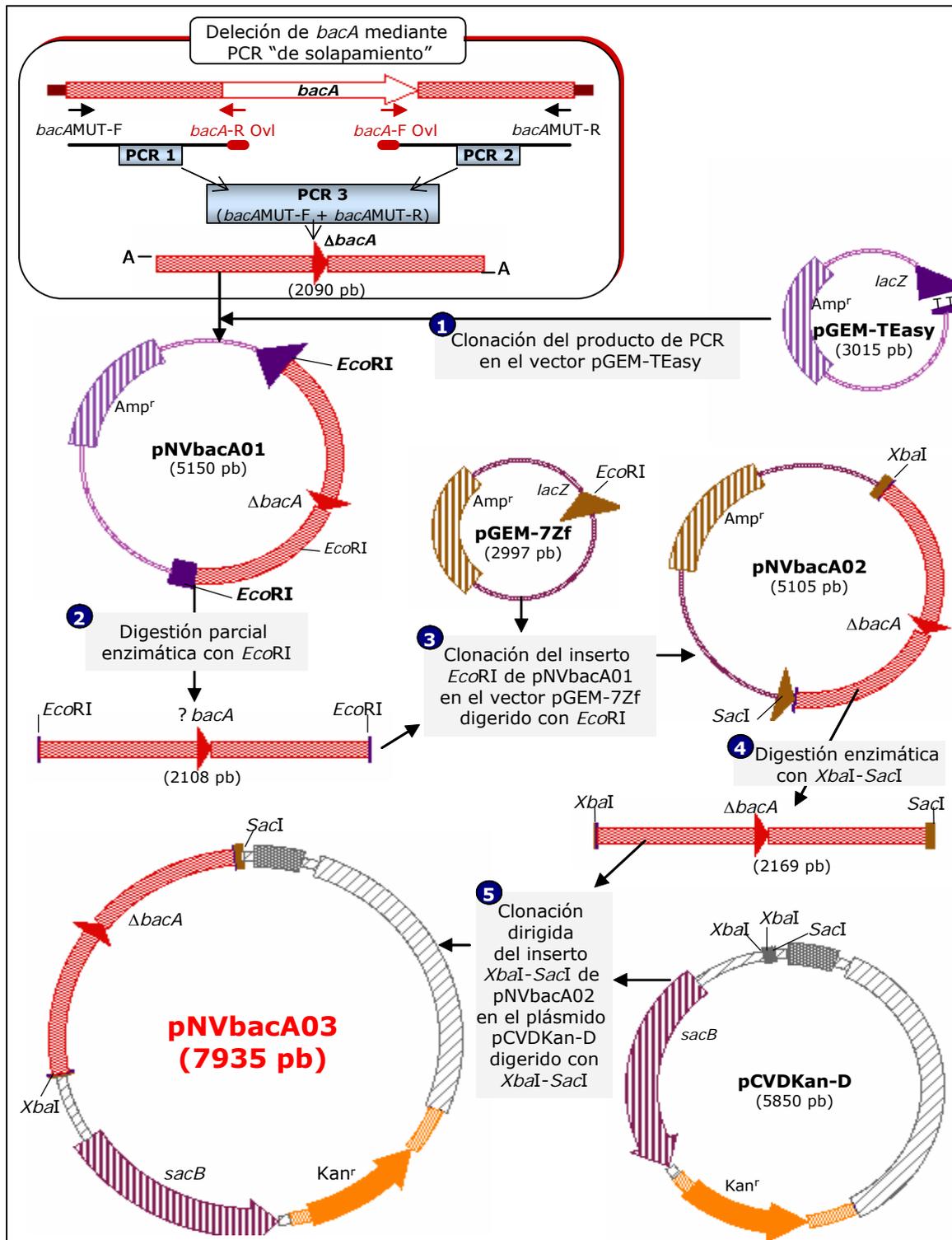


Figura 16. Esquema de la estrategia usada en la construcción del plásmido recombinante pNVbacA03, portador del gen $\Delta bacA$. Mediante PCR "de solapamiento" se obtuvo una copia del gen *bacA* delecionada, que se clonó en el vector pGEM®-TEasy en orientación inversa a *lacZ*. A continuación, dicho fragmento de ADN se extrajo con *EcoRI* y se subclonó en el vector pGEM®-7Zf digerido con la misma enzima. Finalmente, mediante *XbaI* y *SacI*, se insertó el gen $\Delta bacA$ en pCVDKan-D para obtener en último lugar, el plásmido recombinante pNVbacA03. Se señalan en la Figura los puntos de corte de las enzimas mencionadas y los cebadores utilizados en las reacciones de PCR.

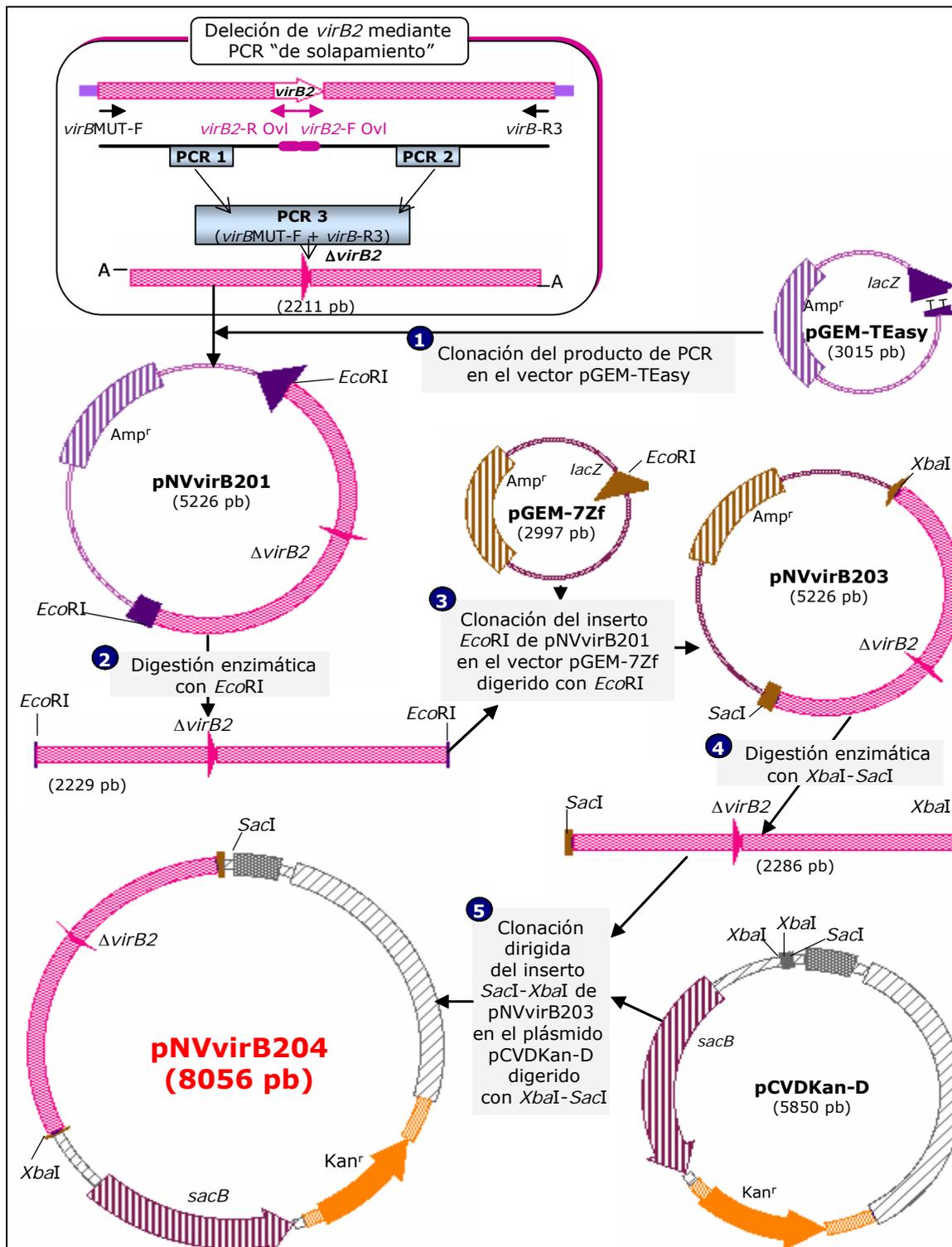


Figura 17. Construcción del plásmido recombinante pNVvirB204, portador del gen *virB2* deletado. La inactivación del gen *virB2* se llevó a cabo utilizando la técnica PCR "de solapamiento", con los cebadores indicados en la Figura. Posteriormente, el producto de PCR obtenido se clonó en primer lugar, en el vector pGEM®-TEasy después en el vector pGEM®-7Zf con el fin de poder obtener el sitio de corte de restricción *XbaI* para insertar finalmente, el fragmento de ADN amplificado en el plásmido pCVDKan-D, en la misma orientación que el gen de resistencia a kanamicina y que el gen *sacB*. En cada paso se señalan las enzimas de restricción empleadas, así como sus puntos de corte en los plásmidos correspondientes.

- Complementación de las cepas mutantes $\Delta vjbR$, Δcgs y $\Delta virB2$ de *B. ovis* PA.

La complementación de los mutantes $\Delta vjbR$, Δcgs y $\Delta virB2$ de *B. ovis* PA se llevó a cabo mediante la introducción, vía electroporación, de los plásmidos pNVvjbR04-COM, pNVcgs02-COM y pNVvirB202-COM, respectivamente. Dichos plásmidos recombinantes se construyeron amplificando en primer lugar, cada gen silvestre de *B. ovis* PA, incluyendo además el sitio de unión al ribosoma y el terminador de transcripción correspondiente. Para ello, se realizaron diversas reacciones de PCR empleando los cebadores descritos en la Tabla VI. A continuación, cada producto de PCR obtenido se clonó en el vector pGEM[®]-TEasy y posteriormente, con el fin de verificar que había acontecido una correcta amplificación génica, los plásmidos recombinantes resultantes (pNVvjbR01-COM, pNVcgs01-COM y pNVvirB201-COM, Tabla X) se analizaron mediante secuenciación de ADN usando los cebadores universales (Tabla V). En el caso de la construcción de los plásmidos destinados a la complementación de las cepas mutantes $\Delta vjbR$ y $\Delta virB2$, se seleccionaron aquellos en los cuales el fragmento de ADN se había insertado en orientación inversa al gen *lacZ* ya que de este modo, mediante digestión enzimática con *Apa*I y *Sac*I se conseguía subclonarlo en el plásmido pBBR1MCS2 bajo el control del promotor *lacZ*. De este modo, se generaron los plásmidos recombinantes denominados pNVvjbR03-COM y pNVvirB202-COM (Tabla X), los cuales además de ser capaces de replicarse en *Brucella* spp. (Apartado 3.1), portaban un gen que confiere resistencia a kanamicina. Seguidamente, éstos se introdujeron mediante electroporación (Apartado 3.4.2) en la cepa mutante de *B. ovis* PA correspondiente, realizando la selección de las cepas complementadas en placas de TSA-YE-HS suplementadas con el antibiótico. Contradictoriamente, en el caso de la complementación de la cepa mutante *Bo.* $\Delta vjbR$ -M no se obtuvo ningún clon resistente a kanamicina. Debido a ello, construimos otro plásmido recombinante mediante la extracción del fragmento de ADN amplificado con *Kpn*I y *Sac*I de pNVvjbR03-COM e inserción posterior en pBBR1MCS4 digerido con las mismas enzimas. De este modo, se obtuvo el plásmido recombinante pNVvjbR04-COM (Tabla X), que confería resistencia a ampicilina y mediante el cual, sí que se consiguieron clones complementados de la cepa mutante $\Delta vjbR$ de *B. ovis* PA.

Por último, se observó que a la hora de clonar el gen *cgs* amplificado en el vector pGEM[®]-TEasy, todos los clones obtenidos ampicilina resistentes, portaban el inserto de ADN en orientación directa al gen *lacZ*. Debido a esto, la subclonación del producto de PCR al plásmido final pBBR1MCS2, se tuvo que llevar a cabo mediante una digestión parcial enzimática del vector con *Not*I y una selección posterior de aquellos clones que portaban el gen *cgs* en una orientación directa al gen *lacZ*. Finalmente, el plásmido recombinante obtenido, al cual se le llamó pNVcgs02-COM (Tabla X), se introdujo por electroporación (Apartado 3.4.2) en el mutante *Bo.* Δcgs -M y las cepas complementadas se identificaron por su resistencia a kanamicina.

La verificación de la correcta identidad de las cepas mutantes complementadas obtenidas en este Apartado (Tabla XV) se realizó mediante hibridación ADN-ADN a través de la realización de un Blot de colonias, usando como sonda, los plásmidos pBBR1MCS2 y pBBR1MCS4 marcados con digoxigenina (Apartado 3.7.7).

Tabla XV. Relación de cepas modificadas genéticamente generadas en la obtención de cepas mutantes de *B. ovis* PA en genes implicados en la virulencia de estirpes lisas de *Brucella*.

Cepas con una copia del gen silvestre y una copia del gen inactivado				
Cepa	Abreviatura	Breve descripción	Genotipo	Fenotipo
<i>B. ovis</i> -pNVvirPA05-I	<i>Bo.ΔvirB</i> (p)-I	plásmido pNVvirPA05 integrado en <i>virB2</i>	<i>virB::pNVvirPa05</i>	Amp ^r , Kan ^r , Sac ^s
<i>B. ovis</i> -pNVvjbR03-I	<i>Bo.ΔvjbR</i> -I	plásmido pNVvjbR03 integrado en <i>vjbR</i>	<i>vjbR::pNVvjbR03</i>	Kan ^r , Sac ^s
<i>B. ovis</i> -pNVcgs03-I	<i>Bo.Δcgs</i> -I	plásmido pNVcgs03 integrado en <i>cgs</i>	<i>cgs::pNVcgs03</i>	Kan ^r , Sac ^s
<i>B. ovis</i> -pNVbacA03-I	<i>Bo.ΔbacA</i> -I	plásmido pNVbacA03 integrado en <i>bacA</i>	<i>bacA::pNVbacA03</i>	Kan ^r , Sac ^s
<i>B. ovis</i> -pNVvirB204-I	<i>Bo.ΔvirB2</i> -I	plásmido pNVvirB204 integrado en <i>virB2</i>	<i>virB2::pNVvirB204</i>	Kan ^r , Sac ^s
Cepas mutantes con el operón <i>virB</i> inactivado, con genes deletados y revertientes silvestres				
Cepa	Abreviatura	Breve descripción	Genotipo	Fenotipo
<i>B. ovis</i> -pNVvirPA05-M	<i>Bo.ΔvirB</i> (p)-M	Mutante polar del operón <i>virB</i> por sustitución de los genes <i>virB2-3</i> por los mismos inactivados del plásmido pNVvirPA05	<i>ΔvirB</i> polar	Amp ^s , Kan ^r , Sac ^f
<i>B. ovis</i> -pNVvjbR03-M	<i>Bo.ΔvjbR</i> -M	<i>vjbR</i> sustituido por el gen deletado en fase de pNVvjbR03	<i>ΔvjbR</i>	Kan ^s , Sac ^f
<i>B. ovis</i> -pNVcgs03-M	<i>Bo.Δcgs</i> -M	<i>cgs</i> sustituido por el gen deletado en fase de pNVcgs03	<i>Δcgs</i>	Kan ^s , Sac ^f
<i>B. ovis</i> -pNVbacA03-M	<i>Bo.ΔbacA</i> -M	<i>bacA</i> sustituido por el gen deletado en fase de pNVbacA03	<i>ΔbacA</i>	Kan ^s , Sac ^f
<i>B. ovis</i> -pNVvirB204-M	<i>Bo.ΔvirB2</i> -M	<i>virB2</i> sustituido por el gen deletado en fase de pNVvirB204	<i>ΔvirB2</i>	Kan ^s , Sac ^f
<i>B. ovis</i> -pNVvirPA05-R	<i>Bo.ΔvirB</i> (p)-R	Revertiente a genotipo silvestre	<i>virB</i>	Amp ^s , Kan ^s , Sac ^f
<i>B. ovis</i> -pNVvjbR03-R	<i>Bo.ΔvjbR</i> -R	Revertiente a genotipo silvestre	<i>vjbR</i>	Kan ^s , Sac ^f
<i>B. ovis</i> -pNVcgs03-R	<i>Bo.Δcgs</i> -R	Revertiente a genotipo silvestre	<i>cgs</i>	Kan ^s , Sac ^f
<i>B. ovis</i> -pNVbacA03-R	<i>Bo.ΔbacA</i> -R	Revertiente a genotipo silvestre	<i>bacA</i>	Kan ^s , Sac ^f
<i>B. ovis</i> -pNVvirB204-R	<i>Bo.ΔvirB2</i> -R	Revertiente a genotipo silvestre	<i>virB2</i>	Kan ^s , Sac ^f
Cepas mutantes complementadas con el gen silvestre				
Cepa	Abreviatura	Breve descripción	Genotipo	Fenotipo
<i>B. ovis</i> -pNVvjbR03-M-COM	<i>Bo.ΔvjbR</i> -COM	<i>Bo.ΔvjbR</i> -M complementada con pNVvjbR04-COM	<i>ΔvjbR/pNVvjbR04-COM (vjbR)</i>	Amp ^r
<i>B. ovis</i> -pNVcgs03-M-COM	<i>Bo.Δcgs</i> -COM	<i>Bo.Δcgs</i> -M complementada con pNVcgs02-COM	<i>Δcgs/pNVcgs02-COM (cgs)</i>	Kan ^r
<i>B. ovis</i> -pNVvirB204-M-COM	<i>Bo.ΔvirB2</i> -COM	<i>Bo.ΔvirB2</i> -M complementada con pNVvirB204-COM	<i>ΔvirB2/pNVvirB202-COM (virB2)</i>	Kan ^r

6. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS MUTANTES Y REVERTIENTES SILVESTRES OBTENIDAS EN ESTE TRABAJO.

6.1 Caracterización genotípica.

Para la caracterización de las cepas mutantes y revertientes silvestres obtenidas se amplificaron mediante la técnica de PCR (ver Apartado 3.7.2.), los genes inactivados o silvestres según cada caso, usando como control, la cepa parental correspondiente.

También se caracterizaron aquellas cepas donde el plásmido recombinante se había integrado en el cromosoma, amplificando de este modo, una copia silvestre y una copia mutada del gen de interés. Los cebadores empleados se detallan en las Tablas IV y V. Adicionalmente, se realizaron hibridaciones de ácidos nucleicos mediante Southern Blot (ver Apartado 3.7.6) con el ADN de las cepas parentales, mutantes, revertientes silvestres y de aquellas donde se había integrado el plásmido recombinante. Para ello, el ADN de cada cepa digerido con una o más enzimas de restricción, se hibridó con sondas marcadas con digoxigenina de los plásmidos recombinantes que contenían los genes inactivados correspondientes, empleados en los procesos de electroporación. Por último, con el fin de verificar la obtención de las cepas mutantes de interés, se llevó a cabo la secuenciación de su genoma en la región donde se hallaba el gen inactivado. Para ello, se emplearon los cebadores también señalados en las Tablas IV y V.

6.2 Caracterización fenotípica clásica.

La caracterización fenotípica clásica de las cepas mutantes y revertientes silvestres de *B. ovis* PA obtenidas en el presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Brucelosis de las instalaciones de la Unidad de Sanidad Animal pertenecientes al Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) del Gobierno de Aragón (Zaragoza).

6.2.1 Manipulación de las cepas y preparación de las suspensiones bacterianas.

A partir de las cepas conservadas en DMSO a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, se realizó un precultivo en placas de BAB-S durante 3 días de incubación a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ bajo una atmósfera con 10 % de CO_2 . Posteriormente, se llevó a cabo un nuevo cultivo en las mismas condiciones descritas por un periodo de 48 horas. Seguidamente, se recogieron todas las bacterias crecidas en solución salina tamponada y se ajustó por espectrofotometría la D.O._{600 nm} a 0,17 con la finalidad de preparar suspensiones que contenesen aproximadamente 1×10^9 Unidades Formadoras de Colonia (UFC)/ml. Las concentraciones bacterianas exactas existentes en cada suspensión se determinaron retrospectivamente mediante siembra por triplicado de 100 μl de una dilución con alrededor de 1×10^3 UFC/ml en placas de BAB-S.

6.2.2 Control de pureza y estabilidad *in vitro* de los cultivos.

Para determinar la pureza, es decir, la ausencia de contaminación por cepas de *Brucella* y la ausencia de disociación del tamaño y de la fase colonial, se prepararon

suspensiones bacterianas según se describe en el Apartado anterior y se realizaron recuentos retrospectivos en placas de BAB-S incubadas a 37 °C en una atmósfera enriquecida con un 10 % de CO₂. La ausencia de disociación del tamaño colonial se determinó mediante la visualización directa de las UFC tras 6 días de incubación, y la fase colonial, mediante la prueba del cristal violeta-oxalato amónico (Alton *et al.*, 1988).

En el caso de la cepa portadora de una mutación polar en el operón *virB* por inserción de un "cassette" Kan^r, se analizó su estabilidad *in vitro* mediante la comparación de las UFC/placa obtenidas en medio BAB-S suplementado con kanamicina y en el mismo medio pero sin antibiótico. Finalmente, para determinar la inexistencia de contaminación, se comprobó la ausencia de crecimiento de las cepas mutantes y revertientes silvestres de *B. ovis* PA obtenidas, en medio BAB-S/sin CO₂ y en medio BAB/con CO₂ y sin CO₂.

6.2.3 Pruebas fenotípicas clásicas.

La caracterización fenotípica clásica de las cepas mutantes y revertientes silvestres de *B. ovis* PA obtenidas en el presente trabajo, se llevó a cabo mediante la realización de las pruebas de tipificación convencional para *Brucella* (Alton *et al.*, 1988), utilizando como controles, la cepa parental y las cepas *B. abortus* B19, *B. suis* 1330 y *B. melitensis* 16M (Tabla I). De este modo, la identificación a nivel de género se realizó mediante la tinción de Gram y las pruebas de la ureasa y aglutinación con acriflavina; la identificación a nivel de especie, mediante la prueba de lisis a la dilución corriente de prueba (DCP) por los bacteriófagos Tb (que sólo lisa *B. abortus*), Wb (que lisa *B. abortus* y *B. suis*), Iz (que lisa *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis*) y R/C (que solamente lisa las cepas rugosas de *Brucella*); y la identificación a nivel de biovariedad, mediante la aglutinación con sueros monoespecíficos (anti-A y anti-M) y crecimiento en presencia de diversos colorantes (10, 20 y 40 µg/ml de tionina, 10 y 20 µg/ml de fucsina básica y 100 µg/ml de safranina). Por último, al tratarse de cepas rugosas de *Brucella*, se determinó también la sensibilidad de las mismas al fago R/C desde la dilución 0 (fago sin diluir) hasta la DCP (dilución más alta del fago que produce lisis bacteriana completa) sobre un tapiz de bacterias en medio semisólido (Alton *et al.*, 1988).

6.3 Análisis del crecimiento.

6.3.1 Preparación de los cultivos.

En primer lugar, se realizó un precultivo a partir de las cepas parental *B. ovis* PA y de las cepas mutantes y revertientes silvestres conservadas a -80°C. Para ello, se emplearon placas de TSA-YE-HS, suplementadas con 50 µg/ml de kanamicina en caso

necesario. La incubación de este precultivo se llevó a cabo a 37°C en una atmósfera al 10 % de CO₂, durante 48 horas. Posteriormente, de estos precultivos, se realizaron otros cultivos en las mismas condiciones, a partir de los cuales, se hicieron las suspensiones empleadas en los ensayos que se describen a continuación.

6.3.2 Recuento de Unidades Formadoras de Colonia/ml a partir de cultivos en medio sólido.

A partir de cultivos realizados como se explica en la anterior sección, se prepararon suspensiones iniciales de cada uno de ellos en 3 ml de tampón fosfato salino 10 mM, pH 7,2 (PBS) (Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, KCl 2,7 mM y NaCl 137 mM). Posteriormente, se midió la D.O._{600 nm} y se ajustó a un valor de 0,2 en PBS, el cual, corresponde en la cepa parental *B. ovís* PA, a 1 x 10⁹ UFC/ml aproximadamente. A partir de esta suspensión se realizaron seis diluciones decimales seriadas, sembrando a continuación, 100 µl en placas de TSA-YE-HS por triplicado de las diluciones 10⁻⁵ y 10⁻⁶. La incubación a 37 °C en atmósfera con 10 % de CO₂, se llevó a cabo hasta la aparición de colonias visibles (4 – 5 días). Los resultados obtenidos se expresaron como la media de UFC/ml en una suspensión de D.O._{600 nm} de 0,2 calculadas a partir de los recuentos obtenidos.

6.3.3 Crecimiento en medio líquido.

Con el fin de analizar el crecimiento en medio líquido de la cepa parental *B. ovís* PA y de las cepas mutantes y revertientes silvestres obtenidas, se realizó un seguimiento de la D.O._{600 nm} a lo largo del tiempo. Para ello, se realizó una suspensión de cada cepa en 30 ml de TSB-YE-HS a partir de una placa de 48 horas de crecimiento, ajustando la D.O._{600 nm} inicial a 0,05. Cuando fue necesario, el medio líquido de cultivo empleado se suplementó con 50 µg/ml de kanamicina. La incubación se llevó a cabo en agitación constante a 116 rpm, usando para ello, un agitador orbital OS 20 (BOECO), a 37 °C bajo una atmósfera de 10 % de CO₂, durante 72 horas. Durante todo este periodo, se midió la D.O._{600 nm} de cada cultivo a diferentes tiempos, realizando además, recuentos de UFC/ml a la 0, 24 y 48 horas, aproximadamente. Los resultados obtenidos se representaron en una gráfica donde se enfrentó la D.O._{600 nm} medida a lo largo del tiempo.

6.4 Estudio de las propiedades relacionadas con la membrana externa.

6.4.1 Autoaglutinación en medio líquido.

Para evaluar la capacidad de autoaglutinación a lo largo del tiempo de las cepas mutantes y revertientes obtenidas en este trabajo, se prepararon suspensiones en medio

TSB-YE-HS a partir de cultivos en placa, ajustadas a una D.O._{600 nm} de 0,8. A continuación, se depositó 1 ml de cada muestra en una cubeta semimicro para espectrofotometría y se midió la D.O._{600 nm} a diferentes tiempos, durante 45 horas aproximadamente, teniendo cuidado de no mover las cubetas. Este ensayo se realizó por triplicado, usando como controles, las cepas parentales correspondientes. Los resultados obtenidos se expusieron en una gráfica donde se enfrentó la D.O._{600 nm} medida a cada tiempo.

6.4.2 Sensibilidad a la polimixina B.

Para evaluar la sensibilidad al péptido catiónico polimixina B (SIGMA-ALDRICH) de las distintas cepas de *Brucella* se siguió el protocolo descrito por Martínez de Tejada *et al.*, 1995. En primer lugar, se prepararon suspensiones de células a una D.O._{600 nm} de 0,2 en PBS a partir de cultivos en placa de 48 horas de crecimiento en el caso de las cepas de *B. ovis* PA, y de 24 horas para el resto de especies de *Brucella*. Posteriormente, se realizaron varias diluciones en PBS hasta obtener una suspensión de bacterias que contenía 10⁴ UFC/ml (aproximadamente, cinco diluciones decimales seriadas). A continuación, en microplacas estériles de 96 pocillos (FALCON®), se mezclaron por triplicado 100 µl de cada muestra con 100 µl de PBS (control negativo) y con 100 µl de una preparación 2 mg/ml de polimixina B, quedando ésta finalmente, a una concentración de 1mg/ml. Por último, tras una hora de incubación a 37 °C, y después de mezclar bien el contenido de cada pocillo, se sembraron por duplicado, 50 µl en placas de TSA-HS-YE (con o sin antibiótico, dependiendo de la cepa sometida al estudio). Tras el periodo de incubación necesario, se realizaron los recuentos de UFC/placa obtenidos. Los resultados se expresaron como la media del porcentaje de UFC/placa ± la desviación estándar de dos experimentos independientes, tomando como el 100 % de supervivencia, el recuento total obtenido tras la exposición de cada cepa a PBS sin agente.

6.4.3 Sensibilidad al desoxicolato de sodio.

Siguiendo la metodología descrita para el ensayo de polimixina B, se llevó a cabo el ensayo de sensibilidad al detergente aniónico desoxicolato de sodio (SIGMA-ALDRICH) de las cepas descritas anteriormente (Ver Apartado 6.4.2). Las concentraciones en PBS empleadas de este agente fueron 2 mg/ml y 0,2 mg/ml, quedando finalmente a 1 mg/ml y 0,1 mg/ml, respectivamente. En todos los casos, se incluyó además, como control del 100 % de supervivencia, exposición únicamente a PBS. Los resultados obtenidos se expresaron también como la media del porcentaje de UFC/placa ± la desviación estándar de dos experimentos diferentes.

6.4.4 Sensibilidad a pH ácido.

Para analizar la sensibilidad a pH ácido que presentaban las distintas cepas derivadas de *B. ovis* PA obtenidas en el presente trabajo, se siguió un protocolo similar al realizado para evaluar la sensibilidad presentada al péptido catiónico polimixina B (Ver Apartado 6.4.2). Para ello, partiendo de cultivos en placa con 48 horas de crecimiento, se prepararon suspensiones a una D.O._{600 nm} de 0,2 en PBS, y posteriormente, se realizaron cinco diluciones decimales seriadas, tanto en PBS como en tampón citrato a pH 4 (Ácido cítrico monohidrato 25 mM, NaCl 120 mM), hasta obtener aproximadamente 10⁴ UFC/ml. A continuación, se depositaron, por triplicado, 100 µl de cada suspensión en pocillos de microplacas estériles que contenían 100 µl de PBS ó 100 µl de tampón citrato a pH 4, según el diluyente usado. Tras mezclar bien con ayuda de una micropipeta, se incubó la microplaca 5 horas a 37 °C. Transcurrido este periodo de tiempo, se sembraron por duplicado 50 µl de cada mezcla en placas de TSA-HS-YE. Los recuentos obtenidos tras la exposición a pH ácido en dos experimentos independientes se expresaron como la media del porcentaje de UFC/placa ± la desviación estándar, tomando como el 100 % de supervivencia, la media de los recuentos totales observada en los ensayos realizados con PBS.

6.4.5 Sensibilidad al peróxido de hidrógeno.

Para evaluar la sensibilidad al peróxido de hidrógeno de las diferentes cepas se empleó el protocolo descrito por Elzer *et al.*, 1994, con unas pequeñas modificaciones. En primer lugar, se prepararon suspensiones en PBS a una D.O._{600 nm} de 0,2 de cada cepa a evaluar y a continuación, por triplicado, se sembraron 100 µl en placas de TSA-HS-YE (con o sin antibiótico requerido según el caso). Posteriormente, se colocó en el centro de cada placa un disco de papel Whatman 3MMChr de 9 mm y sobre él, se depositaron 10 µl de H₂O₂ al 30 % (SIGMA-ALDRICH). Por último, tras un periodo de incubación a 37 °C con o sin atmósfera de CO₂ al 10 % (según la cepa sometida a estudio), se analizaron los diámetros de los halos de inhibición obtenidos realizando 4 medidas en cada placa empleada en el ensayo. Los resultados se expresaron como la media ± la desviación estándar del diámetro del halo de inhibición observado de las tres placas.

6.4.6 Sensibilidad al suero no inmune humano.

Para llevar a cabo este estudio, se extrajo sangre procedente de un individuo sin exposición previa a *Brucella* spp. Tras eliminar el coágulo, las muestras se centrifugaron (10.000 x g 10 minutos) e, inmediatamente, el suero sobrenadante se conservó a -20 °C para ser utilizado a las 24-48 horas después de su obtención.

Previamente a la realización de los diferentes ensayos de sensibilidad, se evaluaron los niveles de anticuerpos presentes en el suero frente a células enteras de *B. abortus* 2308, *B. melitensis* Rev1 y *B. ovis* PA mediante la técnica de ELISA indirecto, siendo éstos equivalentes a un suero control negativo. Por ello, se procedió posteriormente a la evaluación de las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ incluidas en este tipo de ensayo, el cual fue llevado a cabo según el protocolo descrito por Corbeil *et al.*, 1988, con algunas modificaciones. Así, se prepararon suspensiones bacterianas en PBS a una D.O._{600 nm} de 0,2 a partir de cultivos en placa, las cuales se diluyeron cuatro veces decimalmente. A continuación, según la cepa a analizar, se realizó una nueva dilución con el objeto de obtener una concentración bacteriana de 2×10^4 UFC/ml (una dilución 1/5 para las cepas de *B. canis*, 1/8 para las de *B. abortus* y 1/3 para las de *B. neotomae*). Seguidamente, se mezclaron por triplicado, 50 μ l de cada suspensión en pocillos de microplacas estériles que contenían 150 μ l de suero no inmune humano o 150 μ l del mismo suero pero descomplementado a 56 °C durante 30 minutos. Tras 4 horas de exposición, se sembraron por duplicado 50 μ l de cada mezcla en placas de TSA-HS-YE, las cuales se incubaron hasta obtener colonias visibles. Finalmente, se recontaron las UFC/placa obtenidas y los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar de los porcentajes de supervivencia observados en dos experimentos independientes, referenciados al control realizado con el suero no inmune humano descomplementado (valor 100 % de supervivencia).

7. ANÁLISIS DE LA VIRULENCIA EN RATÓN DE CEPAS MUTANTES Y SILVESTRES DE *Brucella*.

7.1 Estudio de la cinética de multiplicación esplénica de diferentes cepas mutantes de *Brucella*.

Para llevar a cabo el estudio de la cinética de multiplicación esplénica de las diferentes cepas analizadas se emplearon ratones hembra de raza BALB/c (Charles River, Francia) de 6 – 8 semanas de vida, adquiridos 1 semana antes de comenzar los experimentos. Éstos se mantuvieron en el Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca, en jaulas adecuadas con agua y alimento *ad libitum*.

Inicialmente se preparon en PBS, suspensiones de cada cepa objeto de estudio utilizando precultivos en medio sólido de 48 horas de crecimiento realizados a partir de las bacterias conservadas a -80 °C. A continuación, por vía intraperitoneal y en un volumen de 0,5 ml, se administraron dosis de cada cepa a evaluar de aproximadamente 1×10^6 ó 5×10^6 UFC/ratón, según el experimento.

Para analizar la evolución de la infección, se realizaron recuentos esplénicos a diferentes tiempos p.i.. De este modo, se sacrificaron 5 ratones por cepa mediante dislocación cervical y se extrajeron los bazos en condiciones asépticas. Cada uno de ellos, una vez pesado, se homogenizó individualmente en bolsas estériles en un volumen de PBS 9 veces su peso (dilución 1:10 peso/volumen), usando para ello un Stomacher® 80 BIOMASTER (Seward). Posteriormente, 100 µl de cada homogenizado se sembraron por triplicado en placas de TSA-HS-YE, así como también, de diluciones decimales seriadas (v/v) realizadas en PBS. Las placas se incubaron hasta visualizar colonias a 37 °C en una atmósfera de 10 % de CO₂, excepto para las cepas de *B. canis*.

A partir de aquellas placas que presentaron recuentos entre 30 – 300 UFC en los 100 µl sembrados, se realizaron los correspondientes cálculos para determinar el número de UFC/bazo obtenido. Cuando los recuentos fueron entre 0 – 30 UFC en las placas sembradas directamente con el homogenizado del bazo no diluido, los cálculos se realizaron a partir de éstas, teniendo en cuenta a su vez, que el nivel de detección del método empleado se estima en 3,33 UFC/bazo. Finalmente, los resultados se transformaron en logaritmo (log) individualmente para normalizar la distribución de los datos intragrupo (Montaraz and Winter, 1986). De este modo, los niveles de infección se expresaron como la media ± la desviación estándar ($n=5$) del log UFC/bazo para cada grupo de animales en cada tiempo p.i. analizado.

7.2 Estudio de la cinética de multiplicación intracelular de diversas cepas de *Brucella* en macrófagos esplénicos.

Cinco ratones BALB/c se infectaron con suspensiones bacterianas de cada cepa de *Brucella* bajo estudio preparadas en PBS a partir de cultivos en placa. La dosis infectante fue de 5×10^6 UFC/ml para *B. ovis* PA, *B. canis* RM6/66 y *B. abortus* 2308, y de 5×10^8 para *B. abortus* RB51. Transcurridas 3 semanas p.i. en el caso de las cepas rugosas y 1 semana p.i. en el caso de las cepas lisas, los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical y se extrajeron los bazos en condiciones estériles. Cada uno de ellos se homogenizó en 10 ml de medio DMEM (ver Apartado 8.2) y posteriormente, los 50 ml de homogenizado resultante se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm. A continuación, se retiró el sobrenadante y el sedimento obtenido se resuspendió en 10 ml de tampón de lisis de eritrocitos (Cloruro de amonio 154mM, Bicarbonato potásico 10 mM y EDTA-Na²⁺ 0,082mM). Seguidamente, se mantuvo en hielo durante 5 minutos en agitación suave y después se realizaron dos lavados con 10 ml de medio DMEM, centrifugando cada vez, 5 minutos a 1500 rpm. Una vez realizado el último lavado, las células se resuspendieron en 10 ml de medio DMEM suplementado con 100 µg/ml de gentamicina (SIGMA-ALDRICH), y se mantuvieron durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave con el fin de eliminar todas las bacterias extracelulares

existentes. Pasado el periodo de incubación, se tiñeron las células con Azul Tripano al 0,4 % en agua (Merck) con la finalidad de verificar su viabilidad y de proceder a su recuento en cámara de Neubauer. En todos los casos, el número de células recontadas osciló entre 80 y 150 x 10⁵ células/ml, las cuales se repartieron en placas de cultivo de 24 pocillos (1ml/pocillo) e incubadas durante 30 minutos a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂. Finalmente, los cultivos de macrófagos esplénicos infectados obtenidos se lisaron a diferentes tiempos p.i. para evaluar el número de bacterias intracelulares viables, considerando como tiempo= 0 horas, el transcurrido tras la última media hora de incubación. Para ello, las células se lavaron 3 veces con medio DMEM y a continuación, se incubaron durante 5 minutos con 1 ml de una solución 0,1 % de Tritón X-100 (SIGMA-ALDRICH) en PBS. Los lisados se sembraron en placas de TSA-HS-YE, así como también, varias diluciones decimales de los mismos. Por último, se realizaron los recuentos de las colonias crecidas y los resultados se expresaron como la media ± desviación estándar del logaritmo de las UFC/ml obtenidas ($n=4$), a cada tiempo de análisis p.i.

8. CULTIVOS DE CÉLULAS HeLa, MACRÓFAGOS J774.A1 Y ENSAYOS DE INFECCIÓN.

8.1 Líneas celulares empleadas.

Las líneas celulares utilizadas para la realización del presente trabajo fueron las siguientes:

- Línea celular HeLa (ATCC CCL-2): células epiteliales humanas procedentes de un carcinoma cervical.
- Línea celular de macrófagos J774.A1 (DSMZ ACC170): células macrofágicas derivadas de un sarcoma reticular murino.

8.2 Medios y condiciones de cultivo.

Ambas líneas celulares se cultivaron de forma rutinaria en placas de 100 x 20 mm (Falcon®), a 37 °C y bajo una atmósfera controlada con elevada humedad y 5 % de CO₂. El medio de cultivo empleado fue el medio basal de Eagle modificado por Dulbecco [Dulbecco's modified Tagle Medium (DMEM)] (Gibco-BRL), suplementado con suero bovino fetal (SBF) (Gibco-BRL); un 5 % (v/v) para células HeLa y un 10 % (v/v) para la línea macrofágica, y con 4 mM de L-glutamina (Gibco-BRL) (medio DMEM completo).

Cuando las líneas celulares alcanzaron un 75 % de confluencia en la placa de cultivo, se procedió a realizar subcultivos. Para ello, en primer lugar, se llevó a cabo un lavado con PBS o con TEN (Tris-HCl 40 mM, EDTA-Na²⁺ 1 mM y NaCl 150 mM, a pH 7,5)

de las células HeLa y de los macrófagos J774.A1, respectivamente, y a continuación, se desprendieron de la placa mediante la utilización de una solución de tripsina-EDTA al 25% (Gibco-BRL) para las primeras, y mediante levantamiento mecánico por raspado, para las segundas. Posteriormente, tras ser resuspendidas y diluidas (1:10 para cultivos de HeLa y 1:4 para macrófagos J774.A1) en medio DMEM-completo, las células se depositaron en nuevas placas de cultivo.

El seguimiento de los cultivos se llevó a cabo mediante la utilización de un microscopio invertido CK2 OLYMPUS y tinción con Azul Tripano al 0,4 % en agua (Merck) para controlar su viabilidad.

8.3 Congelación y almacenamiento de las líneas celulares.

A partir de los cultivos iniciales de las líneas celulares empleadas, se guardaron viales en Nitrógeno líquido a una temperatura de aproximadamente -196 °C para su almacenamiento y conservación. Para ello, se recogieron las células de una placa al 75 – 80 % de confluencia en medio y se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 rpm. Posteriormente, el *pellet* obtenido se resuspendió en 1 ml de medio DMEM-completo con DMSO al 10 % (v/v) y se guardó en un criovial a la temperatura adecuada.

8.4 Ensayos de infección.

Previamente a la infección, se prepararon suspensiones celulares en medio DMEM-completo a una concentración de 1×10^5 células/ml, utilizando para el recuento, una cámara de Neubauer. Posteriormente, las células se distribuyeron en placas de cultivo de 24 pocillos (1 ml/pocillo) y se incubaron durante 18 horas, en el caso de células HeLa, y 24 horas, para macrófagos J774.A1.

Las cepas de *Brucella* que se utilizaron para llevar a cabo los ensayos de infección, se cultivaron en placas de TSA-HS-YE (suplementadas o no con el antibiótico necesario) durante 24 y 48 horas, y a continuación, resuspendidas en PBS. A partir de estas suspensiones resultantes, cuantificadas a través de su $D.O_{600 \text{ nm}}$, se prepararon otras diluidas en medio DMEM-completo para ser empleadas en las infecciones a una multiplicidad de infección (MOI) de 200 y de 400 UFC para los macrófagos murinos J774.A1 y la línea celular HeLa, respectivamente. Una vez depositada la cantidad de bacterias deseada (en 1 ml/pocillo), las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante 1 ó 4 horas, según el ensayo a realizar. Transcurrido el periodo de incubación, las monocapas celulares se lavaron 1 vez con medio y se reincubaron en DMEM-completo suplementado con 100 µg/ml de gentamicina (SIGMA-ALDRICH), con el fin de eliminar las bacterias extracelulares.

A distintos tiempos p.i., considerando como punto inicial de análisis (tiempo=0 horas) el transcurrido tras una hora de incubación con gentamicina, las células se lavaron 3 veces con medio DMEM para eliminar posibles restos del antibiótico. Con el fin de cuantificar el número de bacterias intracelulares viables, las células se incubaron durante 5 minutos en 1 ml de una solución 0,1 % de Tritón X-100 (SIGMA-ALDRICH) en PBS y los lisados obtenidos, se diluyeron decimalmente y se sembraron en placas de TSA-HS-YE (suplementadas o no con el antibiótico necesario según la cepa empleada). Una vez realizado el recuento de las colonias crecidas, se procedió a expresar los resultados obtenidos como la media \pm desviación estándar del logaritmo de las UFC/ml observadas ($n=4$), a cada tiempo de análisis p.i.

8.5 Tratamientos previos al periodo de infección de los cultivos celulares.

Monocapas de aproximadamente 1×10^5 células cultivadas en placas de 24 pocillos se trataron con diversos agentes con el fin de evaluar el efecto que ejercían éstos sobre la internalización de *B. abortus* 2308, *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66. Una vez realizado el tratamiento correspondiente, las células se lavaron una vez con medio DMEM y se infectaron durante 1 hora con la cepa bajo estudio. Finalmente, se determinaron las bacterias intracelulares viables siguiendo la metodología descrita en el Apartado anterior.

8.5.1 Tratamiento con filipina, β -metil-ciclodextrina y subunidad B de la toxina colérica.

Durante 45 minutos previos a la infección bacteriana, las células se incubaron con concentraciones crecientes (4 pocillos por concentración utilizada) de filipina (entre 0 y 5 $\mu\text{g/ml}$) (SIGMA-ALDRICH), de β -metil-ciclodextrina (entre 0 y 20 mM) (SIGMA-ALDRICH) y de la subunidad B de la toxina colérica (entre 0 y 40 $\mu\text{g/ml}$) (Invitrogen, San Diego, CA), disueltas en medio DMEM-completo.

8.5.2 Tratamiento con diferentes preparaciones de lipopolisacáridos purificados.

Macrófagos murinos cultivados en placas de 24 pocillos, se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂ durante 35 minutos con 1 ml de medio completo que contenía 300 μg de lipopolisacárido purificado de las especies *B. abortus* 2308, *B. melitensis* 16M y *B. abortus* 9.49 (mutante rugoso), los cuales fueron proporcionados por el Dr. Ignacio Moriyón Uría de la Universidad de Pamplona (Monreal *et al.*, 2003). Como controles, en estos ensayos se empleó la misma concentración de lipopolisacárido

de *E. coli* O111:B4 (SIGMA-ALDRICH) y de los ácidos policitídílico y poliinosínico (SIGMA-ALDRICH). Una vez transcurrido este periodo de tiempo, se procedió a realizar la infección de las células (3 pocillos/cepa).

8.5.3 Tratamiento con wortmanina.

Macrófagos J774.A1 cultivados en placas de 24 pocillos se trataron 1 hora antes y durante el periodo de infección con wortmanina (SIGMA-ALDRICH) preparada en medio DMEM-completo a una concentración de 100 nM. Se trataron 4 pocillos por cada cepa de *Brucella* analizada.

8.6 Evaluación de la citotoxicidad.

Para analizar si la viabilidad de los distintos cultivos celulares empleados en este estudio se veía afectada por los tratamientos realizados, se realizaron pruebas colorimétricas que evaluaban la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Ésta es liberada al medio de cultivo al permeabilizarse la membrana de células muertas, siendo por tanto, un indicador de citotoxicidad. Para llevar a cabo estos ensayos, se empleó el *kit* "CytoTox 96 non-radioactive" de Promega Corp., siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante.

9. MÉTODOS ESTADÍSTICOS EMPLEADOS.

Las comparaciones estadísticas entre diferentes grupos se llevaron a cabo empleando el Test de Mínimas Diferencias Significativas Protegidas de Fisher (Programa Statview), considerándose significativas aquellas diferencias que presentaron valores $P \leq 0,05$.

Resultados

1. ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES ESTABLECIDAS ENTRE ESPECIES NATURALMENTE RUGOSAS DE *Brucella* Y LAS CÉLULAS FAGOCÍTICAS.

1.1 Evaluación del efecto citotóxico y de los niveles de activación celular como respuesta a una infección por especies naturalmente rugosas de *Brucella*.

Los resultados previos obtenidos en diversas investigaciones señalan la existencia de un brusco descenso en la supervivencia intracelular de cepas mutantes rugosas derivadas de especies lisas de *Brucella* como consecuencia de un elevado efecto citotóxico y de un fuerte estado de activación de los macrófagos infectados (Fernández-Prada *et al.*, 2003; Pei and Ficht, 2004; Pei *et al.*, 2008b). En vista de los cuales, un primer objetivo del presente trabajo fue el analizar si especies naturalmente rugosas de *Brucella* que carecen también de cadenas polisacáridicas *O* en su LPS, muestran este mismo comportamiento.

Con este fin, evaluamos la citotoxicidad que se producía al establecerse una infección por *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66, dos especies naturalmente rugosas, tanto en células fagocíticas profesionales como en no profesionales. Para ello, se emplearon cultivos de macrófagos murinos J774.A1 y de células epiteliales HeLa, respectivamente. Como controles se utilizaron una cepa lisa de *Brucella*, *B. abortus* 2308, y una cepa mutante rugosa derivada de ésta, *B. abortus* RB51. Tras un periodo de incubación de 4 horas con suspensiones bacterianas de cada cepa, preparadas tal y como se describe en el Apartado 8.4 de Materiales y Métodos, se determinó en los sobrenadantes, a diferentes tiempos p.i., la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) como un indicador de la citotoxicidad producida por la infección (ver Apartado 8.6 de Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos mostraron que, bajo nuestras condiciones experimentales, se producía una mayor muerte celular en cultivos de células HeLa infectados con la cepa mutante rugosa *B. abortus* RB51 a las 24 y 48 horas p.i. (un 16,84 y 32,37 %), en comparación con lo acontecido en el transcurso de una infección por *B. abortus* 2308, en la cual la muerte celular del cultivo no era superior a un 6,85 % (Tabla XVI). Por el contrario, no se detectaron diferencias significativas entre los porcentajes de muerte celular observados a lo largo del tiempo tanto en cultivos de células HeLa infectados con *B. ovis* PA, *B. canis* RM6/66 o *B. abortus* 2308, como en cultivos de macrófagos J774.A1 infectados con cada una de las cuatro especies de *Brucella* señaladas (Tabla XVI). Estos resultados indican la ausencia, por tanto, de un efecto citotóxico en los dos tipos de cultivos celulares utilizados como resultado de una infección por las especies naturalmente rugosas, *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66.

Tabla XVI. Estudio de la citotoxicidad (determinada como el % de muerte celular) producida en cultivos de células HeLa y macrófagos J774.A1 como consecuencia de una infección por *B. ovis* PA, *B. canis* RM6/66, *B. abortus* 2308 y *B. abortus* RB51.

Especie	% Muerte celular ^a					
	Células HeLa			Células J774.A1		
	Horas post-infección					
	4	24	48	4	24	48
<i>B. abortus</i> 2308	4.36 ± 0.72	0.80 ± 0.77	6.85 ± 2.71	1.10 ± 0.32	3.22 ± 0.43	5.58 ± 0.76
<i>B. ovis</i> PA	4.36 ± 0.30	3.42 ± 2.92	4.86 ± 2.11	1.35 ± 1.02	5.57 ± 0.32	4.21 ± 1.09
<i>B. canis</i> RM6/66	3.61 ± 2.84	1.17 ± 1.63	5.83 ± 4.57	1.07 ± 1.97	3.27 ± 1.42	7.68 ± 2.33
<i>B. abortus</i> RB51	4.57 ± 0.68	16.64 ± 1.06*	32.37 ± 9.75*	0.91 ± 0.05	4.73 ± 0.87	8.17 ± 0.55

^aEl porcentaje de muerte celular a cada tiempo p.i. fue calculado como: 100 (LDH cultivo infectado - LDH cultivo no infectado) / (LDH total del cultivo - LDH cultivo no infectado). Los datos que se muestran representan las medias ± desviaciones estándar de cuatro mediciones independientes.

Símbolo *: $P \leq 0,0001$.

Una vez analizada la citotoxicidad, procedimos a evaluar también el grado de activación que presentaban los macrófagos J774.A1 tras la infección. Para ello, mediante ensayos de Sándwich-ELISA, evaluamos los niveles de TNF α e IL12 (p40) existentes en los sobrenadantes recogidos a diferentes tiempos p.i. (ver Apartado 3.8.4 de Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos demostraron que no existían diferencias significativas entre la producción de ambas citoquinas en las células J774.A1 infectadas por *B. abortus* 2308 y por las cepas naturalmente rugosas *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66, siendo estos niveles inferiores a 100 pg/ml (Figura 18A y 18B). En contraste, no sucedía lo mismo en aquellos macrófagos que habían sido infectados por *B. abortus* RB51. En éstos se pudieron apreciar niveles significativamente mayores de TNF α a las 24 y 48 horas p.i. (<250 pg/ml) y de IL12 a las 48 horas p.i. (213,65 pg/ml) (Figura 18A y 18B). Por tanto, únicamente la infección causada por la cepa mutante rugosa *B. abortus* RB51 fue la que desencadenó un fuerte estado de activación en los cultivos de las células fagocíticas.

1.2 Evaluación de la tasa de multiplicación intracelular de *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66 en células fagocíticas profesionales.

En base a los resultados previamente obtenidos, en los cuales demostramos que las infecciones por las dos especies naturalmente rugosas, *B. ovis* y *B. canis* no ejercían un efecto citotóxico sobre los cultivos celulares utilizados, ni tampoco provocaban una fuerte activación de los macrófagos murinos, decidimos analizar la cinética de supervivencia intracelular que presentaban ambas cepas. Para ello, llevamos a cabo diversos ensayos de infección en cultivos de células fagocíticas profesionales, usando como controles, la cepa lisa *B. abortus* 2308 y el mutante rugoso de ésta, *B. abortus* RB51. En primer lugar, evaluamos *ex vivo* el número de bacterias intracelulares y su evolución a lo largo del tiempo en un cultivo de macrófagos esplénicos obtenidos a partir

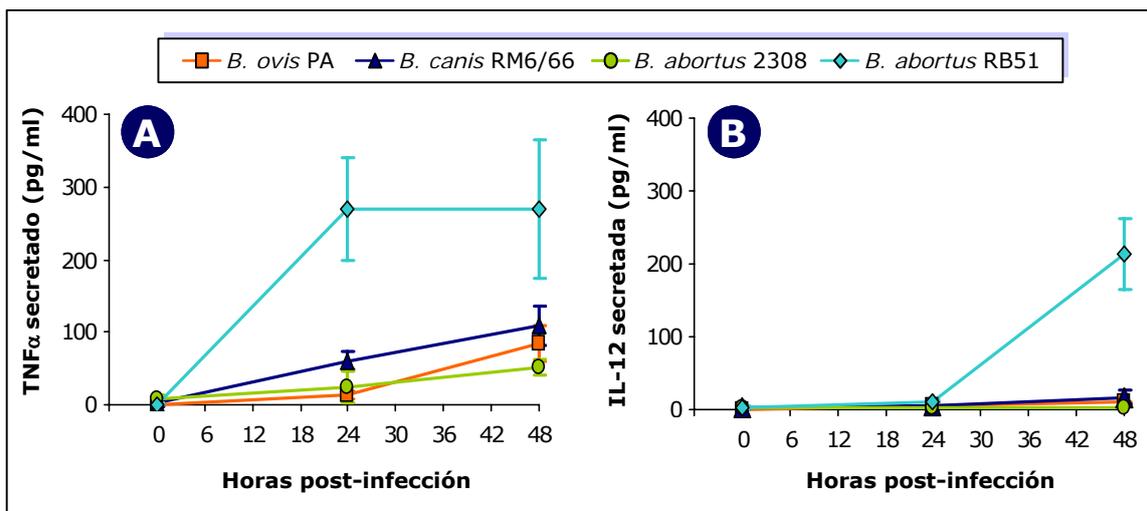


Figura 18. Nivel de activación de macrófagos murinos J774.A1 durante el transcurso de una infección causada por especies naturalmente rugosas de *Brucella*. Cultivos de células J774.A1 incubados durante 4 horas con las cepas *B. ovis* PA, *B. canis* RM6/66, *B. abortus* 2308 o *B. abortus* RB51 (MOI de 200 UFC/célula), se lavaron una vez con medio y se sometieron a un tratamiento con gentamicina 1 hora. Posteriormente, se recogieron los sobrenadantes celulares y se determinaron los niveles de TNF α (A) e IL12 (B) mediante la técnica de Sándwich-ELISA. Los valores representados constituyen la media \pm desviación estándar de cuatro determinaciones diferentes.

de cinco bazos de ratones BALB/c infectados con cada una de las cepas de *Brucella* bajo estudio (ver Apartado 7.2 de Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos demostraron que la cepa rugosa *B. ovis* PA presentaba un incremento de 0,5 unidades logarítmicas en el número de bacterias intracelulares a las 72 horas de incubación (Figura 19A). En cambio, observamos que tanto en el caso de *B. abortus* 2308 como en el de *B. canis* RM6/66, el número de bacterias intracelulares se mantenía casi invariable hasta las 48 horas de cultivo, y posteriormente descendía a las 72 horas de incubación (Figura 19A). Por último, la cepa mutante rugosa *B. abortus* RB51, aparte de presentar inicialmente un número inferior de bacterias intracelulares, fue eliminada por las células fagocíticas en el transcurso de las primeras 24 horas de incubación (Figura 19A).

Posteriormente, analizamos también la capacidad de multiplicación intracelular que presentaban las cuatro especies de *Brucella* estudiadas en cultivos de macrófagos murinos J774.A1. Las curvas de multiplicación intracelular obtenidas tras cada ensayo de infección realizado bajo las condiciones señaladas en el Apartado 8.4 de Materiales y Métodos, revelaron que tanto la cepa lisa *B. abortus* 2308 como las dos cepas naturalmente rugosas, *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66, eran capaces de sobrevivir y de multiplicarse intracelularmente a lo largo del tiempo (Figura 19B). Por el contrario, la cepa mutante rugosa *B. abortus* RB51 no mostró tener tal capacidad de replicación en macrófagos J774.A1, observándose un descenso de 1,69 unidades logarítmicas en el recuento del número de bacterias intracelulares a las 72 horas p.i. (Figura 19B).

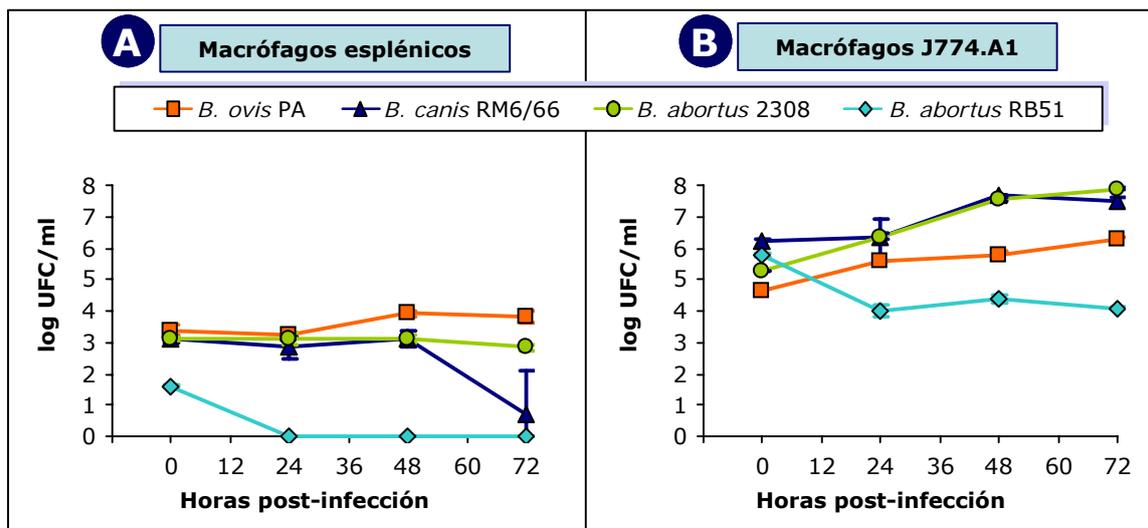


Figura 19. Análisis de la capacidad de proliferación de *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66 en células fagocíticas profesionales. **A.** Cultivos de macrófagos esplénicos, obtenidos de ratones infectados con las cepas *B. ovis* PA, *B. canis* RM6/66, *B. abortus* 2308 y *B. abortus* RB51, se lisaron a diferentes tiempos de incubación y se cuantificaron las bacterias intracelulares existentes mediante recuento en placa. **B.** Cultivos de macrófagos murinos J774.A1 se mantuvieron durante 4 horas en contacto con suspensiones bacterianas de cada cepa de *Brucella* (MOI = 200 UFC/célula). Tras un lavado con medio, los cultivos se incubaron 1 hora con gentamicina y se lisaron a diferentes tiempos p.i. con el fin de determinar el número de bacterias intracelulares. Los resultados representan la media \pm desviación estándar ($n = 4$) del logaritmo de las UFC/ml obtenidas.

Por tanto, ambas cepas rugosas naturales *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66 poseen un comportamiento intracelular discrepante al exhibido por la cepa mutante rugosa *B. abortus* RB51, siendo más cercano al mostrado por la especie lisa usada como control.

1.3 Estudio de los mecanismos de infección de especies naturalmente rugosas de *Brucella* en macrófagos murinos.

1.3.1 Análisis del papel desempeñado por los "lípidos rafts" en la infección y multiplicación intracelular de *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66 en macrófagos J774.A1.

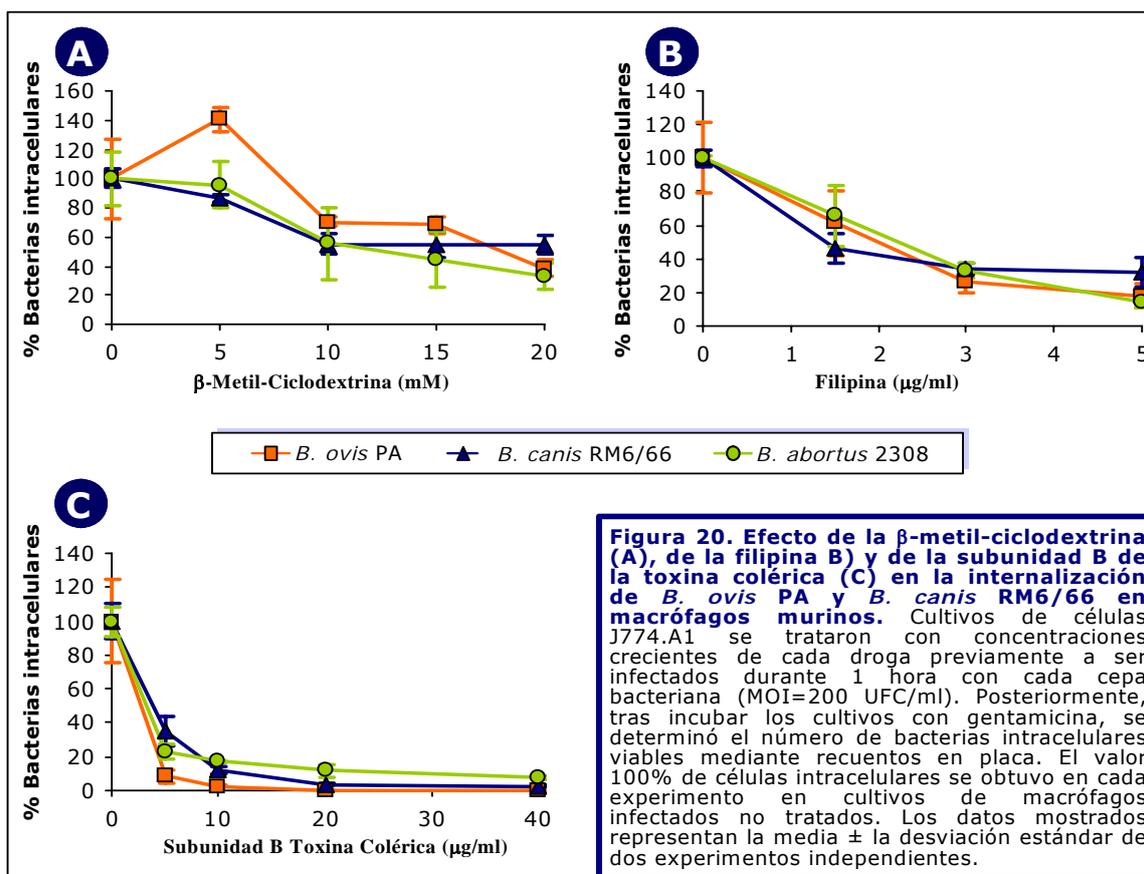
Estudios previos han demostrado que las especies lisas de *Brucella* penetran en los macrófagos murinos a través de una vía de entrada mediada por los "lípidos rafts" asociada a una ruta endocítica en la cual, la bacteria es transportada en una vacuola denominada BCV ("*Brucella*-containing vacuole"). A lo largo del tráfico intracelular, ésta sufre interacciones transitorias con los endosomas y termina por fusionarse con el retículo endoplasmático, lo que permite el desarrollo de un fagosoma replicativo óptimo para la multiplicación de la bacteria (Kim *et al.*, 2002; Naroeni and Porte, 2002; Watarai *et al.*, 2002a; Porte *et al.*, 2003; Pei *et al.*, 2008a). Por el contrario, se ha observado que cepas mutantes rugosas obtenidas a partir de especies lisas, no utilizan esta puerta de entrada y son destruidas rápidamente por fusión de las BCVs que las transportan con los

lisosomas (Porte *et al.*, 2003). En vista de los resultados obtenidos anteriormente en los que observamos que las cepas *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66 eran capaces de sobrevivir e incluso, de multiplicarse en el tiempo en macrófagos J774.A1, decidimos analizar si los "lípidos rafts" se encontraban involucrados en los mecanismos de infección empleados por estas dos cepas naturalmente rugosas. Con este fin, previo a la infección, se trataron cultivos de macrófagos J774.A1 con concentraciones crecientes de distintos agentes que alteran la formación de los "lípidos rafts" como: la β -metil-ciclodextrina y la filipina, que secuestran y unen colesterol de la membrana plasmática respectivamente, y la subunidad B de la toxina colérica, que bloquea moléculas del gangliósido GM₁ al unirse a ellas (Naroeni and Porte, 2002; Porte *et al.*, 2003) (ver Aparto 8.5.1 de Materiales y Métodos). Tras comprobar por análisis de la actividad LDH que la viabilidad de los macrófagos no se veía afectada por estos tratamientos (datos no mostrados), los cultivos celulares se infectaron con *B. ovis* PA, *B. canis* RM6/66 o con la cepa lisa *B. abortus* 2308, la cual fue usada como control. Los recuentos de UFC/ml obtenidos después de la primera hora p.i. revelaron la existencia de un descenso significativo en el número de bacterias viables intracelulares, en comparación con los controles realizados paralelamente en cultivos no tratados (Figura 20A, 20B y 20C). Estos resultados sugieren por tanto, que la internalización y la supervivencia a corto tiempo de *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66 en macrófagos murinos se encuentran asociadas a una ruta de entrada a las células fagocíticas mediada por dos componentes principales de los "lípidos rafts", el colesterol y el GM₁.

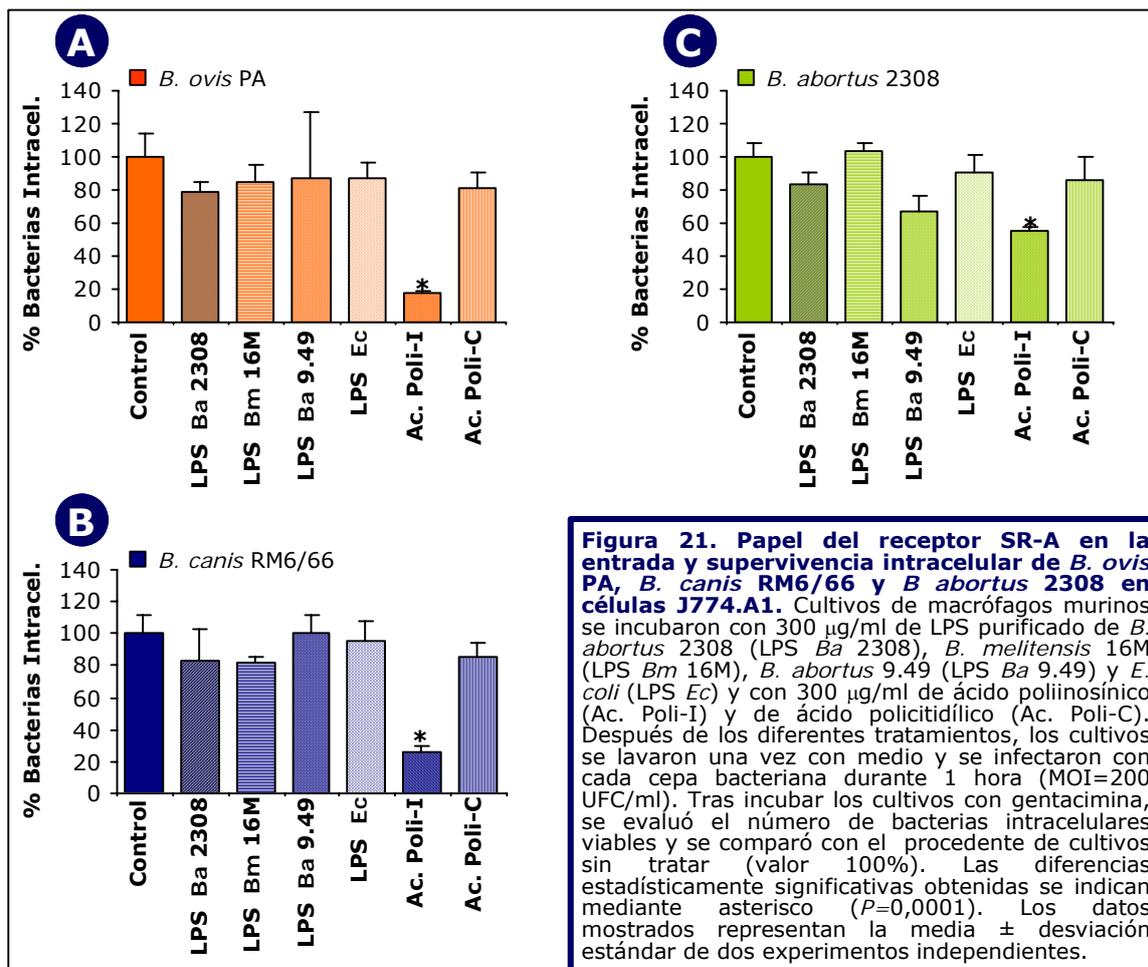
Por otra parte, en vista de los resultados obtenidos y con el fin de determinar si uno de los componentes asociado a los "lípidos rafts", el colesterol, poseía algún papel relevante en la multiplicación intracelular de *B. abortus* 2308 y de las cepas naturalmente rugosas, *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66 en las células J774.A1, analizamos la evolución que seguía el número de bacterias intracelulares que penetraba en cultivos de macrófagos tratados con la máxima concentración de β -metil-ciclodextrina y filipina utilizada en el experimento anterior (20 mM y 5 μ g/ml, respectivamente). Los resultados obtenidos demostraron que las tres cepas fueron capaces de replicarse en los cultivos tratados con los dos agentes a las 48 horas p.i. siguiendo además un patrón de multiplicación intracelular muy similar al observado por cada cepa en cultivos controles sin tratar (datos no mostrados).

1.3.2 Análisis del papel llevado a cabo por el receptor SR-A en la internalización de *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66 en macrófagos murinos.

Una vez comprobada la utilización de una ruta de entrada en los macrófagos mediada por componentes de los "lípidos rafts" (el colesterol y el GM₁) por parte de



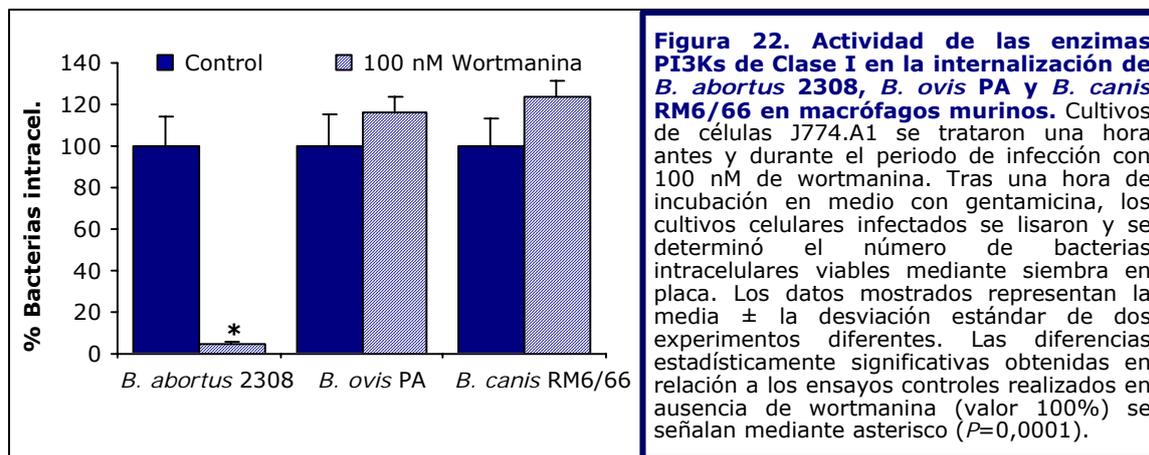
B. ovis PA y *B. canis* RM6/66, decidimos evaluar si en esta internalización se encuentra implicado también el receptor SR-A, ya que éste es empleado por la especie lisa *B. abortus* en su entrada a la célula fagocítica mediante dominios lipídicos (Kim *et al.*, 2004). Para ello, pretratamos cultivos de macrófagos J774.A1 con diferentes ligandos de este receptor, con el fin de bloquearlo y analizar posteriormente, la tasa de penetración intracelular de ambas especies rugosas naturales y de la cepa lisa *B. abortus* 2308 (ver Apartado 8.5.2 de Materiales y Métodos). Bajo nuestras condiciones experimentales, pudimos observar que ninguno de los LPS purificados utilizados, obtenidos de *E. coli*, de la cepa rugosa *B. abortus* 9.49 y de las cepas lisas *B. abortus* 2308 y *B. melitensis* 16M, ejercían un efecto significativo en la entrada y supervivencia intracelular de las tres cepas de *Brucella* estudiadas (Figura 21A, 21B y 21C). En contraste, el número de bacterias intracelulares viables sí que sufría un fuerte descenso cuando los cultivos de macrófagos murinos eran tratados con un conocido ligando del receptor SR-A, el ácido poliinosínico. Este hecho no sucedía en cambio, cuando las células J774.A1 eran incubadas con ácido policitidílico, el cual no presenta afinidad por el receptor (Figura 21A, 21B y 21C). En vista entonces de los resultados obtenidos, SR-A podría ser un receptor importante para la internalización de ambas cepas naturalmente rugosas en las células fagocíticas.



1.3.3 Análisis del papel de la actividad enzimática de las PI3Ks en la entrada de *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66 en macrófagos murinos.

Investigaciones previas han demostrado que la entrada y multiplicación intracelular de especies lisas de *Brucella*, tales como *B. abortus* y *B. melitensis*, en la célula hospedadora es dependiente de la actividad de las enzimas PI3Ks de la Clase I. Por el contrario, esta actividad no parece tener un papel relevante en los procesos infecciosos establecidos por cepas mutantes rugosas generadas a partir de especies lisas de *Brucella* (Pei *et al.*, 2008a; Qin *et al.*, 2008). Con el fin de determinar si los mecanismos de infección empleados por las cepas naturalmente rugosas *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66 son dependientes de la actividad de las enzimas PI3Ks, tratamos los cultivos de macrófagos J774.A1 con un inhibidor específico de éstas, la wortmanina, una hora antes y durante el periodo de infección con las cepas de *Brucella* bajo estudio y la cepa lisa *B. abortus* 2308 utilizada como control (Ver Apartado 8.5.3 de Materiales y Métodos). Los recuentos de las bacterias intracelulares presentes revelaron la ausencia de un efecto

significativo del tratamiento en el establecimiento de la infección de *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66 a diferencia de lo que sucedía en los ensayos de infección realizados con la cepa lisa (Figura 22). Estos resultados demuestran por tanto, que en el caso de las cepas naturalmente rugosas *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66, la actividad de las enzimas PI3Ks de Clase I no es requerida para su internalización y supervivencia a corto tiempo en cultivos de macrófagos murinos.



2. ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN E IMPLICACIÓN EN VIRULENCIA DE LAS PMEs DE LA FAMILIA *Omp25/Omp31* EN *B. ovis* PA Y EN OTRAS ESPECIES DE *Brucella*.

2.1 Estudio de la capacidad infectiva y de multiplicación intracelular de cepas mutantes de *B. ovis* PA en los genes de la familia *omp25/omp31* en cultivos celulares.

En un trabajo previo en nuestro laboratorio, se generó una colección de cepas mutantes en cada uno de los genes funcionales de la familia *omp25/omp31* que están presentes en la cepa naturalmente rugosa *B. ovis* PA. Posteriormente, los resultados obtenidos en el curso de esta investigación demostraron que la ausencia de las PME *Omp25d* y *Omp22* en este microorganismo causa una fuerte atenuación en la virulencia de la bacteria en el modelo murino (Caro-Hernández *et al.*, 2007) (Figura 23). Debido a esto, uno de los objetivos del presente trabajo ha sido el de analizar si esta atenuación se encuentra relacionada con una disminución en la capacidad de supervivencia y multiplicación intracelular de dichas cepas en las células fagocíticas. Para ello, llevamos a cabo ensayos de infección en cultivos de células fagocíticas tanto no profesionales (células epiteliales HeLa) como profesionales (macrófagos murinos), utilizando cada una de las cepas mutantes en los genes *omp31*, *omp25*, *omp25c*, *omp25d* y *omp22* de *B. ovis* PA (Tabla I). Estos estudios se realizaron de acuerdo con la metodología descrita

en el Apartado 8.4 de Materiales y Métodos, con el empleo de un periodo de incubación de 4 horas con una MOI de 400 UFC/célula para la infección de los cultivos de células HeLa y de 100 UFC/célula para los macrófagos murinos.

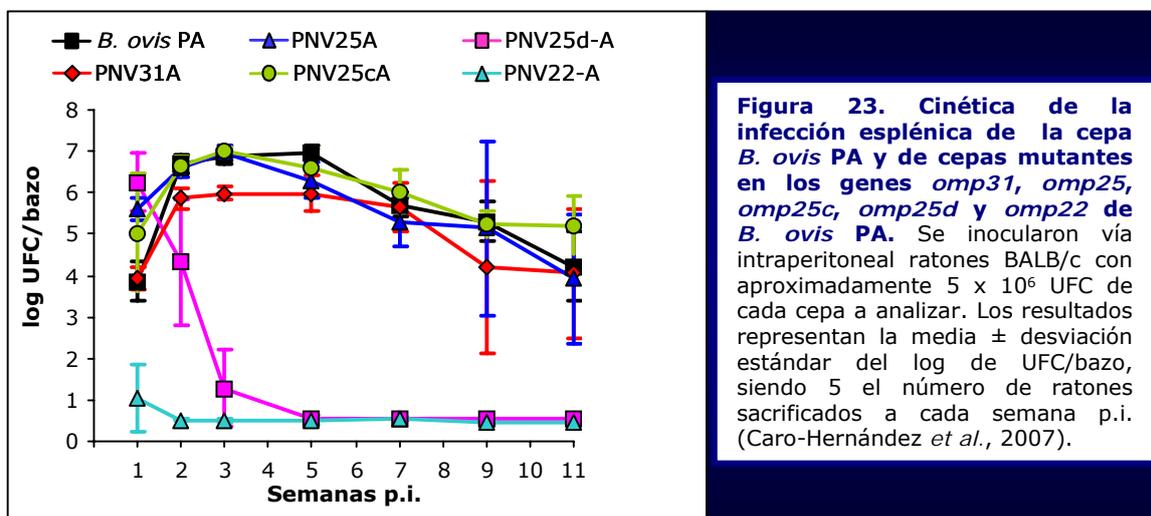


Figura 23. Cinética de la infección esplénica de la cepa *B. ovis* PA y de cepas mutantes en los genes *omp31*, *omp25*, *omp25c*, *omp25d* y *omp22* de *B. ovis* PA. Se inocularon vía intraperitoneal ratones BALB/c con aproximadamente 5×10^6 UFC de cada cepa a analizar. Los resultados representan la media \pm desviación estándar del log de UFC/bazo, siendo 5 el número de ratones sacrificados a cada semana p.i. (Caro-Hernández *et al.*, 2007).

Cuando analizamos la capacidad de internalización que presentaba cada mutante en cultivos de células HeLa, observamos que en el caso de las cepas PNV25dA (*Bo.* Δ *omp25d*) y PNV22A (*Bo.* Δ *omp22*) no se detectaban, mediante la técnica utilizada, bacterias intracelulares viables transcurrida una hora p.i. (Figura 24A). Por el contrario, el resto de las cepas mutantes mostraron una capacidad de invasión similar a la de la cepa parental (Figura 24A). Adicionalmente, cuando se emplearon cultivos de células J774.A1, se observó una significativa reducción ($P \leq 0,0001$) de la tasa de penetración de las cepas PNV25dA, PNV22A y PNV31A (*Bo.* Δ *omp31*) en comparación al comportamiento presentado por la cepa parental (Figura 24B). Estas diferencias no se produjeron en cambio, en los ensayos de infección realizados con las cepas PNV25A (*Bo.* Δ *omp25*) y PNV25cA (*Bo.* Δ *omp25c*) (Figura 24B).

Por otro lado, cuando analizamos la capacidad de multiplicación intracelular que presentaban las distintas cepas mutantes de *B. ovis* PA en los dos tipos de cultivos celulares observamos que la ausencia de las proteínas Omp31, Omp25 y Omp25c en la membrana externa de la bacteria, no afectaba a la tasa de replicación intracelular de *B. ovis* PA ya que las cepas mutantes *Bo.* Δ *omp31*, *Bo.* Δ *omp25* y *Bo.* Δ *omp25c* presentaron cinéticas de multiplicación muy similares a las de la cepa parental (Figura 24C y 24D). Por el contrario, la ausencia de las proteínas Omp25d y Omp22 en *B. ovis* PA se asoció con una total incapacidad de la bacteria para establecer infecciones en las células HeLa y a una marcada disminución en la capacidad de multiplicación intracelular en macrófagos murinos (Figura 24C y 24D). En estos últimos se observó además que la atenuación más fuerte se producía en la cepa mutante *Bo.* Δ *omp22*, siendo completamente eliminada de

los cultivos a las 24 horas p.i. (Figura 24D). En cambio, la cepa mutante *Bo.Δomp25d* fue capaz de sobrevivir en las células fagocíticas, pero sin presentar un incremento significativo en el número de bacterias intracelulares determinadas a las 72 horas p.i. (Figura 24D).

Para concluir este estudio, con el fin de comprobar que la disminución en el número de bacterias intracelulares observada en algunas cepas mutantes no estaba causada por un efecto citotóxico de la infección, determinamos la actividad LDH presente en los sobrenadantes de los dos tipos de cultivos, a los diferentes tiempos p.i. evaluados. Los resultados obtenidos demostraron la ausencia de citotoxicidad ya que no se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de muerte celular observados en cultivos infectados por la cepa parental y en cultivos infectados por las cepas mutantes estudiadas (datos no mostrados).

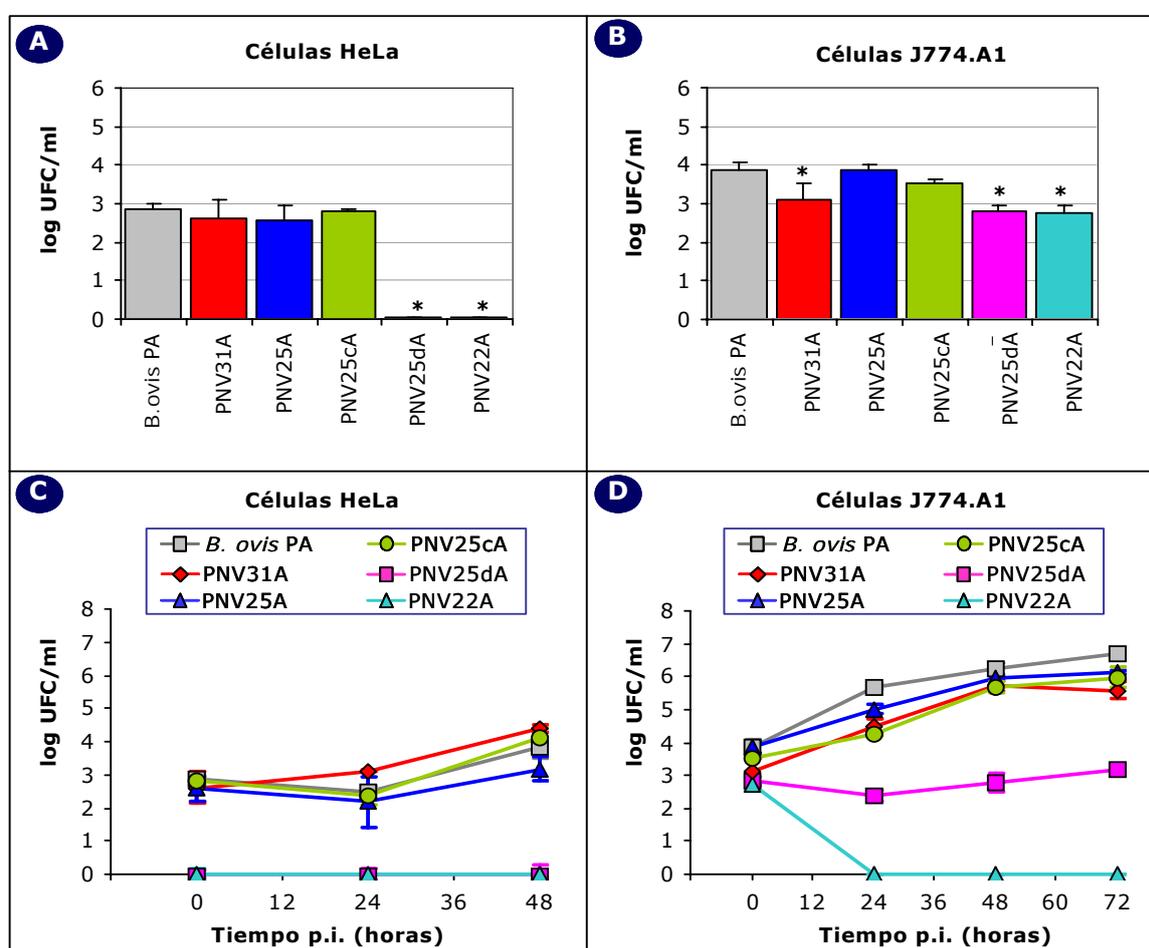
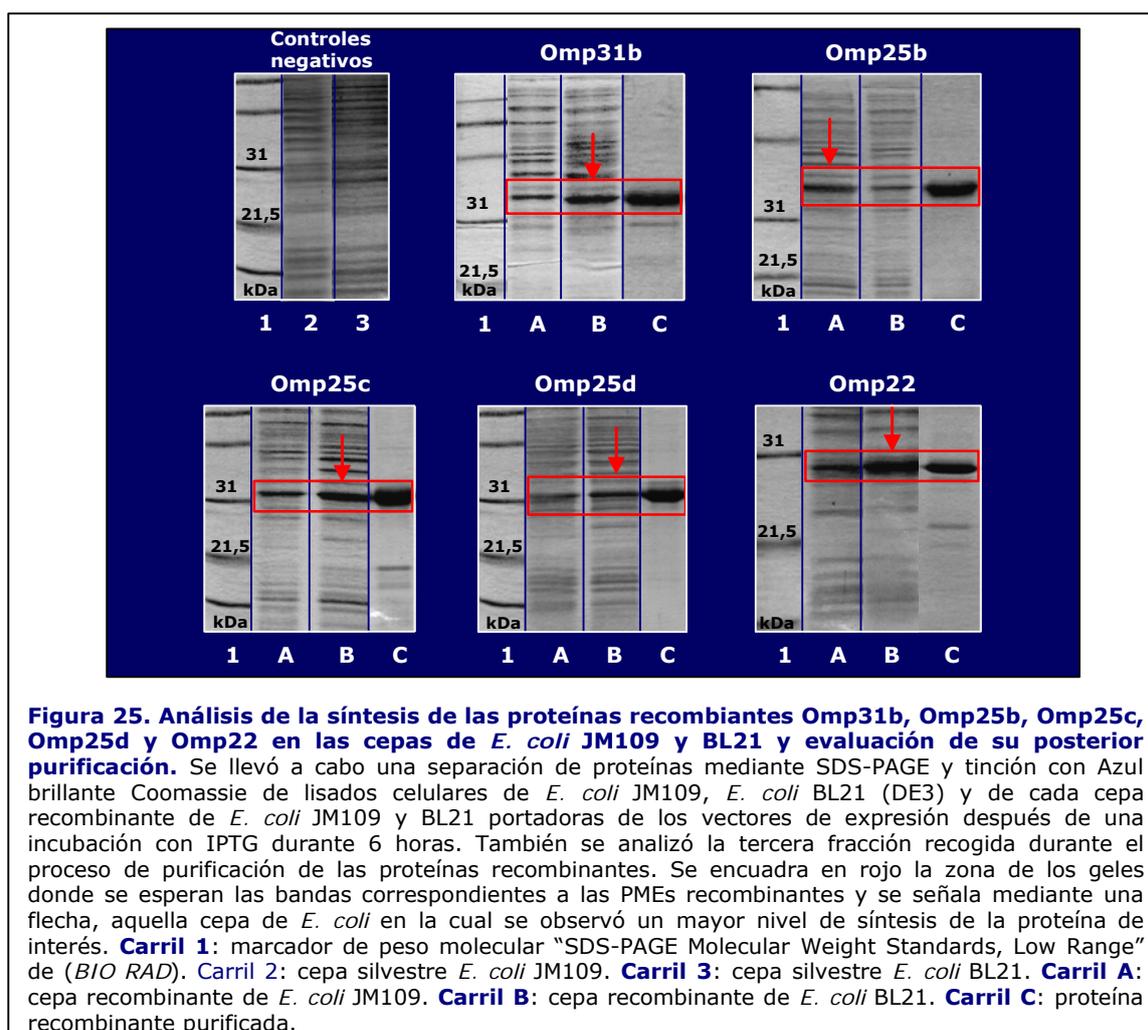


Figura 24. Análisis de la internalización (A y B) y multiplicación intracelular (C y D) de cepas mutantes de *B. ovnis* PA en los genes de la familia *omp25/omp31* en cultivos celulares. Cultivos semiconfluentes de células HeLa y macrófagos murinos J774.A1 se incubaron durante 4 horas con suspensiones de *B. ovnis* PA y de las cepas mutantes PNV31A, PNV25A, PNV25cA, PNV25dA y PNV22A (MOI=400 y MOI=100 UFC/célula, respectivamente). Tras una incubación de 1 hora con medio suplementado con gentamicina con el fin de eliminar las bacterias extracelulares, las células se lisaron a diferentes tiempos p.i. y se realizaron recuentos en placa para evaluar la capacidad invasiva (tiempo = 0h, A y B) y la cinética de replicación intracelular (C y D) de cada mutante. Los resultados representan la media \pm desviación estándar del log UFC/ml siendo $n = 4$. Las diferencias estadísticamente significativas obtenidas al comparar con la cepa parental se señalan mediante asterisco ($P \leq 0,0001$).

2.2 Análisis de la presencia de las proteínas de la familia Omp25/Omp31 en *Brucella* spp.

En vista del hallazgo del papel que ejercen algunas de las PME de la familia Omp25/Omp31 en la virulencia de algunas especies de *Brucella* (Edmonds *et al.*, 2002; Caro-Hernández *et al.*, 2007) decidimos analizar la presencia de cada uno de los siete miembros que componen esta familia en las seis especies clásicas de *Brucella* con el fin de conocer la distribución que presentan en dicho género (las características de las cepas utilizadas se indican en la Tabla I). Para ello, empleamos la técnica de Western Blot junto con lisados celulares de cada una de las cepas examinadas (Apartados 3.8.1 y 3.8.2 de Materiales y Métodos). En este estudio también incluimos la colección de cepas mutantes en cada gen *omp* de *B. ovis* PA obtenida previamente en nuestro laboratorio, así como las cepas complementadas correspondientes, como una referencia de apoyo para la identificación de las PME (Tabla I, Caro-Hernández *et al.*, 2007). Para poder llevar a cabo este análisis, empleamos anticuerpos monoclonales específicos frente a Omp31



(AcM-G02 para *B. ovis* y AcM-G10 para el resto de especies) y frente a Omp25 (AcM-C09) (Tabla XII). Además por otro lado, generamos anticuerpos policlonales en conejo frente a las restantes PME para poder detectarlas en Western Blot (ver Apartado 4 de Materiales y Métodos). Para ello, construimos vectores de expresión que portaban las regiones de cada gen correspondientes a las proteínas maduras amplificadas por PCR a partir de cepas de *Brucella* que poseían un gen *omp* funcional [*omp25*, *omp25c* y *omp22* de *B. ovis* PA, *omp25b* de *B. melitensis* 16M y *omp31b* de *B. abortus* 544 (Vizcaíno *et al.*, 2004)]. A continuación, dichos plásmidos recombinantes se introdujeron por transformación en las cepas de *E. coli* JM109 y BL21 (DE3) y tras un periodo de inducción de 6 horas con IPTG, se evaluaron los niveles de cada una de las PME recombinantes mediante SDS-PAGE y tinción con Azul brillante Coomassie R-250 (Apartado 3.8.1 de Materiales y Métodos). Con el fin de optimizar la purificación posterior de las proteínas recombinantes, se eligió para cada una de ellas, la cepa de *E. coli* donde se observó un mayor nivel de síntesis. En todos los casos, la que produjo mejores resultados fue la cepa BL21, excepto para la proteína recombinante Omp25b (Figura 25). En estas cepas, cada PME madura se sintetiza como una proteína de fusión con 6 residuos de histidina que facilitan su posterior purificación por cromatografía de afinidad utilizando una resina de níquel.

Finalmente, las proteínas recombinantes purificadas a partir de la cepa de *E. coli* seleccionada se emplearon para la producción de anticuerpos policlonales en conejo siguiendo la metodología descrita en el Apartado 4.7 de Materiales y Métodos.

2.2.1 Detección inmunológica de las PME de la familia Omp25/Omp31 en *Brucella* spp.

- Omp31 y Omp31b.

A pesar de que la distribución de la PME Omp31 ha sido ampliamente estudiada en el género *Brucella* (Vizcaíno *et al.*, 1997; Caro-Hernández *et al.*, 2007), decidimos incluirla en el presente análisis para ser utilizada como un apoyo a la hora de la detección de la proteína Omp31b. De este modo, en *B. ovis* PA al utilizar el AcM-G02 pudimos observar el patrón de bandas múltiples característico para Omp31 con dos bandas mayoritarias de 28,8 y 30,2 kDa (Figura 26, carril 2). En la colección de cepas mutantes para las proteínas de la familia Omp25/Omp31 de *B. ovis* PA se reprodujo el mismo perfil, excepto en la cepa $\Delta omp31$, en la que como era de esperar, no se observó ninguna reactividad con el AcM-G02 (datos no mostrados, Caro-Hernández *et al.*, 2007).

Estos mismos resultados se repitieron cuando se utilizaron los AcPs anti-Omp31b (Figura 26, carriles 1, y 5-9). Teniendo en cuenta los datos de ADN existentes, que señalan la ausencia de la proteína Omp31b en la membrana externa de *B. ovis* (Vizcaíno *et al.*, 2004), se consideró que la reactividad observada era debida a una reacción

serológica cruzada con la proteína Omp31 y no a una reacción específica del suero con Omp31b. Adicionalmente, se detectó en la cepa parental complementada *in trans* con el gen funcional *omp31b* de *B. abortus*, un conjunto de bandas de gran intensidad, con un tamaño igual y superior a 31 kDa, que probablemente se corresponda con la proteína Omp31b sintetizada (Figura 26, carril 3).

Por otra parte, se detectó la presencia de la proteína Omp31 en el resto de las especies de *Brucella* analizadas utilizando el AcM-G10 (Figura 26), excepto en aquellas cepas que no portan el gen *omp31* (las pertenecientes a *B. abortus* (Vizcaíno *et al.*, 1997; Vizcaíno *et al.*, 1999) (Figura 26, carril representativo 21). En éstas últimas, al igual que en *B. suis* y *B. neotomae*, sí que se observó al emplear el suero anti-Omp31b, una banda de aproximadamente 31 kDa correspondiente a la proteína Omp31b (Figura 26, carriles 16, 18, 20 y 22-26). Por el contrario, dicha banda proteica no se detectó en *B. canis* y *B. melitensis*, como cabía de esperar por la secuencia nucleotídica del gen *omp31b* que porta cada una de ellas (Vizcaíno *et al.*, 2004) (Figura 26, carriles 10, 12 y 14). Por último, tanto en estas dos últimas cepas, como en *B. suis* y *B. neotomae*, se observó una reacción cruzada de los AcPs anti-Omp31b con la proteína Omp31 ya que mediante este suero se reveló la misma banda proteica que la detectada con el AcM-G10 (Figura 26, carriles 10-19).

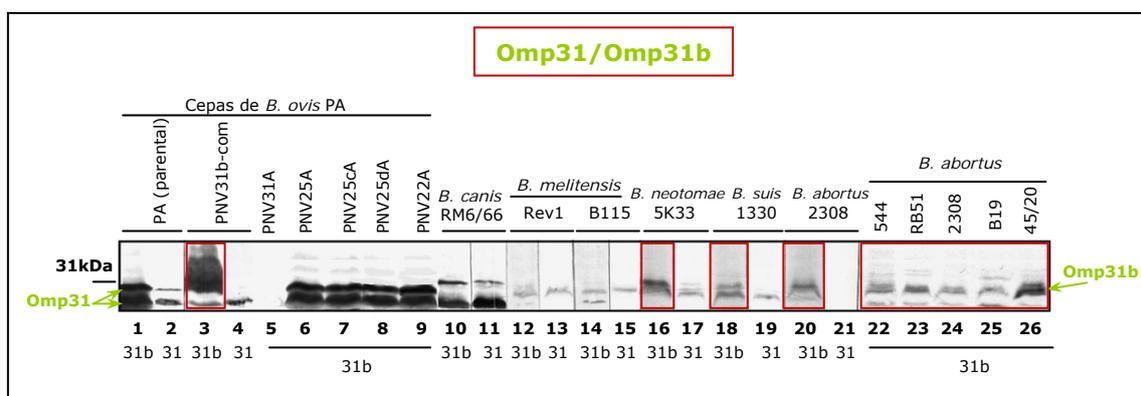


Figura 26. Análisis de la expresión de los genes *omp31* y *omp31b* en *Brucella* spp. El estudio se llevó a cabo mediante Western Blot, empleando para ello anticuerpos monoclonales frente Omp31 (31) (AcM-G02 para las cepas de *B. ovis* analizadas y AcM-G10 para el resto) y anticuerpos policlonales obtenidos en conejo frente a una Omp31b recombinante (31b). El suero anti-Omp31b se utilizó en una dilución 1/500 en el caso de la cepa de *B. ovis* PNV31b-com (carril 3) mientras que para el resto de cepas de *Brucella* la dilución fue 1/50. La localización de las proteínas Omp31 y Omp31b se señala mediante flecha. Recuadradas en rojo se indican aquellas cepas donde se identificó la proteína Omp31b. Una línea en la izquierda de la figura muestra la posición de la proteína del marcador de peso molecular de *BIO-RAD* más cercana a Omp31 y Omp31b.

- Omp25 y Omp25b.

Al igual que en el caso de la PME mayoritaria Omp31, la detección de la proteína Omp25 en *B. ovis* mediante Western Blot había sido previamente realizada (Cloeckert *et al.*, 1996b; Caro-Hernández *et al.*, 2007), y fue incluida en este estudio como referencia para la correcta identificación de sus homólogos en *Brucella* spp. Como se esperaba,

excepto en la cepa mutante $\Delta omp25$ de *B. ovis*, la proteína fue detectada con el AcM-C09 en todas las cepas de *Brucella* analizadas (Figura 27A, carriles 1-7). Cabe señalar además, que en *B. ovis* se observaron dos bandas proteicas correspondientes a Omp25; una con una masa molecular aparente de 25,9 kDa y otra menor [más intensa en la cepa PNV31A (Figura 27A, carril 2)] de 22,3 kDa. En cambio, en el resto de las cepas, únicamente se detectó una banda de un tamaño mayor de 27,5 kDa (Figura 27A, carriles 8-17).

La proteína Omp25b no se detectó en *B. ovis* como era de esperar ya que existe una deleción en su ADN que afecta al gen *omp25b* (Vizcaíno *et al.*, 2004) (Figura 27B, carriles 1-4). Únicamente se halló dicha proteína en la cepa parental complementada *in trans* con el fragmento de ADN delecionado (cepa PNV998-10, Vizcaíno *et al.*, 2004), constituyendo una banda proteica de 32,1 kDa (Figura 27B, carril 4) que fue revelada tanto con el suero anti-Omp25b como con el suero anti-Omp25c (dato no mostrado). En el resto de especies analizadas, solamente se detectó la proteína en *B. suis* y *B. melitensis* (Figura 27B, carriles 6-8), en las cuales, esta banda proteica desaparecía tras realizar una adsorción del suero anti-Omp25b con proteína recombinante Omp25b purificada (dato no mostrado). Por otro lado, en varias cepas de *Brucella* se detectó también una pareja de bandas proteicas localizadas por debajo de la proteína Omp25b que no corresponderían a ningún miembro de la familia Omp25/Omp31 (Figura 27B). Finalmente, el suero anti-Omp25b mostró reacciones cruzadas con las proteínas Omp25 y Omp25c de acuerdo a los resultados obtenidos con el AcM-C09 y el suero anti-Omp25c en la cepa parental *B. ovis* PA y en las cepas mutantes $\Delta omp25$ y $\Delta omp25c$ (Figura 27B, carriles 1-3).

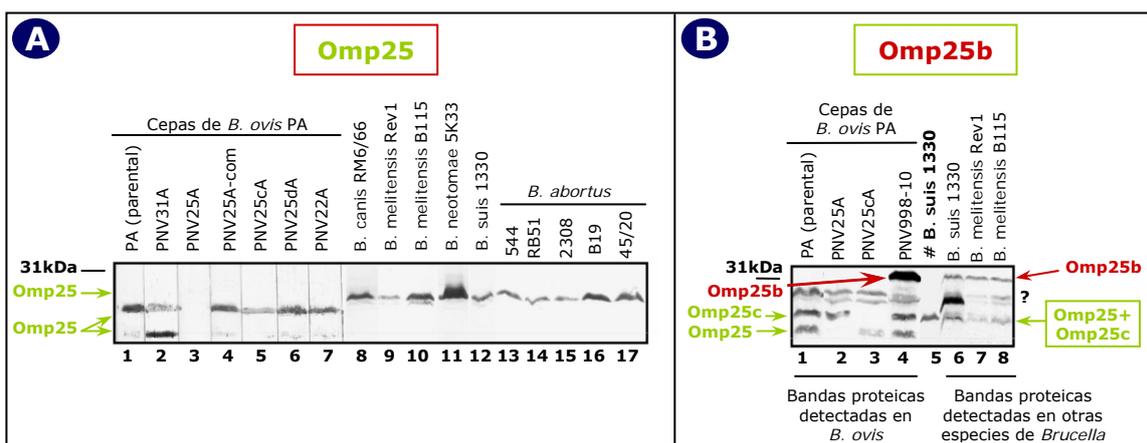


Figura 27. Estudio por Western Blot de la expresión de los genes *omp25* (A) y *omp25b* (B) en *Brucella* spp. Para el análisis de la expresión de *omp25* se utilizó el anticuerpo monoclonal AcM-C09, mientras que para *omp25b* se emplearon anticuerpos policlonales generados en conejo frente a una Omp25b recombinante purificada. En el panel B se señala a través de flechas rojas la localización de la proteína Omp25b (confirmada mediante adsorción del suero anti-Omp25b con proteína Omp25b recombinante purificada) y a través de flechas verdes la posición de las proteínas Omp25 y Omp25c. Mediante un interrogante (?) se indican aquellas bandas proteicas no identificadas. No se obtuvo revelado de la banda proteica correspondiente a la proteína Omp25b en las cepas que no se hallan representadas. Símbolo: # Carril revelado con AcM-C09. Las líneas a la izquierda de cada figura muestra la posición de la proteína del marcador de peso molecular de *BIO-RAD* más cercana.

- Omp25c, Omp25d y Omp22.

La utilización del suero anti-Omp25c en la realización de los Western Blots dio como resultado el revelado de dos intensas bandas proteicas de 27,5 y 29,5-30,5 kDa en *B. ovis*, excepto en la cepa mutante $\Delta omp25c$. Además se observó que la banda de mayor tamaño aparecía mucho más marcada en las cepas PNV31A y PNV25cA-com que en el resto (Figura 28A, carriles 1-7). Por otro lado, este suero reaccionó adicionalmente de forma cruzada con la proteína Omp25 en *B. ovis* ya que la banda correspondiente a dicha proteína no se revelaba en la cepa mutante $\Delta omp25$ (Figura 28A, carriles 1-7). En el resto de especies de *Brucella*, también se detectó una banda proteica de 27,5 kDa y otra más débil de 29,5-30,5 kDa. En éstas, debido a que la proteína Omp25 presenta la misma masa molecular aparente que la banda proteica de menor tamaño correspondiente a la proteína Omp25c (ver Figura 6A, carril 8 donde se muestra la reactividad representativa que presenta el AcM-C09 en *B. canis*), es difícil deducir si la banda de 27,5 kDa que se detecta está constituida únicamente por Omp25 o por ambas proteínas a la vez (Figura 28B, carriles 6-8 y Figura 28A, carriles 9-18). Por último, en las cepas de *B. abortus* se observaron asimismo, dos bandas proteicas adicionales de una menor masa molecular cuya naturaleza es desconocida (Figura 28A, carriles 14-18).

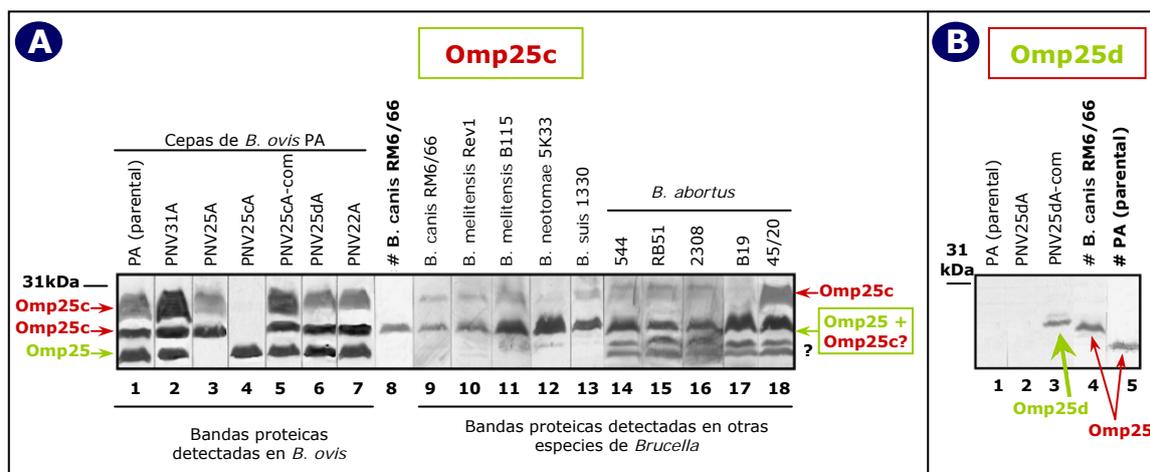


Figura 28. Detección inmunológica por Western Blot de las PMEs Omp25c (A) y Omp25d (B) en diferentes especies de *Brucella*. Para la realización de este estudio se emplearon anticuerpos policlonales obtenidos en conejo frente a las proteínas Omp25c y Omp25d recombinantes purificadas. Mediante flechas se señala la localización de las PMEs de la familia Omp25/Omp31 identificadas. Las cepas que no están representadas en el panel B no mostraron reactividad con el suero anti-Omp25d. Símbolos: (?) bandas proteicas de naturaleza desconocida; # Carril revelado con AcM-C09. Las líneas a la izquierda de cada figura muestra la posición de la proteína del marcador de peso molecular de *BIO-RAD* más cercana.

La proteína Omp25d únicamente se detectó en la cepa PNV25dA-com de *B. ovis*, en la cual el gen *omp25d* está sobreexpresado en comparación con la cepa parental, ya que dicha banda proteica revelada con el suero anti-Omp25d desaparecía tras adsorber el suero con la proteína recombinante Omp25d purificada (Figura 28B y datos no mostrados).

La detección de la proteína Omp22 se realizó exitosamente mediante la utilización del suero anti-Omp22 en todas las cepas de *B. ovis*, excepto en el mutante $\Delta omp22$ (Figura 29, carriles 1-8). Además dicha banda proteica desaparecía tras la adsorción de suero con la proteína recombinante Omp22 purificada (datos no mostrados). Cabe destacar que en el caso de la cepa mutante $\Delta omp22$ complementada, solamente se consiguió detectar una banda proteica correspondiente a Omp22 marcada muy débilmente, empleando una concentración mayor de suero (1/10) (Figura 29, carril 8). Sorprendentemente, también se evidenciaron unos niveles muy bajos de la proteína en el mutante $\Delta omp25d$ y en su correspondiente cepa complementada (Figura 29, carriles 5 y 6). Finalmente, en el resto de cepas de *Brucella* analizadas, únicamente se observó una banda proteica de una masa molecular similar a la de Omp22 en *B. canis*, *B. neotomae* y en las cepas de *B. abortus* 544, B19 y 45/20 (Figura 29, carriles 9-18). Sin embargo, solamente en *B. neotomae* desapareció esta banda al utilizar suero anti-Omp22 adsorbido con la proteína Omp22 purificada (Figura 29, carril 12).

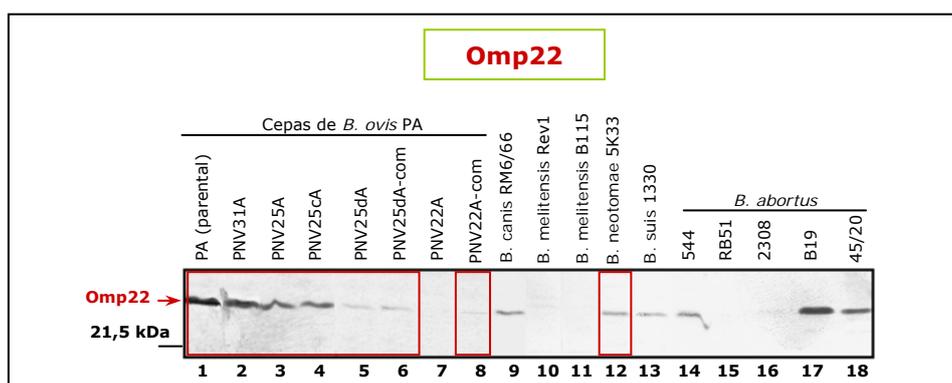


Figura 29. Análisis de la expresión del gen *omp22* en cepas de las seis especies clásicas de *Brucella* spp. mediante la detección por Western Blot de la proteína que codifica. Para ello, se emplearon anticuerpos policlonales anti-Omp22 obtenidos en conejo frente a una proteína Omp22 recombinante purificada. Este suero se utilizó en un dilución 1/10 para el revelado de la cepa PNV22A-com de *B. ovis* (carril 8) mientras que para el resto de cepas se usó una dilución 1/50. Mediante una flecha se indica la posición de Omp22 y recuadradas en rojo se señalan aquellas cepas donde la presencia de Omp22 fue confirmada. La línea a la izquierda de la figura muestra la posición de la proteína del marcador de peso molecular de *BIO-RAD* más cercana a Omp22.

2.3 Estudio del papel de las PMEs Omp25d y Omp22 en la virulencia de la cepa naturalmente rugosa *B. canis* RM6/66 y de otras estirpes lisas de *Brucella*.

En base a los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio, en los cuales se demostró que la ausencia de las proteínas Omp25d y Omp22 de la membrana externa de *B. ovis* PA causaba una fuerte atenuación en la virulencia del microorganismo tanto en el modelo murino (Caro-Hernández *et al.*, 2007) como en cultivos celulares (ver Apartado 2.1 de Resultados), decidimos investigar si estas dos PMEs podrían también

constituir un factor de virulencia en otra cepa naturalmente rugosa, *B. canis* RM6/66, así como en estirpes lisas de *Brucella*.

2.3.1 Obtención de cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ de *B. canis* RM6/66, *B. abortus* 2308 y *B. neotomae* 5K33.

Para la construcción de estas cepas mutantes se siguió la misma metodología que la usada por Caro-Hernández *et al.*, 2007 en la obtención de las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ de *B. ovis* PA. De este modo, se sometieron a electroporación (ver condiciones en el Apartado 5.1 de Materiales y Métodos) las cepas *B. canis* RM6/66, *B. abortus* 2308 y *B. neotomae* 5K33 con los plásmidos recombinantes pAM25d03 y pAM2204 que contenían los genes de interés inactivados mediante sustitución de gran parte de los mismos por un gen de resistencia a kanamicina (ver Apartado 5.1.1 de Materiales y Métodos). Como resultado se obtuvieron colonias en las cuales los plásmidos se habían integrado por completo en el cromosoma bacteriano por un proceso de recombinación homóloga por entrecruzamiento simple. Por tanto, las cepas resultantes, denominadas $\Delta omp25d$ -I o $\Delta omp22$ -I (ver Tabla XIV), eran a la vez portadoras de una copia mutada y de una copia silvestre del gen *omp25d* o del gen *omp22*. A continuación, a partir de ellas se logró seleccionar las cepas mutantes deseadas (Tabla XIV) tras forzar un segundo entrecruzamiento simple mediante siembra en medio suplementado con sacarosa (ver Apartado 5.2 de Materiales y Métodos).

Posteriormente, las inactivaciones de los genes *omp25d* y *omp22* en cada una de las cepas mutantes generadas se confirmaron mediante PCR y Southern Blot, empleando como controles las correspondientes cepas $\Delta omp25d$ -I y $\Delta omp22$ -I, junto con las respectivas cepas parentales (Figura 30). Los resultados de amplificación obtenidos por PCR dieron como resultado en cada una de las cepas parentales, una banda de 1096 pb utilizando los cebadores Omp25c-F y 25d-R y otra de 2075 pb con 22-MUT F y 22-MUT R, que se corresponden con el tamaño esperado tomando como referencia el genoma de *B. abortus* 2308 (Figura 30A y 30B). En las cepas $\Delta omp25d$ -I y $\Delta omp22$ -I de las tres estirpes bajo estudio, usando los mismos cebadores, se obtuvieron dos productos de PCR en cada una de ellas, correspondientes a la amplificación de una copia silvestre y de una copia mutada de los genes *omp25d* y *omp22*, según el caso (Figura 30A y 30B). Finalmente, en las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ generadas únicamente se visualizó una banda de 1777 pb en las primeras o de 2695 pb en las segundas, que se correspondían a los genes *omp25d* y *omp22* inactivados, respectivamente (Figura 30A y 30B). Por último, los resultados de hibridación de ADN por Southern Blot obtenidos empleando como sondas los plásmidos recombinantes pAM25d03 y pAM2204, portadores de $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$, terminaron por confirmar la correcta identidad de las cepas

mutantes generadas ya que las bandas reveladas también concordaron con lo esperado para cada una de ellas según los esquemas representados en las Figuras 30A y 30B.

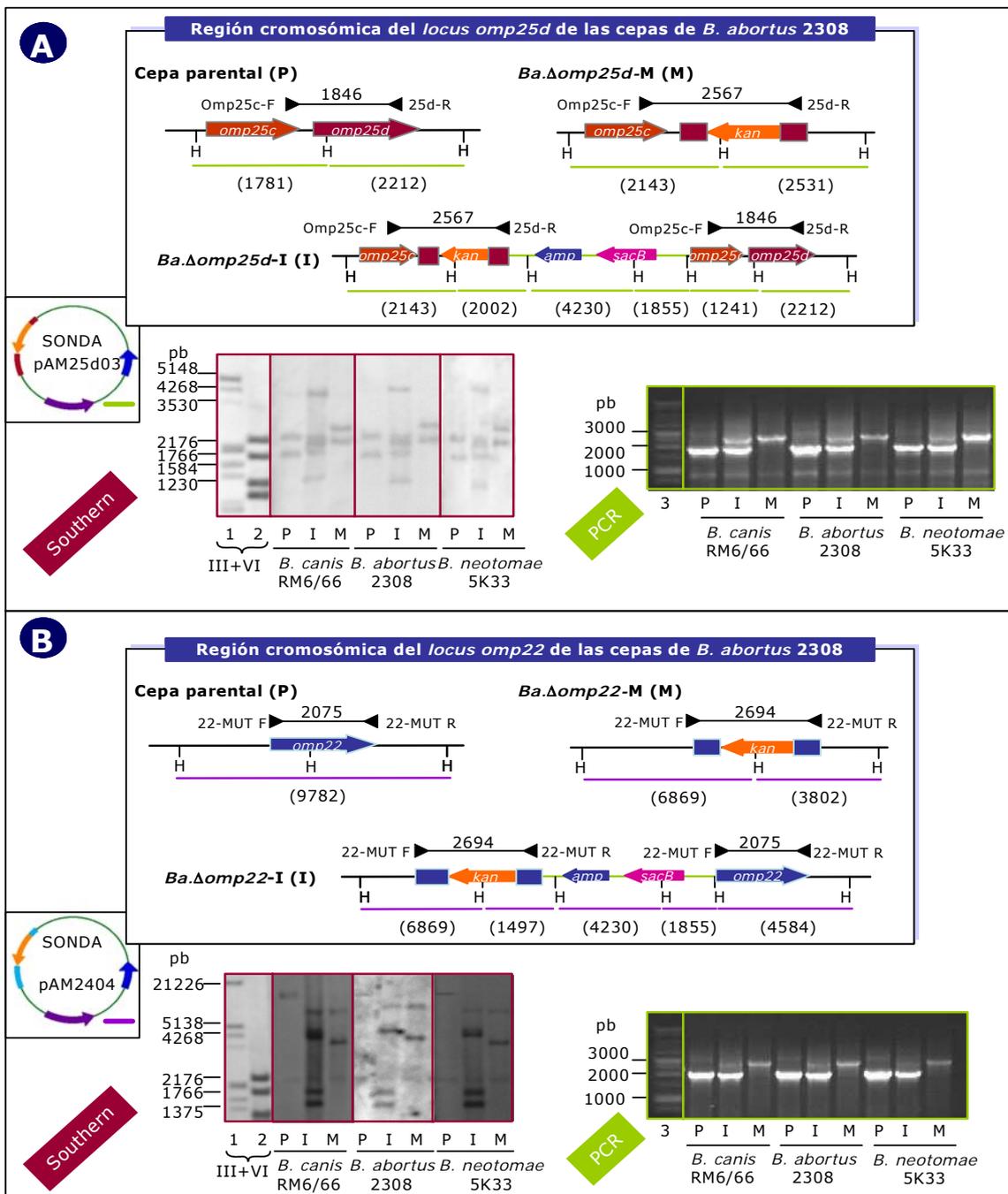


Figura 30. Verificación genotípica de las cepas mutantes $\Delta omp25d$ (A) y $\Delta omp22$ (B) de *B. canis* RM6/66, *B. abortus* 2308 y *B. neotomae* 5K33 obtenidas en el presente trabajo. En representación a todas ellas, se esquematiza gráficamente el genotipo relativo a los genes *omp25d* y *omp22* que presenta la cepa parental *B. abortus* 2308 y cada cepa integrante y mutante obtenida a partir de ella. Para cada una de ellas se indican los puntos de corte para la enzima de restricción *Hind*III y los tamaños de los fragmentos de restricción resultantes. También se muestran mediante líneas verdes y moradas las regiones nucleotídicas que hibridarían con las sondas pAM25d03 y pAM2204, respectivamente. Asimismo, se señalan las posiciones de las parejas de cebadores Omp25c-F, 25d-R y 22-MUT F, 22-MUT R empleados en las reacciones de PCR y los tamaños de los productos que se amplificarían. Simbología de los carriles: 1 y 2: patrones de ADN III y VI de Roche respectivamente, revelados con una sonda de ellos mismos marcada con digoxigenina; 3: marcador 1 kb DNA Ladder de Promega Corp.; P: cepa parental; I: cepa integrante y M: cepa mutante. Los tamaños se representan en pb.

2.3.2 Análisis de la sensibilidad a polimixina B, desoxicolato de sodio, suero no inmune humano y peróxido de hidrógeno de las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ de *B. canis* RM6/66, *B. abortus* 2308 y *B. neotomae* 5K33.

Con el fin de evaluar si la integridad y las propiedades de la membrana externa de *B. canis* RM6/66, de *B. abortus* 2308 y de *B. neotomae* 5K33 se habían visto alteradas por la ausencia en ella de las PME's *Omp25d* y *Omp22*, llevamos a cabo un estudio de la sensibilidad de las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ obtenidas en el Apartado anterior a varias sustancias de diferente naturaleza como son, la polimixina B (un péptido catiónico), el desoxicolato de sodio (un detergente aniónico), el complemento humano o el peróxido de hidrógeno (un intermediario producido en la explosión oxidativa de los macrófagos). Para ello, evaluamos el porcentaje de supervivencia que presentaba cada una de ellas tras ser expuestas durante 1 hora a una concentración en PBS de 1 mg/ml de polimixina B y de 0,1 y 1 mg/ml de desoxicolato de sodio. El 100 % de supervivencia en cada cepa fue calculado considerando el recuento de UFC/placa obtenido tras ser incubada en PBS sin agente (ver Apartados 6.4.2 y 6.4.3 de Materiales y Métodos). Los resultados de este análisis, mostrados en la Tabla XVII, reflejaron la inexistencia de diferencias significativas entre las tasas de supervivencia obtenidas en las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ y la observada en la cepa parental correspondiente, exceptuando la cepa *Bn.Δomp22-M* que fue ligeramente más resistente ($P=0,0064$) a la exposición a polimixina B que la cepa parental *B. neotomae* 5K33. Además, se comprobó que las cepas de referencia que presentaron mayores porcentajes de supervivencia a la exposición a 1 mg/ml de polimixina B y de desoxicolato de sodio fueron *B. canis* RM6/66 (71,92 %) y *B. abortus* 2308 (93,98 %), respectivamente (Tabla XVII).

También estudiamos el porcentaje de supervivencia que presentaba cada una de las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ generadas en el presente trabajo, tras ser expuestas durante 4 horas a suero no inmune humano. En este caso, el 100 % de supervivencia se calculó teniendo en cuenta las UFC/placa recontadas tras incubar cada cepa en el mismo suero después de ser descomplementado durante 30 minutos a 56 °C (ver Apartado 6.4.6 de Materiales y Métodos). De nuevo, las tasas de mortalidad que se obtuvieron en todas las cepas mutantes analizadas, resultaron ser muy similares a la mostrada por la cepa parental correspondiente (Tabla XVII), siendo la cepa naturalmente rugosa *B. canis* RM6/66 la que presentó menos sensibilidad al suero no inmune humano (83,72 %). En contraste, las estirpes lisas mostraron porcentajes de supervivencia considerablemente menores (16,51 y 5,30 %) (Tabla XVII).

Por último, evaluamos la sensibilidad al peróxido de hidrógeno que presentaba cada cepa mutante en comparación con la cepa parental. Para ello, sobre 100 μ l de una suspensión en PBS de cada cepa a una D.O._{600 nm} de 0,2 sembrados masivamente en

placa, se depositó centralmente un disco de papel Whatman impregnado con 10 μ l de peróxido de hidrógeno al 30 %. Posteriormente, transcurrido el periodo de incubación, se midieron los diámetros de los halos de inhibición generados. Los resultados obtenidos se expresaron para cada cepa como la media \pm la desviación estándar de las mediciones realizadas en tres placas independientes (Apartado 6.4.5 de Materiales y Métodos). Éstos revelaron nuevamente la ausencia de diferencias significativas en la sensibilidad que presentó al agente inhibidor cada cepa parental comparada con la mostrada por los mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ generados a partir de ella (Tabla XVII). Asimismo, se observó que la cepa de referencia *B. abortus* 2308 fue la que ofreció una mayor resistencia al peróxido de hidrógeno con halos de inhibición de 4,52 cm de diámetro ($P < 0,05$) (Tabla XVII).

Tabla XVII. Sensibilidad a la exposición a polimixina B, desoxicolato de sodio, suero no inmune humano y peróxido de hidrógeno de las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ de *B. canis* RM6/66, *B. abortus* 2308 y *B. neotomae* 5K33.

Cepa	% Supervivencia				Diámetro de inhibición (cm) H_2O_2
	Polimixina B (1mg/ml)	Desoxicolato de sodio		Suero no inmune humano	
		(0,1 mg/ml)	(1 mg/ml)		
<i>B. canis</i> RM6/66	71,92 \pm 2,61	91,20 \pm 13,73	61,79 \pm 9,80	83,72 \pm 7,46	4,91 \pm 0,16
<i>Bc.</i> $\Delta omp25d$ -M	65,52 \pm 7,40	93,17 \pm 10,92	60,27 \pm 8,84	80,80 \pm 12,92	4,72 \pm 0,12
<i>Bc.</i> $\Delta omp22$ -M	63,24 \pm 12,93	94,53 \pm 13,43	69,52 \pm 3,30	85,75 \pm 8,08	4,70 \pm 0,09
<i>B. abortus</i> 2308	40,72 \pm 3,11	93,98 \pm 12,09	92,79 \pm 18,41	16,51 \pm 2,57	4,52 \pm 0,07**
<i>Ba.</i> $\Delta omp25d$ -M	37,87 \pm 6,63	98,99 \pm 13,13	95,11 \pm 20,83	19,89 \pm 4,18	4,38 \pm 0,03
<i>Ba.</i> $\Delta omp22$ -M	39,59 \pm 5,72	97,03 \pm 17,96	91,93 \pm 18,45	18,30 \pm 4,43	4,45 \pm 0,06
<i>B. neotomae</i> 5K33	33,24 \pm 2,07	88,63 \pm 3,62	6,92 \pm 2,57	5,30 \pm 0,80	5,01 \pm 0,04
<i>Bn.</i> $\Delta omp25d$ -M	36,49 \pm 5,12	96,67 \pm 19,20	4,21 \pm 1,63	7,68 \pm 1,69	5,02 \pm 0,05
<i>Bn.</i> $\Delta omp22$ -M	53,99 \pm 0,76*	96,97 \pm 16,58	3,22 \pm 1,02	3,25 \pm 0,81	5,03 \pm 0,15

Se muestran los porcentajes de supervivencia de cada cepa analizada después de ser expuestas durante una hora a polimixina B y a desoxicolato de sodio, y tras ser incubadas por un periodo de 4 horas en suero no inmune humano. El valor 100 % de supervivencia se calculó en cada cepa a partir del número de UFC/placa obtenido en incubaciones llevadas a cabo paralelamente en PBS sin agente y en suero no inmune humano descomplementado. Asimismo, se detallan los diámetros de los halos de inhibición producidos por acción del peróxido de hidrógeno sobre 100 μ l de una suspensión bacteriana en PBS (D.O._{600 nm} = 0,2) sembrados por extensión masiva en placas de TSA-YE-HS. En todos los casos, los datos mostrados representan la media \pm la desviación estándar de los valores obtenidos en tres ensayos independientes. Símbolos *: $P=0,0064$ con respecto a la cepa parental *B. neotomae* 5K33. ** $P=0,0012$ y $P=0,014$ con respecto a las cepas parentales *B. canis* RM6/66 y *B. abortus* 2308, respectivamente.

2.3.3 Estudio de la capacidad infectiva y de multiplicación intracelular de cepas mutantes de *B. canis* RM6/66, *B. abortus* 2308 y *B. neotomae* 5K33 en los genes *omp25d* y *omp22* en cultivos celulares.

El análisis de la virulencia de las cepas $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ generadas en el presente trabajo a partir de las cepas *B. canis* RM6/66, *B. abortus* 2308 y *B. neotomae* 5K33, se llevó a cabo mediante diferentes ensayos de infección de cultivos de células

HeLa y de macrófagos murinos J774.A1. Dichos experimentos se realizaron bajo las condiciones detalladas en el Apartado 8.4 de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos revelaron que tanto en cultivos de células HeLa como en cultivos de macrófagos J774.A1, todas las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ alcanzaban los mismos niveles de infección intracelular que la cepa parental de la que derivaban (Figura 31). Además también presentaron en ambos cultivos celulares, cinéticas de multiplicación intracelular muy similares a la exhibida por la cepa parental correspondiente (Figura 31). Así, *B. abortus* 2308, *B. neotomae* 5K33 y sus respectivas cepas mutantes mostraron incrementos en el número de bacterias intracelulares de aproximadamente 2 unidades logarítmicas a las 48 (Figura 31B1 y 31C1) y las 72 horas p.i. (Figura 31B2 y 31C2). En contraste, la cepa parental *B. canis* RM6/66 y las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ obtenidas a partir de ella, fueron capaces de multiplicarse en macrófagos murinos (Figura 31A2), pero en cambio, no lograron replicarse en los cultivos de células de HeLa, en los cuales el número inicial de bacterias intracelulares viables sufrió un descenso de 0,39 unidades logarítmicas a las 48 horas p.i. ($P=0,0192$) (Figura 31A1).

2.3.4 Evaluación de la virulencia en ratones BALB/c de las cepas mutantes de *B. canis* RM6/66 en los genes *omp25d* y *omp22*.

En vista de los resultados obtenidos en el Apartado anterior, donde ninguna de las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ analizadas presentaba un comportamiento intracelular diferente al de la cepa parental en los cultivos de células HeLa y de macrófagos murinos, y en base a que en *B. canis* RM6/66, las PMEs se encuentran expuestas en la superficie bacteriana al no poseer la molécula de LPS cadenas polisacáridicas *O* que las enmascaren, decidimos evaluar si la ausencia de las proteínas Omp25d y Omp22 en la membrana externa de esta cepa naturalmente rugosa repercutía en la virulencia del microorganismo en el modelo murino. Para ello, llevamos a cabo un estudio de la cinética de colonización esplénica de las cepas mutantes *Bc.Δomp25d-M* y *Bc. Δomp22-M*, usando como control, la cepa parental *B. canis* RM6/66. Con este fin, se inocularon por vía intraperitoneal, 30 ratones por cepa con aproximadamente 5×10^6 UFC/ratón. Posteriormente, se evaluó el número de bacterias viables presente en los bazo de un grupo de 5 ratones a las semanas 1, 2, 3, 5, 7 y 9 p.i. tal y como se describe en el Apartado 7.1 de Materiales y Métodos. Las dosis exactas de inoculación se determinaron mediante un recuento en placa retrospectivo y se muestran en la Figura 32.

Los resultados obtenidos demostraron que las dos cepas mutantes presentaban una cinética de infección esplénica muy similar a la de la cepa parental *B. canis* RM6/66, con una mayor capacidad de multiplicación entre la primera y la segunda semana p.i

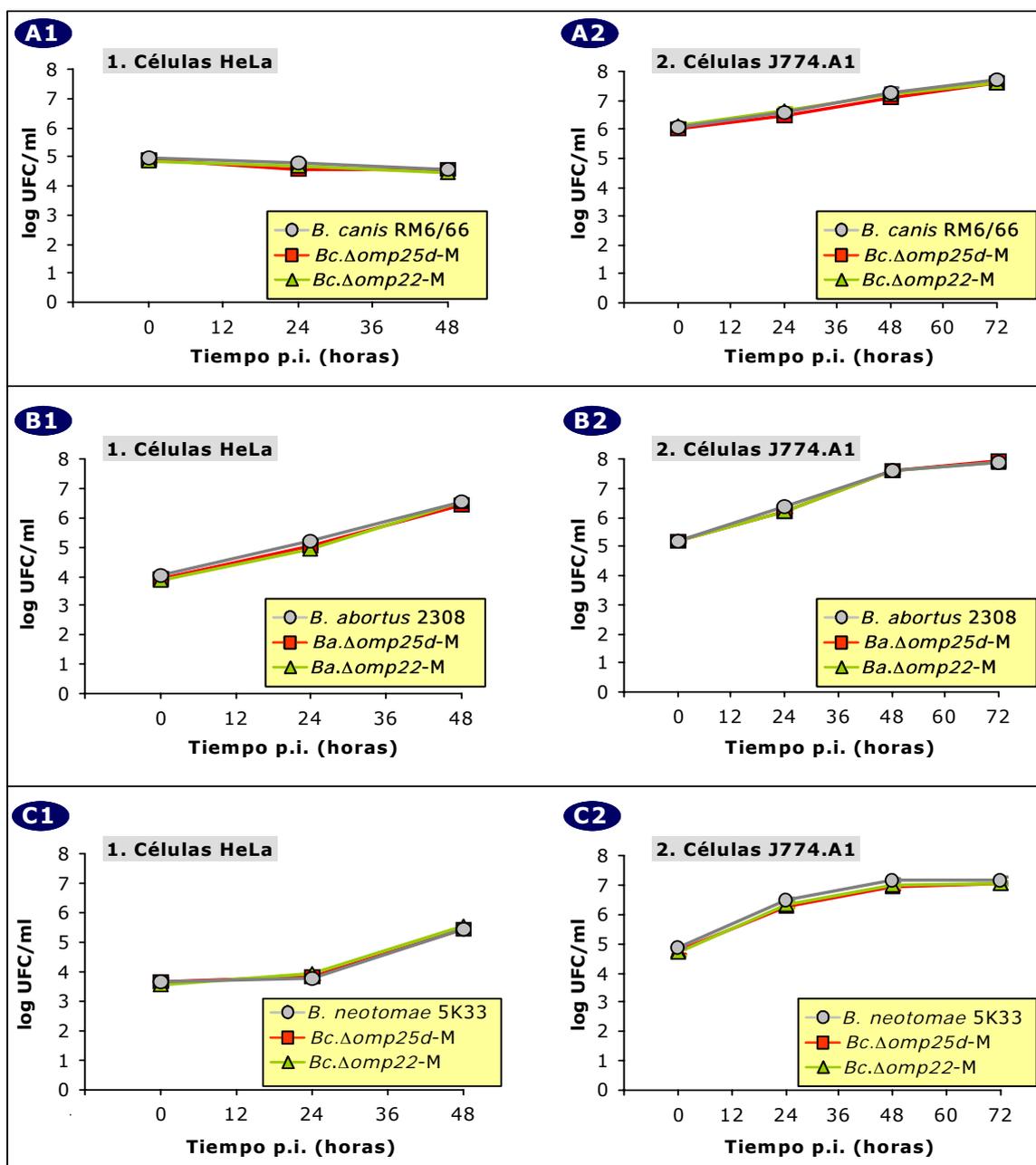
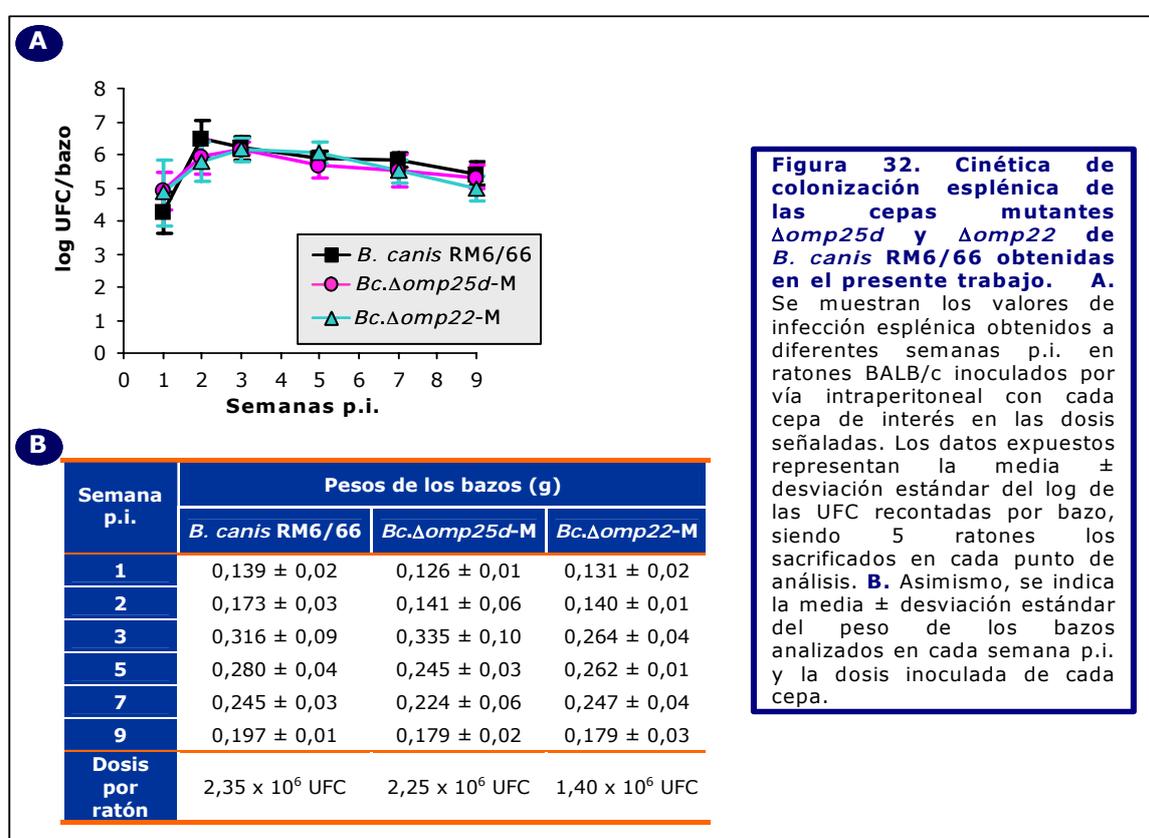


Figura 31. Estudio de la cinética de multiplicación intracelular de las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ de *B. canis* RM6/66 (A), *B. abortus* 2308 (B) y *B. neotomae* 5K33 (C) en cultivos de células HeLa y macrófagos murinos. Cultivos semiconfluentes de células HeLa y J774.A1 se incubaron durante 4 horas con suspensiones bacterianas de cada cepa preparadas a unas MOIs de 400 y 200 UFC/célula, respectivamente. Después de un tratamiento con gentamicina, el número de bacterias intracelulares viables se determinó mediante recuento en placa a los tiempos p.i. señalados. Como cepas controles se emplearon en cada ensayo de infección, la cepa parental correspondiente de que derivaban las cepas mutantes. Los resultados se representan como la media \pm desviación estándar ($n = 4$) del logaritmo de las UFC/ml obtenidas.

(Figura 32A). Además exhibieron niveles de infección esplénica entre la segunda y quinta semana p.i. de alrededor de 6 unidades logarítmicas de UFC/bazo, con un descenso posterior progresivo del número de bacterias viables por bazo hasta la novena semana

p.i., en la cual, la infección persistía con aproximadamente entre 5 y 5,4 unidades logarítmicas (Figura 32A). Tampoco se observaron diferencias significativas en los pesos de los bazos extraídos de ratones infectados con las cepas mutantes, en relación con los procedentes de ratones infectados con la cepa parental (Figura 32B).

En vista de que previamente no habíamos observado ningún grado de atenuación de las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ generadas en este trabajo en cultivos celulares (Apartado 2.3.3 de Resultados), y debido a que las cepas *Bc. $\Delta omp25d$ -M* y *Bc. $\Delta omp22$ -M*, en las cuales las PME's se encuentran directamente expuestas en la superficie de la bacteria, no presentaron una disminución de la capacidad de colonización esplénica, desechamos la idea de llevar a cabo un estudio de virulencia en el modelo murino con las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ obtenidas de estirpes lisas.



3. ESTUDIO DEL PAPEL DE DIVERSOS GENES IMPLICADOS EN LA VIRULENCIA DE ESTIRPES LISAS DE *Brucella* EN EL ESTABLECIMIENTO DEL PROCESO INFECCIOSO DE *B. ovnis* PA.

Uno de los objetivos principales de la presente investigación ha sido analizar la implicación en la virulencia de *B. ovnis* PA de ciertos genes que desempeñan un importante papel en los mecanismos de infección de estirpes lisas de *Brucella*. Con este

fin, se construyeron en primer lugar cepas mutantes de *B. ovis* PA con el operón *virB* o los genes *vjbR*, *cgs*, *bacA* y *virB2* inactivados. Posteriormente, tras su caracterización genotípica y fenotípica, se evaluó su posible atenuación en la virulencia mediante la realización de ensayos de infección en cultivos de macrófagos murinos y el estudio de su cinética de colonización esplénica en ratón.

3.1 Construcción de cepas mutantes de *B. ovis* PA en el operón *virB* y en los genes *vjbR*, *cgs*, *bacA* y *virB2*.

En la obtención de esta colección de mutantes de *B. ovis* PA, se construyó en primer lugar, una cepa portadora de una mutación presumiblemente polar en el operón *virB*. Ésta se consiguió mediante la sustitución de los genes *virB2* y *virB3* por el gen de resistencia a kanamicina, siguiendo la metodología usada por Caro-Hernández *et al.*, 2007 (ver Apartado 5.2.1 de Materiales y Métodos, Figura 12). El resto de las cepas mutantes se generaron reemplazando, a través de procesos de recombinación homóloga, cada gen silvestre por otro inactivado mediante la denominada PCR "de solapamiento" para evitar un efecto polar en la mutación. Esta metodología se describe con más detalle en el Apartado 5.2.2 de la sección Materiales y Métodos (Figuras 13-17). En todos los casos, se seleccionaron también cepas que revertían al genotipo silvestre tras perder el plásmido recombinante integrado en su genoma para ser empleadas en posteriores experimentos como controles positivos de la metodología usada. Todas las cepas obtenidas modificadas genéticamente durante el proceso de obtención de esta colección de mutantes de *B. ovis* PA, así como sus características, se recogen en la Tabla XV de Materiales y Métodos.

3.2 Verificación genotípica de las cepas mutantes y revertientes silvestres de *B. ovis* PA generadas.

Se realizó una caracterización genotípica mediante PCR y Southern Blot de todas las cepas mutantes y revertientes silvestres obtenidas, así como de aquellas portadoras del plásmido recombinante, con el fin de verificar su identidad (Apartado 6.1 de Materiales y Métodos). Para ello, se realizaron diversas reacciones de PCR empleando cebadores externos al gen de interés, obteniéndose en todos los casos: una banda correspondiente a la amplificación del gen silvestre en *B. ovis* PA y en las cepas revertientes, un único producto de PCR con el tamaño esperado para cada gen inactivado en las cepas mutantes, y la amplificación de ambos fragmentos en aquellas cepas con el plásmido recombinante integrado en su genoma ya que éstas portan a la vez una copia mutada y una silvestre del gen (Figura 33, 34 y 35). Al mismo tiempo, también se llevaron a cabo diversas reacciones de PCR en las cuales, la secuencia de uno de los

cebadores hibridaba con regiones deletcionadas de los genes inactivados [los cebadores denominados como F4-X (Tabla V)]. En ninguna de las cepas mutantes analizadas se produjo amplificación nucleotídica en la reacción de PCR, lo que contribuye a la confirmación de una correcta obtención de las mismas.

Por otro lado, los resultados obtenidos en las hibridaciones de ADN-ADN mediante Southern Blot efectuadas usando como sondas los plásmidos portadores de cada gen mutado, concordaron con lo esperado según los esquemas representados en las Figuras 33, 34 y 35. Cabe señalar, que bajo las condiciones de Southern Blot empleadas en nuestro laboratorio (Apartado 3.7.6 de Materiales y Métodos), la detección de bandas con un tamaño menor 500 pb es bastante difícil, por lo que los resultados obtenidos se consideraron correctos. Finalmente, la secuenciación de las regiones cromosómicas que contenían en cada caso el gen de interés deletcionado terminó por verificar la obtención de la colección de cepas mutantes deseada.

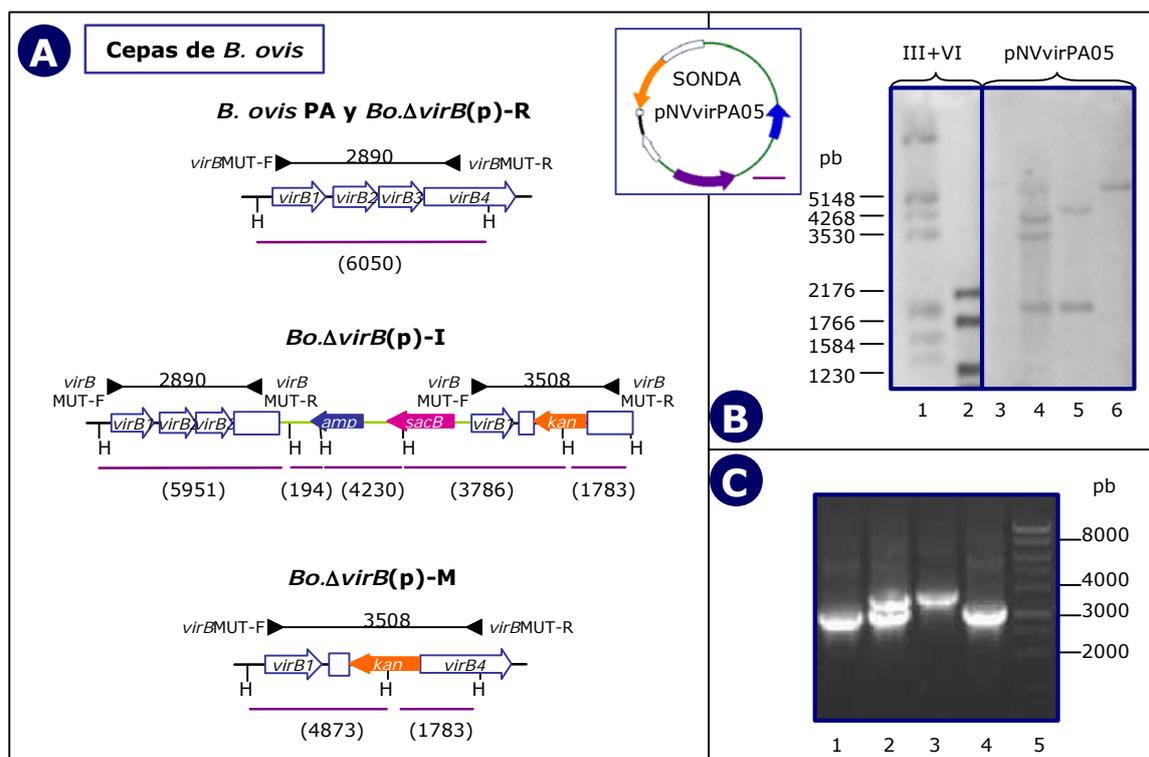


Figura 33. Caracterización genotípica de *B. ovis*-pNVvirPA05-M (*Bo.ΔvirB(p)-M*).

A. Representación gráfica de la región cromosómica que contiene el operón *virB* en la cepa parental *B. ovis* PA, en la integrante *Bo.ΔvirB(p)-I*, en la mutante *Bo.ΔvirB(p)-M* y en la revertiente silvestre *Bo.ΔvirB(p)-R*. Para cada cepa se muestran los puntos de corte de *Hind*III, el tamaño de los fragmentos de restricción resultantes (en pb) y en línea morada, las regiones nucleotídicas que hibridarían con la sonda pNVvirPA05. También se muestra la posición de los oligonucleótidos virBMUT-F y virBMUT-R y la longitud de los fragmentos que se amplificarían por PCR empleando estos cebadores. **B.** Hibridación por Southern Blot de ADN digerido con *Hind*III procedente de *B. ovis* PA (carril 3), *Bo.ΔvirB(p)-I* (carril 4), *Bo.ΔvirB(p)-M* (carril 5) y *Bo.ΔvirB(p)-R* (carril 6) con la sonda pNVvirPA05. Los carriles 1 y 2 corresponden a los patrones de ADN III y VI de Roche respectivamente, revelados con una sonda de ellos mismos marcada con digoxigenina. **C.** Amplificación por PCR de ADN cromosómico de *B. ovis* PA (carril 1), *Bo.ΔvirB(p)-I* (carril 2), *Bo.ΔvirB(p)-M* (carril 3) y *Bo.ΔvirB(p)-R* (carril 4) utilizando la pareja de oligonucleótidos virBMUT-F y virBMUT-R. El carril 5 corresponde al marcador 1 kb DNA Ladder de Promega Corp.

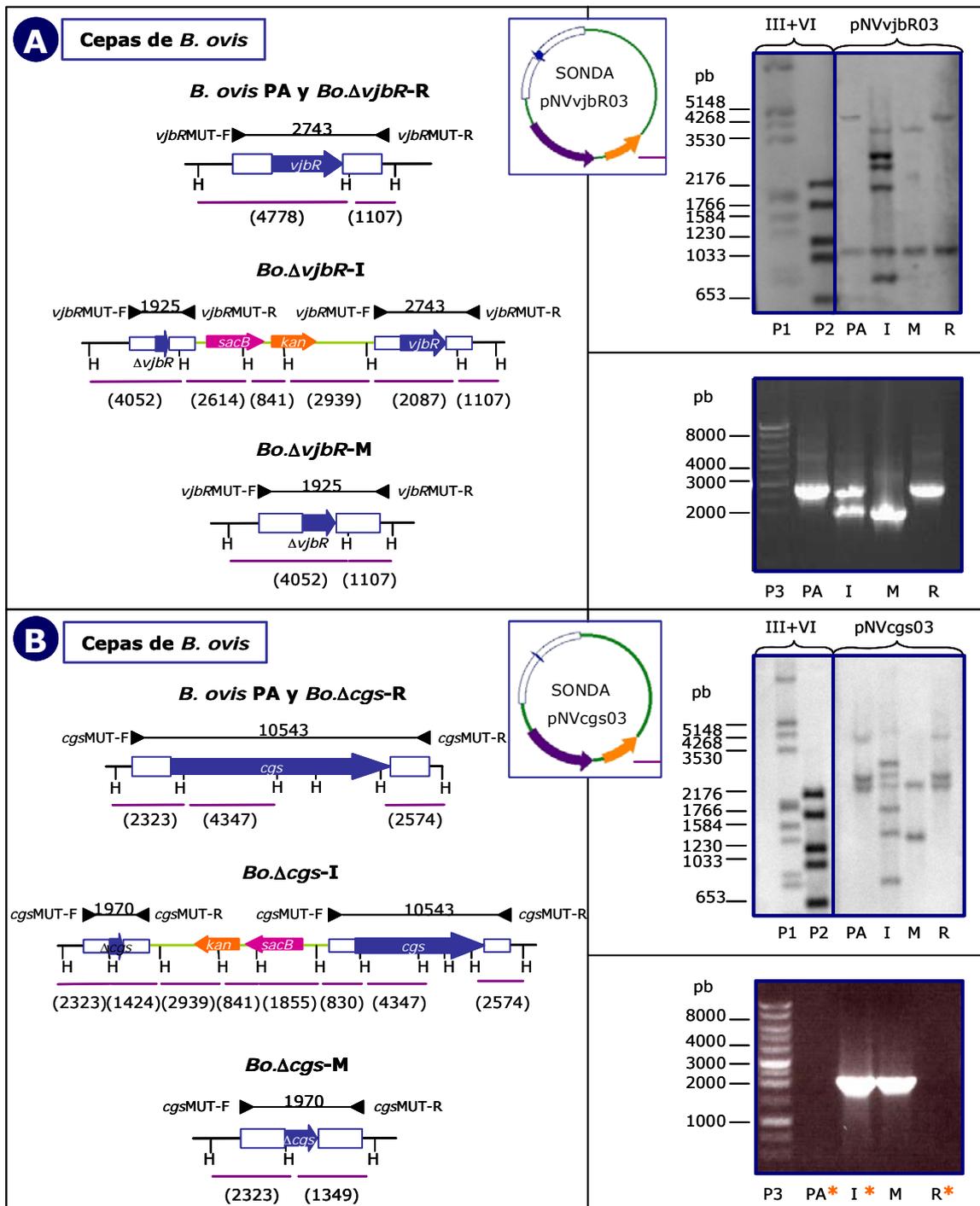


Figura 34. Verificación genotípica de *B. ovis*-pNVvjbr03-M (*Bo.Δvjbr-M*) y de *B. ovis*-pNVcgs03-M (*Bo.Δcgs-M*). Se representa gráficamente el genotipo relativo a los genes *vjbr* (A) y *cgs* (B) que presentan la cepa parental *B. ovis* PA (PA) y las cepas integrantes (I), mutantes (M) y revertientes silvestres (R) correspondientes. Para cada una de ellas se muestran los puntos de corte de la enzima de restricción *Hind*III empleada en la realización del Southern Blot. Asimismo, se indican los tamaños de los fragmentos *Hind*III originados y para cada caso, en líneas moradas, aquellos que hibridarían con las sondas pNVvjbr03 (A) o pNVcgs03 (B). Se señalan también las posiciones de las parejas de oligonucleótidos utilizadas para la inactivación de cada gen: *vjbrMUT-F*, *vjbrMUT-R* (A) y *cgsMUT-F*, *cgsMUT-R* (B) y la longitud de los productos de PCR que se obtendrían en cada cepa. (*) En el caso de la caracterización genotípica de *Bo.Δcgs-M*, no se produjo la amplificación de la copia silvestre del gen *cgs* en *B. ovis* PA (PA), en *Bo.Δcgs-I* (I) y en *Bo.Δcgs-R* (R) debido al gran tamaño que posee dicho gen. Los carriles marcados como P1 y P2 corresponden a los patrones de ADN III y VI de Roche respectivamente, revelados con una sonda de ellos mismos marcada con digoxigenina. El carril P3 corresponde al marcador 1 kb DNA Ladder de Promega Corp. Los tamaños se representan en pb..

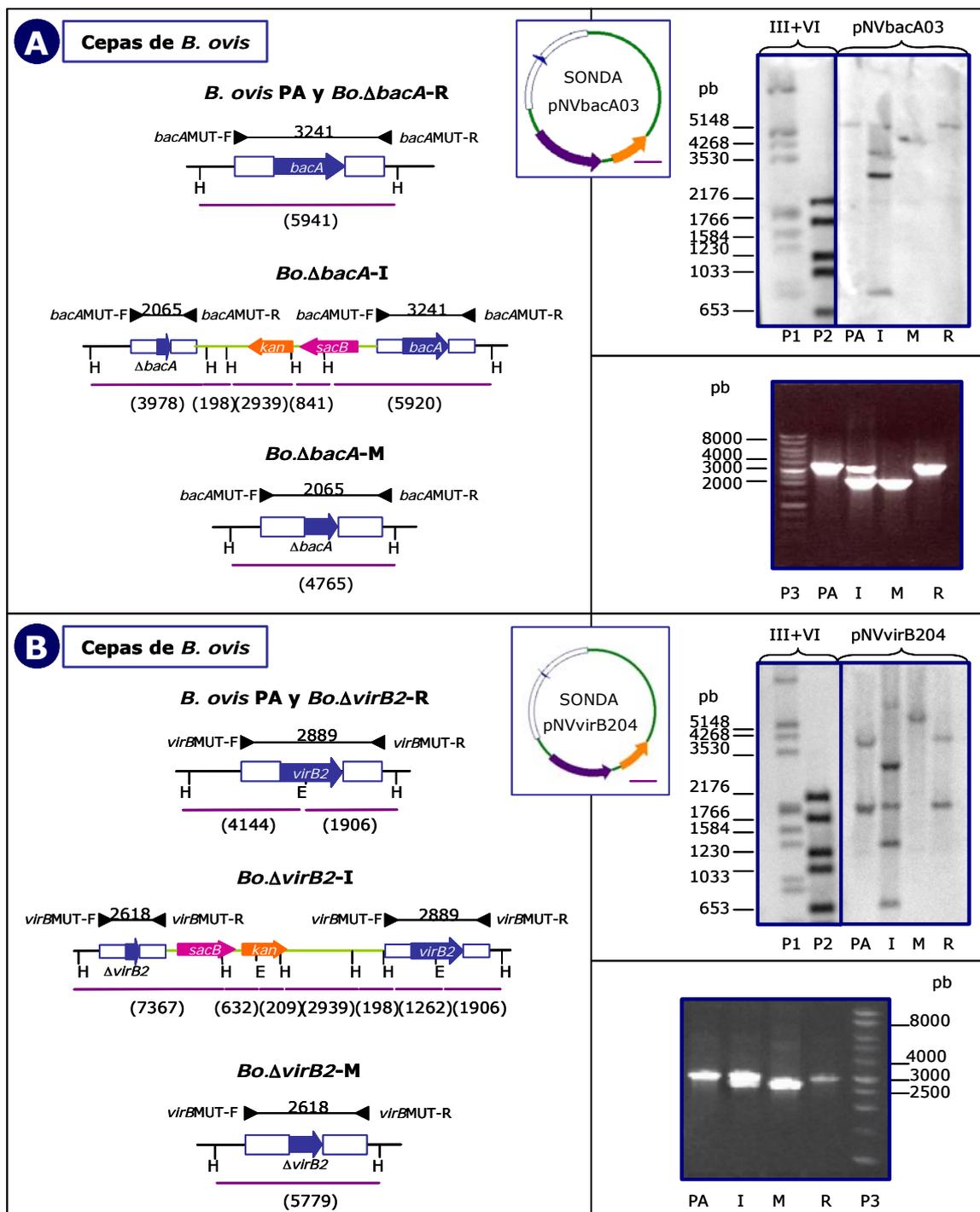


Figura 35. Verificación genotípica de *B. ovis*-pNVbacA03-M (*Bo.ΔbacA-M*) y de *B. ovis*-pNVvirB04-M (*Bo.ΔvirB2-M*). Se representa gráficamente el genotipo relativo a los genes *bacA* (A) y *virB2* (B) que presentan la cepa parental *B. ovis* PA (PA) y las cepas integrantes (I), mutantes (M) y revertientes silvestres (R) correspondientes. Para cada una de ellas se muestran los puntos de corte de las enzimas de restricción utilizadas en la caracterización genética por Southern Blot (*Hind*III para *Bo.ΔbacA-M* (A) y *Hind*III-*Eco*NI para *Bo.ΔvirB2-M* (B)). Asimismo, se indican los tamaños de los fragmentos de restricción originados y para cada caso, en líneas moradas, aquellos que hibridarían con las sondas pNVbacA03 (A) o pNVvirB2 (B). Se señalan también las posiciones de las parejas de oligonucleótidos utilizadas para la inactivación de cada gen: *bacAMUT-F*, *bacAMUT-R* (A) y *virBMUT-F*, *virBMUT-R* (B) y la longitud de los productos de PCR que se obtendrían en cada cepa. Los carriles P1 y P2 corresponden a los patrones de ADN III y VI de Roche respectivamente, revelados con una sonda de ellos mismos marcada con digoxigenina. El carril P3 corresponde al marcador 1 kb DNA Ladder de Promega Corp. Los tamaños se representan en pb..

3.3 Caracterización fenotípica de la colección de cepas mutantes y revertientes silvestres de *B. ovís* PA.

3.3.1 Caracterización fenotípica clásica.

En primer lugar, se llevó a cabo un estudio para determinar la pureza (ver Apartado 6.2.2 de Materiales y Métodos) de cada una de las cepas modificadas genéticamente obtenidas tal y como se describe en el Apartado anterior. Todas las cepas seleccionadas, mutantes y revertientes silvestres, presentaron ausencia de contaminación o disociación de la fase colonial. Además el tamaño de las colonias fue similar al obtenido en la cepa parental *B. ovís* PA tras 6 días de incubación, con un periodo mínimo de aproximadamente 72 horas para la obtención de colonias visibles. Por otro lado, ninguna de las cepas evaluadas, incluyendo *B. ovís* PA, crecieron en una atmósfera sin CO₂ ni tampoco en medio sin suero. Estos resultados reflejan por tanto, la pureza de las cepas que conforman la colección de mutantes y revertientes silvestres obtenida.

En el caso de la cepa mutante *Bo.ΔvirB(p)*-M, los recuentos de UFC obtenidos en medio de cultivo BAB-S sin kanamicina no presentaron diferencias significativas con los obtenidos en el medio suplementado con el antibiótico, comprobándose de esta manera, la estabilidad *in vitro* de la mutación polar inducida.

Posteriormente, se llevó a cabo la caracterización fenotípica de cada una de las cepas generadas mediante la realización de las pruebas convencionales descritas para la tipificación del género *Brucella* y la determinación de la sensibilidad que mostraban al fago R/C (Alton *et al.*, 1988) (ver Apartado 6.2.3 de Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos revelaron que todas las cepas, tanto mutantes como revertientes silvestres analizadas, presentaban las mismas características que la cepa parental *B. ovís* PA (Tabla XVIII).

3.3.2 Análisis del crecimiento en medio sólido y líquido.

- Crecimiento en medio sólido.

Con el fin de analizar el crecimiento en medio sólido que presentaba cada una de las cepas modificadas genéticamente, se realizaron recuentos de UFC/ml en placas de TSA-YE-HS (suplementadas con 50 μg/ml de kanamicina en el caso de la cepa mutante *Bo.ΔvirB(p)*-M). Para ello, se prepararon suspensiones bacterianas en PBS a una D.O._{600 nm} de 0,2 a partir de cultivos en placa incubados durante 48 horas. Posteriormente, tras diluir convenientemente cada suspensión, se llevaron a cabo los recuentos de UFC/ml pertinentes (Apartado 6.3.2 de Materiales y Métodos). Al igual que lo

Tabla XVIII. Caracterización fenotípica clásica de la colección de cepas mutantes y revertientes silvestres de *B. ovis* PA en genes implicados en la virulencia de estirpes lisas de *Brucella*.^a

Cepa	Necesidad de CO ₂ y suero	Actividad Ureasa	Agglutinación Acriflavina	Agglut. con sueros		Lisis por fagos ^c					Crecimiento en presencia de colorantes µg/ml					
											Tionina			Fucsina		Safranina
											10	20	40	10	20	100
<i>B. ovis</i> PA	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	
<i>Bo.ΔvirB(p)</i> -M	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	
<i>Bo.ΔvirB(p)</i> -R	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	
<i>Bo.ΔvjbR</i> -M	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	
<i>Bo.ΔvjbR</i> -R	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	
<i>Bo.Δcgs</i> -M	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	
<i>Bo.Δcgs</i> -R	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	
<i>Bo.ΔbacA</i> -M	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	
<i>Bo.ΔbacA</i> -R	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	
<i>Bo.ΔvirB2</i> -M	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	
<i>Bo.ΔvirB2</i> -R	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	
<i>Ba</i> .B19 ^b	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	
<i>Bs</i> .1330 ^b	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	
<i>Bm</i> .16M ^b	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	

^a El medio de cultivo empleado fue BAB-S sin antibiótico o suplementado con kanamicina en el caso de *Bo.ΔvirB(p)*-M.

^b Cepas control empleadas en la caracterización: *B. abortus* B19, *B. suis* 1330 y *B. melitensis* 16M.

^c Diluciones empleadas: 10⁻² para Iz y 10⁻³ para Tb, Wb y R/C.

descrito con el medio BAB-S (Apartado 3.3.1 de Resultados), todas las cepas analizadas mostraron un ritmo de crecimiento idéntico al de la cepa parental. Además no se observaron diferencias drásticas entre los recuentos obtenidos con *B. ovis* PA y los proporcionados por las cepas mutantes y revertientes, exceptuando la cepa mutante *Bo.ΔvjbR*-M, la cual presentó un recuento de UFC/ml ligeramente inferior (Tabla XIX).

- Crecimiento en medio líquido.

El estudio del crecimiento en medio líquido de las cepas mutantes de *B. ovis* PA se llevó a cabo midiendo la D.O._{600 nm} de un cultivo líquido en TBS-YE-HS (suplementado con 50 µg/ml de kanamicina en el caso de la cepa mutante *Bo.ΔvirB(p)*-M) a diferentes tiempos de incubación (Apartado 6.3.3 de Materiales y Métodos). Las medidas obtenidas se compararon a la vez con los valores proporcionados por la cepa parental y por el revertiente silvestre correspondiente (Figura 36A-36E). De este modo, se observó que todas las cepas mostraban una progresión similar de la fase exponencial, alcanzando la fase estacionaria alrededor de las 40 horas de incubación. La cepa mutante *Bo.ΔvjbR*-M fue la que presentó un valor de D.O. más elevado al finalizar la fase exponencial (2,24)

Tabla XIX. Recuentos de UFC/ml de cada una de las cepas mutantes y revertientes silvestres de *B. ovis* PA en una suspensión de D.O._{600 nm} de 0,2 en PBS.

Cepa	log UFC/ml ^a
<i>B. ovis</i> PA	9,00 ± 0,03
<i>Bo.ΔvirB</i> (p)-M	9,02 ± 0,02
<i>Bo.ΔvirB</i> (p)-R	8,94 ± 0,17
<i>Bo.ΔvjbR</i> -M	8,79 ± 0,02 ^b
<i>Bo.ΔvjbR</i> -R	8,99 ± 0,08
<i>Bo.Δcgs</i> -M	8,95 ± 0,11
<i>Bo.Δcgs</i> -R	8,96 ± 0,04
<i>Bo.ΔbacA</i> -M	8,98 ± 0,09
<i>Bo.ΔbacA</i> -R	9,03 ± 0,04
<i>Bo.ΔvirB2</i> -M	8,93 ± 0,11
<i>Bo.ΔvirB2</i> -R	9,04 ± 0,06

^a Los datos representan la media ± desviación estándar de recuentos realizados por triplicado de 3 ensayos

^b Diferencia estadísticamente significativa en comparación con la cepa parental ($P=0,005$).

en relación a *B. ovis* PA y *Bo.ΔvjbR*-R (2 y 1,92 respectivamente) (Figura 36B). La diferencia más destacable fue que el mutante *Bo.Δcgs*-M presentó valores de D.O. ligeramente inferiores a los obtenidos con la cepa parental y con su revertiente silvestre (por ejemplo, 1,48 frente a 1,76 de *B. ovis* PA y 1,72 de *Bo.Δcgs*-R a las 72 horas de incubación) (Figura 36C).

Debido a que el método utilizado para evaluar el crecimiento de una población bacteriana se basa en una medida indirecta de la misma a través de la D.O._{600 nm}, decidimos realizar también, un seguimiento de los recuentos de UFC/ml que se obtenían a las 0, 24 y 48 horas de incubación. Así, se pudo observar que inicialmente, la cepa parental era la que presentaba un recuento de UFC/ml más elevado y la cepa mutante *Bo.ΔvjbR*-M, a igual D.O._{600 nm} (0,05), el más bajo (Tabla XX). Además a pesar de mostrar los valores más altos de D.O. durante la fase estacionaria, esta cepa mutante no fue la que proporcionó el recuento más elevado. Este caso se dio en la cepa *Bo.Δcgs*-M, tanto a las 24 como a las 48 horas de incubación, a pesar de que en la fase estacionaria fue la que presentó los valores de D.O. más bajos (Tabla XX). Por otra parte, la cepa *Bo.Δcgs*-R fue la que dio recuentos de UFC/ml más bajos en todos los tiempos de medición a pesar de presentar una D.O. muy similar a *B. ovis* PA. Por el contrario, fueron las cepas *Bo.ΔbacA*-M, *Bo.ΔbacA*-R, y *Bo.ΔvirB2*-R, las que presentaron unos recuentos ligeramente mayores a la cepa parental (Tabla XX).

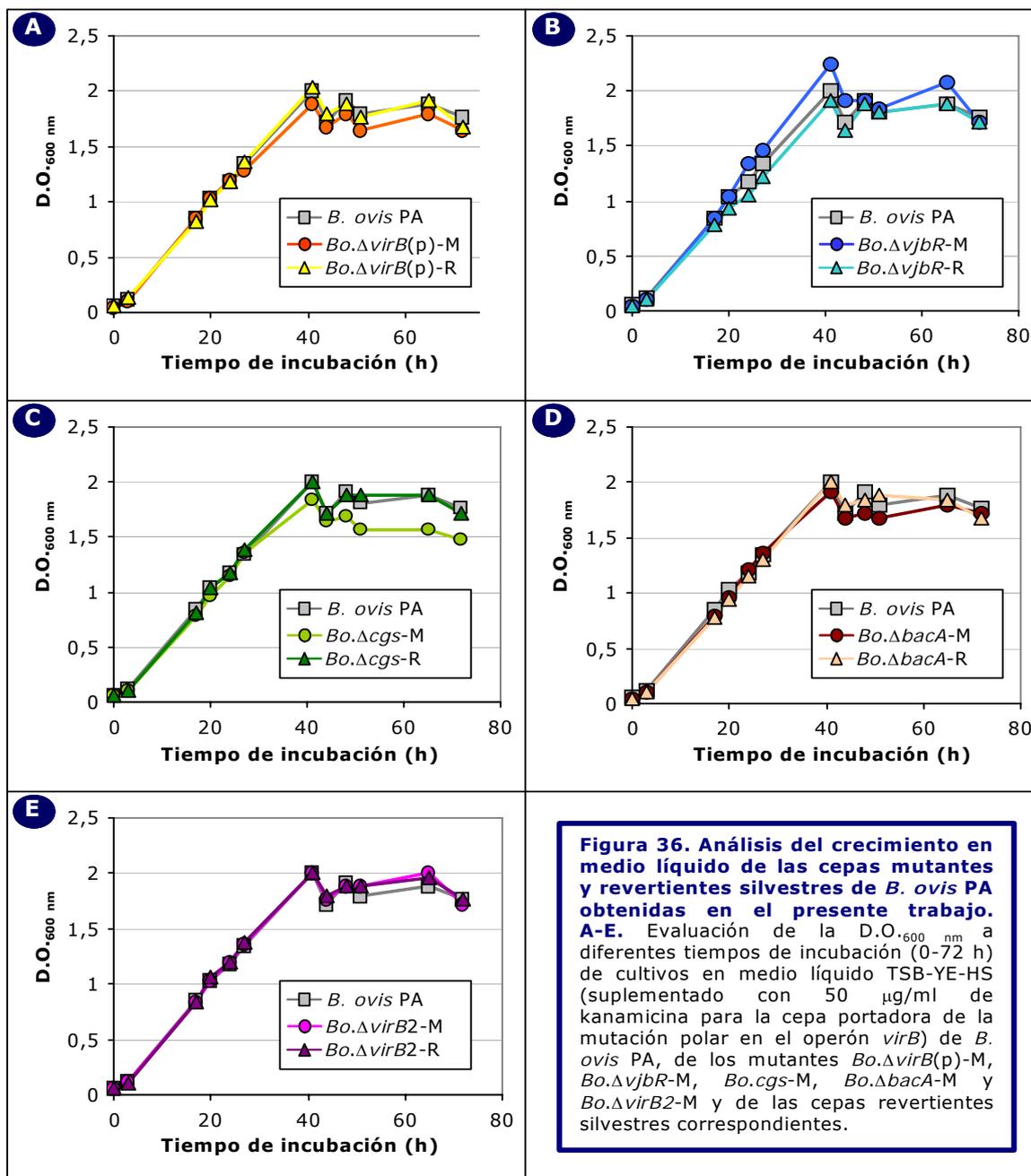


Tabla XX. Recuento de las UFC/ml y valor de la D.O._{600 nm} a distintos tiempos de incubación de cultivos en medio líquido de la colección de cepas mutantes (M) y revertientes (R) de *B. ovis* PA generada en este estudio.

Hora D.O. 600 nm	<i>B. ovis</i> PA	<i>Bo.ΔvirB(p)</i>		<i>Bo.ΔvjbR</i>		<i>Bo.Δcgs</i>		<i>Bo.ΔbacA</i>		<i>Bo.ΔvirB2</i>	
		M	R	M	R	M	R	M	R	M	R
0 h	3,78x10 ⁸	3,40x10 ⁸	2,48x10 ⁸	2,04x10 ⁸	2,40x10 ⁸	2,38x10 ⁸	2,90x10 ⁸	2,56x10 ⁸	2,89x10 ⁸	3,10x10 ⁸	2,64x10 ⁸
D.O.	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
24 h	7,00x10 ⁹	8,40x10 ⁹	8,00x10 ⁹	8,30x10 ⁹	7,40x10 ⁹	1,27x10 ¹⁰	6,60x10 ⁹	9,75x10 ⁹	9,30x10 ⁹	7,00x10 ⁹	1,08x10 ¹⁰
D.O.	1,18	1,20	1,18	1,34	1,06	1,14	1,18	1,22	1,16	1,20	1,20
48 h	1,04x10 ¹⁰	1,03x10 ¹⁰	9,55x10 ⁹	8,45x10 ⁹	9,00x10 ⁹	1,28x10 ¹⁰	6,70x10 ⁹	9,90x10 ⁹	1,22x10 ¹⁰	8,65x10 ⁹	1,17x10 ¹⁰
D.O.	1,92	1,80	1,88	1,92	1,88	1,68	1,88	1,72	1,84	1,88	1,88

3.3.3 Estudio de las propiedades de la membrana externa.

Con el fin de comprobar si la inactivación de los genes *vjbR*, *cgs*, *bacA*, *virB2* y del operón *virB* causaba en las cepas mutantes de *B. ovis* PA alguna alteración relacionada con las propiedades de la membrana externa y que podría a su vez, repercutir en la virulencia de la bacteria, sometimos a estas cepas a diversos ensayos que permiten evaluar si la integridad de su membrana se ha visto afectada.

- Análisis de la autoaglutinación en medio líquido de las cepas mutantes y revertientes silvestres de *B. ovis* PA.

En primer lugar, evaluamos la capacidad de autoaglutinación en medio líquido TSB-YE-HS que presentaba cada una de las cepas modificada genéticamente derivada de *B. ovis* PA obtenidas en este trabajo. Como un control positivo del proceso de autoaglutinación se incluyó también en el experimento la cepa naturalmente rugosa *B. canis* RM6/66.

Para la realización de dicho estudio se prepararon suspensiones de cada bacteria en medio líquido a una D.O._{600 nm} de 0,8 y posteriormente, sin agitación, se fueron analizando las variaciones que sufría este valor de D.O. a distintos tiempos (Apartado 6.4.1 de Materiales y Métodos). Los datos obtenidos se expresaron como la media de los porcentajes de D.O._{600 nm} procedentes de tres ensayos independientes, considerando la D.O._{600 nm} inicial de 0,8 como el 100 %. Así, se pudo comprobar que los porcentajes de D.O. de la suspensión correspondiente a *B. ovis* PA sufrían unas variaciones mínimas a lo largo de todo el experimento con respecto a la D.O. inicial. Del mismo modo, se obtuvieron comportamientos idénticos a la cepa parental por parte de los mutantes *Bo. ΔvirB(p)-M*, *Bo. ΔbacA-M* y *Bo. ΔvirB2-M*, así como de las respectivas cepas revertientes silvestres (datos no mostrados). Por el contrario, a pesar de no llegar a los niveles de sedimentación mostrados por *B. canis* RM6/66, las cepas mutantes *Bo. ΔvjbR-M* y *Bo. Δcgs-M* sí que presentaron una ligera disminución en el tiempo de los valores de D.O., alcanzando un porcentaje del 89 % al final del estudio (Figura 37A y 37B). Este suceso en cambio, no fue observado en el análisis llevado a cabo de las cepas revertientes silvestres de ambos mutantes (Figura 37A y 37B).

- Evaluación de la sensibilidad a polimixina B, desoxicolato de sodio, peróxido de hidrógeno y pH ácido de la colección de cepas mutantes y revertientes silvestres de *B. ovis* PA.

En la misma línea de seguir analizando si las mutaciones originadas en la cepa naturalmente rugosa *B. ovis* PA causaban alteraciones en la membrana externa que pudiesen provocar una disminución de la virulencia de la bacteria, realizamos varios

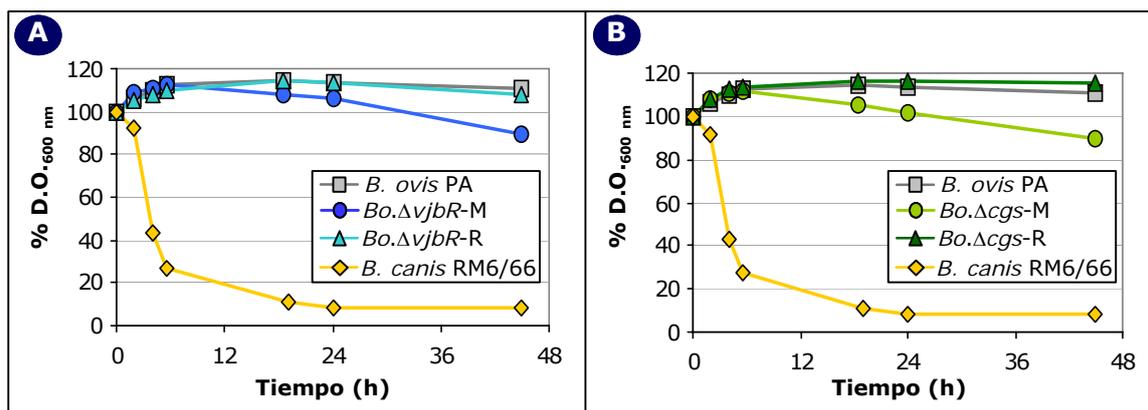


Figura 37. Autoaglutinación en medio líquido de las cepas mutantes *Bo.ΔvjbR-M* (A) y *Bo.Δcgs-M* (B). Con el fin de evaluar esta capacidad en ambas cepas, se realizó un seguimiento de la D.O._{600 nm} de suspensiones de cada bacteria preparadas en TSB-YE-HS a distintos tiempos. Como controles del experimento se incluyeron también la cepa parental *B. ovís* PA, las cepas revertientes silvestres correspondientes y la cepa naturalmente rugosa *B. canis* RM6/66. Los datos representados hacen referencia a la media de tres ensayos llevados a cabo independientemente en las mismas condiciones, considerando la D.O._{600 nm} inicial de las suspensiones (0,8) como el valor 100% en cada caso. Para una mayor claridad, no se han incluido en las gráficas la desviación estándar de cada punto ya que en todos los casos fue poco representativa (D.E.<2,78).

ensayos para evaluar si la capacidad de resistencia al efecto bactericida de ciertos compuestos se veía alterada en cada cepa mutante. Inicialmente, llevamos a cabo un estudio de la sensibilidad que mostraba la colección de mutantes a la acción bactericida de un péptido catiónico (la polimixina B) y de un detergente aniónico (el desoxicolato de sodio). Para ello, se determinaron las tasas de supervivencia que presentaban estas cepas tras ser expuestas durante 1 hora a una concentración en PBS de 1 mg/ml de polimixina B y de 0,1 mg/ml de desoxicolato de sodio (Ver Apartados 6.4.2 y 6.4.3 de Materiales y Métodos). Como controles, se incluyeron en dicho experimento, además de la cepa parental *B. ovís* PA, las correspondientes cepas revertientes silvestres. Con el fin de poder comparar los resultados obtenidos, se calculó para cada cepa el porcentaje de supervivencia una vez transcurrida la exposición, considerando como el 100 % de supervivencia, el recuento de UFC/placa obtenido tras la incubación en PBS sin agente durante el mismo periodo de tiempo. Así, se pudo observar que los porcentajes de supervivencia de las cepas mutantes y revertientes silvestres tras la exposición a polimixina B eran muy similares al obtenido en la cepa parental (63,4 %), exceptuando un mínimo descenso de la resistencia ofrecida a este péptido del mutante *Bo.ΔvjbR-M* (47,77 %, $P=0,0064$) y un ligero aumento de la misma en la cepa *Bo.ΔbacA-M* (82,03 %, $P=0,0016$) (Figura 38A). No se obtuvo en cambio, ninguna diferencia significativa entre la escasa sensibilidad mostrada por la cepa parental a la acción bactericida del desoxicolato de sodio (95,62 %) y la observada en cada cepa mutante y su revertiente silvestre (Figura 38B).

Posteriormente, también decidimos evaluar el grado de resistencia que presentaban las cepas mutantes de *B. ovís* PA obtenidas a dos condiciones que la

bacteria se encuentra durante el tráfico intracelular que lleva a cabo por la célula hospedadora: a un pH ácido y al ataque bactericida por intermediarios del oxígeno.

En primer lugar, realizamos un ensayo similar al descrito anteriormente para analizar las tasas de mortalidad tras la exposición a un pH ácido. Para ello, incubamos durante 5 horas cada cepa en PBS (como control del 100 % de supervivencia) y en tampón citrato a pH 4 (ver Apartado 6.4.4 de Materiales y Métodos). Los porcentajes de supervivencia obtenidos en todas las cepas de *B. ovis* PA incluidas en el experimento reflejaron la ausencia de diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad mostrada a la exposición a un pH ácido (Figura 38C).

Finalmente, para concluir el estudio de la integridad de la membrana externa de las cepas mutantes de *B. ovis* PA, determinamos su sensibilidad al peróxido de hidrógeno, un intermediario producido durante la explosión oxidativa de los macrófagos y utilizado por éstos como un mecanismo bactericida. Para ello, se extendieron masivamente 100 µl de una suspensión en PBS de cada cepa a una D.O._{600 nm} de 0,2 en placas de TSA-YE-HS, y posteriormente, en cada una de ellas centralmente, se depositó un disco de papel Whatman impregnado con 10 µl de peróxido de hidrógeno al 30 %. Una vez transcurridas 72 horas de incubación, se midieron los diámetros de los halos de inhibición generados y se calculó para cada cepa, la media ± la desviación estándar de los valores obtenidos provenientes de tres placas independientes (ver Apartado 6.4.5 de Materiales y Métodos). De nuevo, pudimos observar que no existían diferencias significativas entre la sensibilidad mostrada al agente inhibidor por las cepas mutantes y revertientes silvestres analizadas y la exhibida por la cepa parental (Figura 38D).

3.4 Evaluación del efecto de la inactivación del operón *virB* y de los genes *vjbR*, *cgs*, *bacA* y *virB2* sobre la expresión de los genes de la familia *omp25/omp31* en *B. ovis* PA.

Realizamos un estudio de la expresión de los genes *omp31*, *omp25*, *omp25c* y *omp22*, los cuales pertenecen a la familia *omp25/omp31* y codifican PME funcionales en *B. ovis* PA, en la colección de cepas mutantes y revertientes silvestres derivadas de esta cepa con el fin de analizar si se veía afectada como consecuencia de las inactivaciones génicas efectuadas. Este análisis fue llevado a cabo a través de la detección de las PME Omp31, Omp25, Omp25c y Omp22 mediante el uso de la técnica Western Blot (Apartado 3.8.2 de Materiales y Métodos). Para ello, empleamos un AcM específico frente a Omp25 (AcM-C09, Tabla XII) y los anticuerpos policlonales obtenidos en conejo frente a las proteínas Omp25c y Omp22 de *B. ovis* PA y frente a la proteína Omp31b de *B. abortus* 544 (Apartado 4 de Materiales y Métodos). El uso de este último suero se debe a que previamente comprobamos que presenta una reactividad serológica

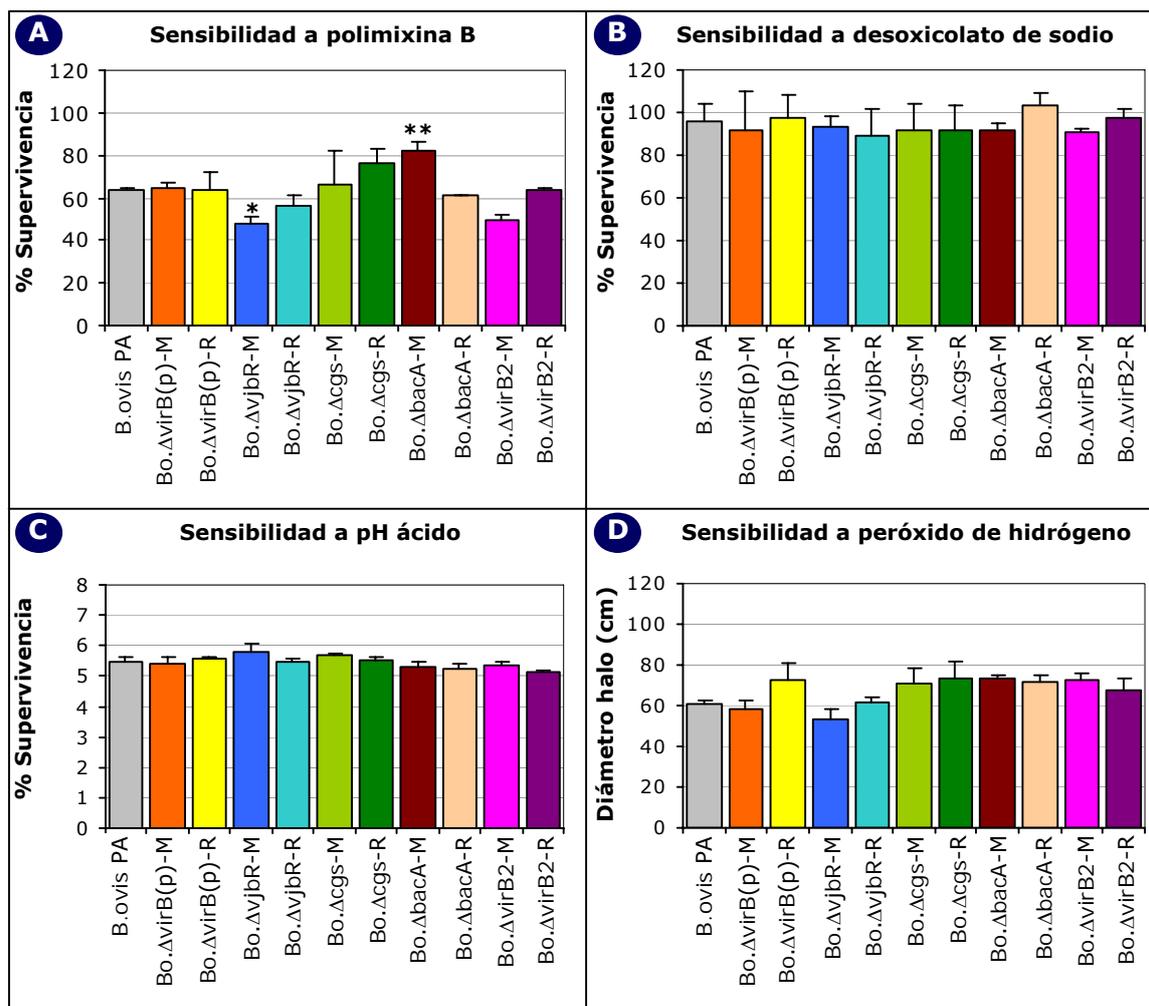


Figura 38. Sensibilidad a la exposición a polimixina B (A), desoxicolato de sodio (B), pH ácido (C) y peróxido de hidrógeno (D) de las cepas mutantes y revertientes silvestres de *B. ovis* PA obtenidas en el presente trabajo. A-C. Se muestran los porcentajes de supervivencia de cada cepa tras su exposición durante 1 hora a concentraciones de 1mg/ml de polimixina B y de 0,1 mg/ml de desoxicolato de sodio, y los obtenidos tras ser incubadas por un periodo de 5 horas en tampón citrato a pH 4. En cada cepa se consideró como el valor 100 % de supervivencia el número de UFC/placa obtenido en incubaciones paralelas en PBS únicamente. Los datos mostrados representan la media \pm la desviación estándar de los porcentajes obtenidos en tres ensayos independientes. **D.** Representación gráfica de la media \pm la desviación estándar del diámetro del halo de inhibición producido por acción del peróxido de hidrógeno en tres placas diferentes. Simbología: * y ** indican una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el resultado obtenido en la cepa parental ($P \leq 0,01$ y $\geq 0,001$, respectivamente).

cruzada muy fuerte con la proteína Omp31, reaccionando con ella con una intensidad incluso mayor que la mostrada por el anticuerpo monoclonal frente a Omp31 (AcM-G02) (Apartado 2.2.1 de Resultados). De este estudio decidimos descartar la evaluación de la expresión del gen *omp25d* ya que no se pudo detectar la presencia de la PME que codifica en *B. ovis* PA con los anticuerpos policlonales generados en conejo frente a ella (Apartado 2.2.1 de Resultados).

Los resultados obtenidos mediante Western Blot se muestran en la Figura 39, donde se observa que en todas las cepas modificadas genéticamente de *B. ovis* PA, se

podieron detectar las cuatro PME analizadas. Además la expresión de los genes que las codifican parece no verse afectada por las mutaciones efectuadas en la cepa en el operón *virB* y en los genes *bacA* y *virB2* (Figura 39A-39D, carriles 6-11). En cambio, la inactivación del gen *cgs* en *B. ovnis* PA parece afectar a la expresión de los genes *omp25c* y *omp22* ya que las bandas correspondientes a las proteínas que codifican fueron ligeramente más débiles en el mutante *Bo. Δcgs*-M que en la cepa parental (Figura 39C y 39D, carriles 4 y 5). Esta misma observación se pudo apreciar en la cepa *Bo. ΔvjbR*-M en cuanto a la serie de bandas de 29-30 kDa que presenta la proteína Omp25c (Figura 39C, carriles 2 y 3).

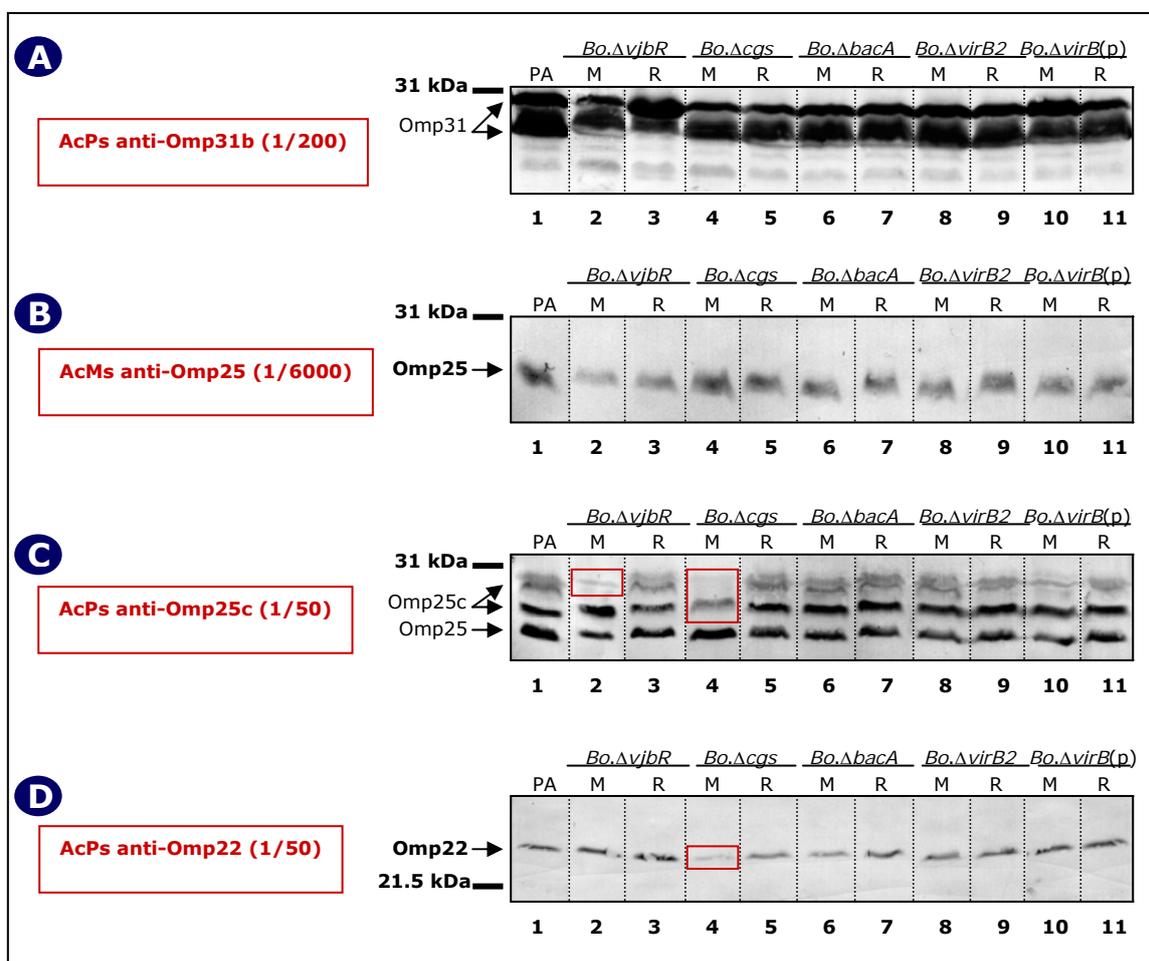


Figura 39. Análisis por Western Blot de la expresión de las PME Omp31 (A), Omp25 (B), Omp25c (C) y Omp22 (D) en las cepas mutantes y revertientes silvestres obtenidas en *B. ovnis* PA. La detección de las PME se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal frente Omp25 (AcM-C09) y los AcPs obtenidos en conejo frente a las proteínas recombinantes purificadas Omp31b de *B. abortus* 544 y Omp25c y Omp22 de *B. ovnis* PA, en las diluciones indicadas. Mediante flechas se señalan las posiciones de las PME detectadas y recuadradas en rojo, aquellas que reaccionaron más débilmente con los sueros en comparación con la cepa parental. Así mismo, se representa la proteína del marcador de peso molecular empleado más cercana a la PME detectada. Abreviaturas: PA (*B. ovnis* PA), M (cepa mutante) y R (cepa revertiente silvestre).

3.5 Estudio de la virulencia en ratones BALB/c de las cepas mutantes de *B. ovis* PA en el operón *virB* y en los genes *vjbR*, *cgs*, *bacA* y *virB2*.

Con el fin de analizar si la inactivación de los genes *vjbR*, *cgs*, *bacA*, *virB2* y del operón *virB* en *B. ovis* PA provocaba una atenuación en la virulencia de la bacteria, llevamos a cabo un estudio de la colonización esplénica que presentaban dichas cepas mutantes en ratones BALB/c (Apartado 7.1 de Materiales y Métodos). Para ello, se inocularon intraperitonealmente 10 ratones por cepa con una dosis aproximada de 1×10^6 UFC/ratón, y posteriormente, se determinó el número de bacterias viables presente en los bazos de un grupo de 5 ratones a las semanas 3 y 8 p.i., según se describe en el Apartado 7 de Materiales y Métodos. Las dosis exactas de inoculación, halladas mediante un recuento retrospectivo, fueron equivalentes para todas las cepas bajo estudio (Figura 40B).

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que la cepa mutante *Bo. ΔbacA*-M no presentaba ninguna atenuación en su virulencia ya que mostró niveles de infección muy similares a los observados en la cepa parental (Figura 40A). Por el contrario, en la semana 3 p.i., la cepa mutante polar *Bo. ΔvirB(p)*-M y los mutantes en fase *Bo. ΔvjbR*-M, *Bo. Δcgs*-M y *Bo. ΔvirB2*-M presentaron unos recuentos esplénicos muy inferiores a los obtenidos con la cepa parental. Incluso, en la semana 8 p.i., en el caso de las cepas *Bo. ΔvirB(p)*-M, *Bo. ΔvjbR*-M y *Bo. ΔvirB2*-M no se llegó a aislar ninguna bacteria en los bazos. (Figura 40A). Con el fin de verificar la correcta identidad de cada cepa recuperada del bazo tras llevar a cabo los recuentos en placa oportunos, se realizaron diversas reacciones de PCR empleando para ello, las mismas parejas de oligonucleótidos utilizadas para la caracterización genética de cada mutante (Apartado 3.2 de Resultados). En el caso del mutante polar *Bo. ΔvirB(p)*-M, los recuentos esplénicos obtenidos en placas de TSA-YE-HS con y sin kanamicina fueron idénticos, lo que indica que la cepa generada en este estudio posee una mutación estable. Por último, cabe señalar que los niveles de infección observados mostraron una correlación directa con los pesos de los bazos extraídos. De este modo, los bazos con un mayor peso se obtuvieron de los ratones que había sido infectados con la cepa parental y el mutante no atenuado *Bo. ΔbacA*-M (Figura 40B). Por el contrario, en las demás cepas mutantes analizadas, en las cuales los recuentos esplénicos fueron muy bajos o nulos, la esplenomegalia inducida fue mucho menor o inexistente (Figura 40B).

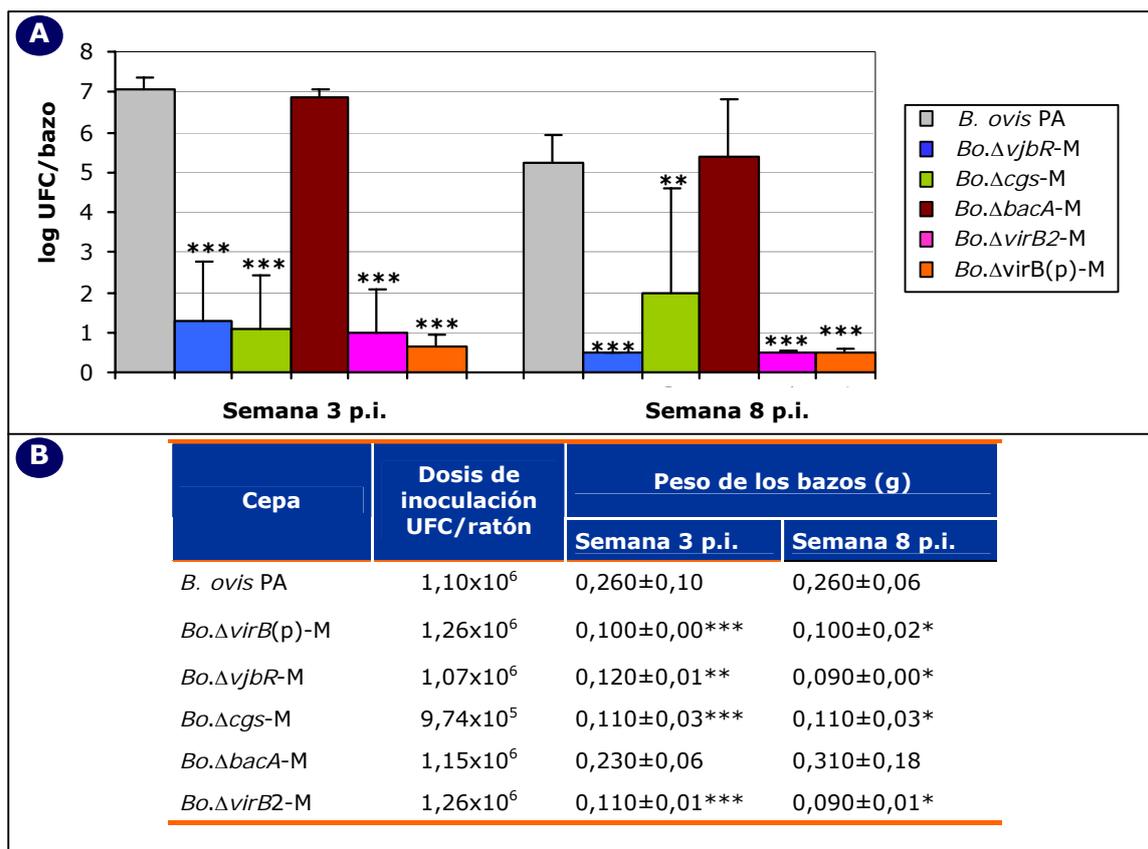


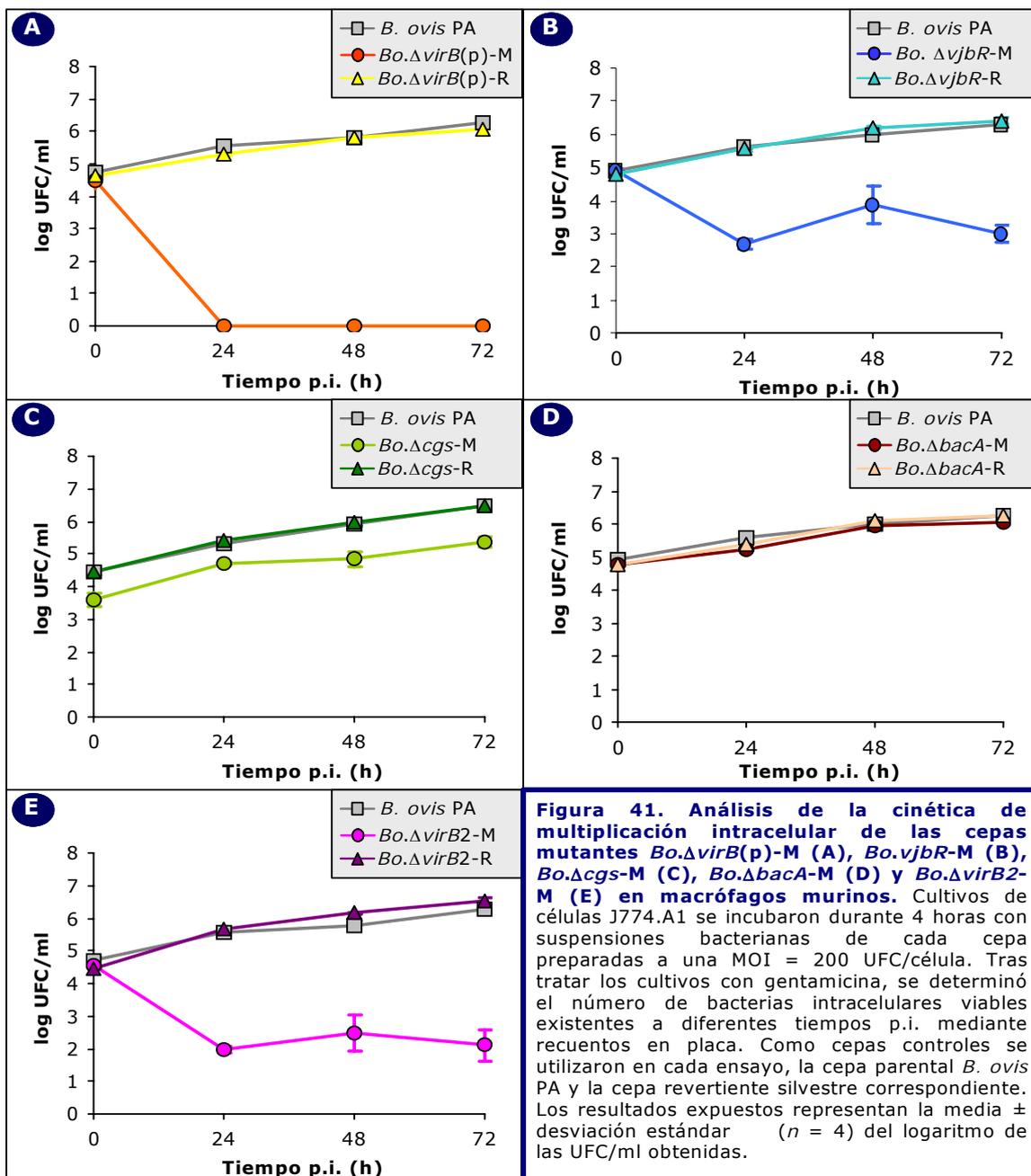
Figura 40. Análisis de la virulencia en ratones BALB/c de las cepas mutantes de *B. ovnis* PA obtenidas en el presente trabajo. A. Se muestran los valores de infección de esplénica obtenidos a las semanas 3 y 8 p.i., expresados como la media \pm desviación estándar del log de UFC/bazo siendo $n=5$. **B.** Dosis (UFC/ml) exactas de cada una de las cepas inoculadas intraperitonealmente y media \pm desviación estándar del peso de los bazos procedentes de ratones BALB/c infectados con cada una de las cepas y sacrificados a las semanas 3 y 8 p.i. (expresados en gramos). El nivel de significación estadística existente al comparar los resultados obtenidos en cada cepa mutante de *B. ovnis* PA con los valores generados por la cepa parental se muestran mediante: * $P \leq 0,01$, ** $P \leq 0,001$, *** $P \leq 0,0001$.

3.6 Análisis de la capacidad infectiva y de multiplicación intracelular de las cepas mutantes de *B. ovnis* PA en el operón *virB* y en los genes *vjbR*, *cgs*, *bacA* y *virB2* en cultivos de macrófagos murinos.

En vista de los resultados anteriores, en los cuales se observó una marcada atenuación en virulencia de la cepa mutante polar *Bo.ΔvirB(p)-M* y de los mutantes en fase *Bo.ΔvjbR-M*, *Bo.Δcgs-M* y *Bo.ΔvirB2-M*, decidimos evaluar si esa atenuación estaba relacionada con una disminución en la capacidad de supervivencia intracelular de dichas bacterias en células fagocíticas profesionales. Para ello, realizamos diversos ensayos de infección de cultivos de macrófagos murinos J774.A1 empleando las condiciones experimentales señaladas en el Apartado 8.4 de Materiales y Métodos. En cada experimento se incluyó, aparte de la cepa control *B. ovnis* PA, la cepa revertiente silvestre correspondiente. Los resultados obtenidos revelaron que, al igual que sucedió en los estudios de virulencia realizados en ratón, la inactivación del gen *bacA* no afectaba a la

capacidad de internalización y multiplicación intracelular de *B. ovis* PA (Figura 41D). Por el contrario, las mutaciones en los genes *vjbR*, *cgs*, *virB2* y en el operón *virB* tuvieron como consecuencia diferentes grados de atenuación en la virulencia del microorganismo. De este modo, el caso más drástico se observó en la cepa mutante *Bo.ΔvirB(p)-M*, la cual, a pesar de que inicialmente mostró niveles de infección similares a los de la cepa parental, a las 24 horas p.i. era totalmente eliminada por las células fagocíticas (Figura 41A). Sin llegar a una completa anulación de su supervivencia intracelular, las cepas mutantes *Bo.ΔvjbR-M* y *Bo.ΔvirB2-M* presentaron una marcada disminución en el número de bacterias intracelulares, con un descenso a las 72 horas p.i. de 1,92 y 2,46 unidades logarítmicas, respectivamente (Figura 41B y 41E). Por último, la inactivación del gen *cgs* afectó principalmente a la capacidad invasiva de la bacteria, observándose una reducción de 0,87 unidades logarítmicas en relación con la cepa parental (Figura 41C). Esta diferencia entre los recuentos observados inicialmente entre *B. ovis* PA y la cepa mutante también se fue manteniendo a los distintos tiempos p.i. analizados ya que la capacidad de replicación intracelular de *Bo.Δcgs-M* fue muy similar a la de la cepa parental (Figura 41C). Cabe señalar que en todos los ensayos de infección realizados, la cinética de multiplicación intracelular presentada por cada cepa revertiente silvestre estudiada fue prácticamente la misma que la seguida por la cepa parental *B. ovis* PA (Figura 41A-41E). Finalmente, con el fin de verificar que los defectos observados en cuanto al comportamiento intracelular mostrado por las cepas *Bo.ΔvirB(p)-M*, *Bo.vjbR-M*, *Bo.ΔvirB2-M* y *Bo.Δcgs-M* no estaban causados por un efecto citotóxico de la infección, determinamos la actividad LDH presente en los sobrenadantes de los cultivos a los diferentes tiempos p.i.. Los resultados obtenidos demostraron la inexistencia de diferencias significativas entre los porcentajes de muerte celular observados en cultivos infectados por la cepa parental y por las cepas mutantes analizadas (datos no mostrados).

En vista de los resultados obtenidos en los ensayos de infección de cultivos de macrófagos realizados previamente, donde se observó una atenuación en la virulencia de los mutantes en fase *Bo.ΔvjbR-M*, *Bo.Δcgs-M* y *Bo.ΔvirB2-M*, procedimos a complementar dichas cepas con el correspondiente gen silvestre con el objeto de comprobar si este proceso permitía recuperar los niveles de infección mostrados por la cepa parental. La complementación de cada cepa mutante se llevó a cabo introduciendo un plásmido recombinante portador del gen silvestre de interés mediante electroporación (ver Apartado 5.2.2 de Materiales y Métodos). Estos plásmidos, además de ser capaces de replicarse en *Brucella* spp, poseen en su secuencia un gen que confiere al microorganismo resistencia a kanamicina o a ampicilina, permitiendo su selección. Una vez confirmada la complementación de las cepas mutantes mediante hibridación de ADN utilizando la técnica denominada Blot de colonias (ver Apartado 5.2.2 de Materiales y Métodos), analizamos las cinéticas de multiplicación intracelular que



presentaban en cultivos de macrófagos J774.A1. Para ello, realizamos ensayos de infección siguiendo la metodología descrita para las cepas mutantes (Apartado 8.4 de Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos mostraron que las cepas complementadas *Bo.ΔvjbR-COM* y *Bo.Δcgs-COM* presentaban un comportamiento intracelular similar al observado en las respectivas cepas mutantes (Figura 42A y 42B). Por el contrario, y a pesar de no alcanzar los niveles de infección mostrados por la cepa parental *B. ovis* PA, la complementación con el gen silvestre *virB2* sí que le proporcionó a la cepa mutante *Bo.ΔvirB2-M* una cierta recuperación de su capacidad de multiplicación intracelular (Figura 42C).

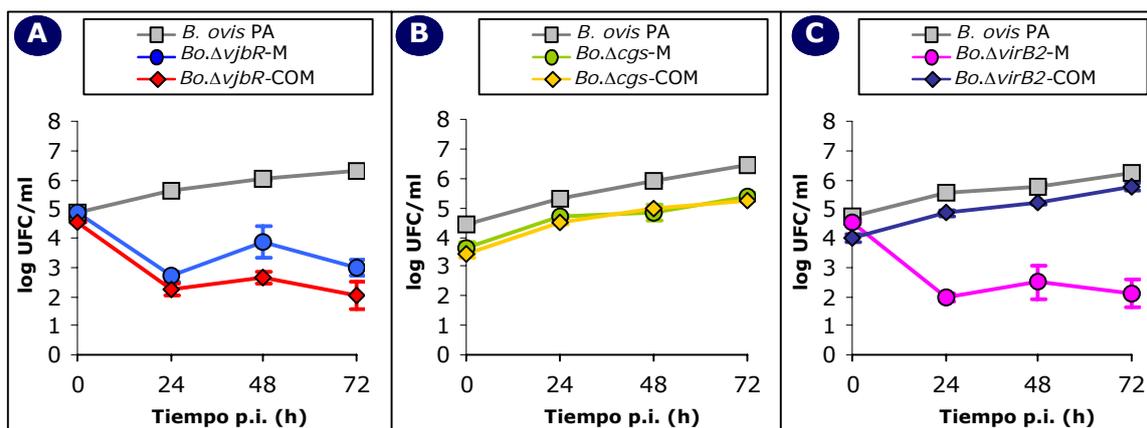


Figura 42. Estudio de la cinética de multiplicación intracelular de las cepas *Bo.ΔvjbR*-COM (A), *Bo.Δcgs*-COM (B) y *Bo.ΔvirB2*-COM (C) en cultivos de macrófagos murinos. Se muestra la media \pm la desviación estándar ($n = 4$) del logaritmo de las UFC/ml obtenidas a diferentes tiempos p.i. en ensayos de infección de células J774.A1 realizados utilizando las cepas mutantes en fase *Bo.ΔvjbR*-M, *Bo.ΔvjbR*-M, *Bo.ΔvjbR*-M y las cepas complementadas correspondientes.

Discusión

1. ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES ENTRE LAS CEPAS NATURALMENTE RUGOSAS *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66 Y LAS CÉLULAS FAGOCÍTICAS.

1.1 Evaluación del efecto citotóxico causado por una infección de *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66.

Estudios previos han demostrado que las estirpes lisas virulentas de *Brucella* no causan un efecto citotóxico en las células fagocíticas cuando las infectan y que además, son capaces de interferir en el proceso de apoptosis de las células hospedadoras (Galdiero *et al.*, 2000; Gross *et al.*, 2000; Fernández-Prada *et al.*, 2003; Pei and Ficht, 2004). Todo ello les permite obtener un claro beneficio propio ya que su supervivencia y multiplicación intracelular se ve favorecida. En contraste, se ha observado que cepas mutantes rugosas obtenidas a partir de *B. abortus* y *B. melitensis* se encuentran atenuadas debido a que, a pesar de ser capaces de replicarse en las células hospedadoras, causan la muerte celular de éstas. Esto último provoca que las bacterias sean liberadas tempranamente al medio extracelular, donde son destruidas por diferentes mecanismos bactericidas (Fernández-Prada *et al.*, 2003; Pei and Ficht, 2004; Pei *et al.*, 2006; Qin *et al.*, 2008). Hasta el momento, existen varias evidencias científicas que indican que la muerte de las células hospedadoras acontece a través de procesos de apoptosis, oncosis y necrosis (Pei and Ficht, 2004; Pei *et al.*, 2006; Chen and He, 2009), aunque los mecanismos y los genes responsables de este efecto citotóxico, específico de macrófagos, todavía no han sido plenamente elucidados.

En contraste a estas observaciones, los resultados experimentales obtenidos en el presente trabajo han demostrado que las infecciones causadas por *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66, dos cepas naturalmente rugosas, apenas provocan efectos citotóxicos tanto en cultivos de células HeLa como en cultivos de macrófagos J774.A1 (Apartado 1.1 de Resultados). Por tanto, es posible concluir que, a diferencia de lo que sucede en los mutantes rugosos, la ausencia de cadenas polisacáridicas *O* en estas dos cepas no es responsable de un efecto citotóxico en ninguno de los dos tipos de cultivos celulares analizados.

Esta discrepancia en cuanto a la citotoxicidad mostrada por los mutantes rugosos y las cepas naturalmente rugosas *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66, podría residir en posibles diferencias en la estructura del R-LPS ya que la ausencia de las cadenas polisacáridicas *O* en el lipopolisacárido puede deberse a distintas mutaciones en el genoma de la bacteria. Estas mutaciones afectan a la síntesis, polimerización o transporte de las cadenas *O* y pueden incluso llegar a alterar la estructura del núcleo oligosacárido (Monreal *et al.*, 2003; González *et al.*, 2008). Probablemente, en el caso de las cepas mutantes rugosas obtenidas a partir de estirpes lisas de *Brucella*, la citotoxicidad observada sea debida más a posibles efectos pleiotrópicos derivados de la eliminación de las cadenas *O* que causan

alteraciones en las propiedades topológicas, biológicas y físico-químicas de la envuelta celular y que provocan un distinto comportamiento de la bacteria. Esta circunstancia podría entonces justificar la citotoxicidad causada por la cepa mutante rugosa *B. abortus* RB51 en cultivos de células HeLa (Apartado 1.1 de Resultados, Tabla XVI). Además, hay que tener en cuenta que la membrana externa de las especies del género *Brucella* presenta propiedades diferentes relacionadas posiblemente con una diversa composición (Martín-Martín *et al.*, 2010), y que podrían contribuir, al menos en parte, a un distinto efecto citotóxico causado por la infección de este patógeno.

Finalmente, Pei *et al.*, 2008b y Zhong *et al.*, 2009 han determinado la implicación del Sistema de Secreción de Tipo IV (T4SS) en la citotoxicidad causada por las cepas de *Brucella* en los cultivos celulares. Adicionalmente, estos autores han señalado que en el caso de las cepas mutantes rugosas, la ausencia de las cadenas polisacáridicas *O* en el lipopolisacárido podría provocar un aumento de la exposición del sistema de secreción en la superficie de la bacteria. Esto podría favorecer entonces, que distintas proteínas efectoras fueran más fácilmente secretadas a las células hospedadoras, lo que incrementaría el efecto citotóxico de la infección. En contraste a estas observaciones, los dos mutantes en el operón *virB* de *B. ovis* PA generados en este trabajo de investigación, no presentaron variación alguna en cuanto a la citotoxicidad causada en cultivos de macrófagos murinos en relación a la cepa parental (datos no mostrados). En consecuencia, es posible que en el caso de la cepa naturalmente rugosa *B. ovis* PA, el T4SS no ejerza un papel relevante en la citotoxicidad causada por la bacteria.

1.2 Análisis del nivel de activación de los macrófagos infectados por *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66.

Investigaciones previas han demostrado que la ausencia de las cadenas polisacáridicas *O* en el lipopolisacárido de estirpes lisas de *Brucella* provoca un fuerte estado de activación del macrófago como respuesta a la infección, lo cual se ve reflejado por una mayor producción y liberación de citoquinas y quimioquinas por parte de la célula fagocítica (Rittig *et al.*, 2003; Jiménez de Bagüés *et al.*, 2004). En base a estas evidencias científicas, en el presente trabajo de investigación hemos estudiado si la infección por *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66, dos cepas naturalmente rugosas, inducían también fuertes estados de activación en macrófagos murinos. Para ello, determinamos los niveles de TNF α e IL12 presentes en los sobrenadantes de cultivos de células J774.A1 infectados por ambas cepas. Los resultados obtenidos demostraron que tanto *B. ovis* PA como *B. canis* RM6/66 apenas inducían una activación del macrófago, al igual que sucedía con la cepa lisa *B. abortus* 2308 utilizada como control (Apartado 1.1 de Resultados, Figura 18). Estos resultados concuerdan con los descritos previamente por Caron *et al.* en 94, ya que estos autores también detectaron niveles bajos de TNF α en los

sobrenadantes de cultivos de macrófagos U937 diferenciados durante una infección por *B. canis* RM6/66. En contraste, en los ensayos realizados en el presente trabajo con la cepa mutante rugosa *B. abortus* RB51, detectamos un aumento significativo de la producción de TNF α a las 24 horas p.i. y de IL12 a las 48 horas p.i. (Apartado 1.1 de Resultados, Figura 18). Una posible explicación a estas diferencias observadas en los grados de activación de las células fagocíticas podría residir en la utilización de distintas rutas de entrada al macrófago por parte de las especies lisas de *Brucella* y de las cepas mutantes rugosas generadas a partir de ellas. Así, se ha demostrado que las especies lisas de *Brucella* penetran en los macrófagos mediante una vía de entrada mediada por los lípidos rafts (Kim *et al.*, 2002; Naroeni and Porte, 2002; Watarai *et al.*, 2002a; Watarai *et al.*, 2002b) dependiente además, de la señalización llevada a cabo por los receptores TLR4 ("Toll-like receptors") (Triantafilou *et al.*, 2002; Pei *et al.*, 2008a), los cuales se ha comprobado que no se encuentran implicados en la activación del macrófago como sucede con los receptores TLR2 (Huang *et al.*, 2003; Pei *et al.*, 2008a). Por el contrario, se ha observado que las cepas mutantes rugosas no emplean esta ruta de entrada para internalizarse en las células fagocíticas, empleando para ello, otros receptores que todavía no han sido identificados (Porte *et al.*, 2003). El hecho de que tanto *B. ovis* PA como *B. canis* RM6/66 usen una ruta de entrada al macrófago mediada por los dominios lipídicos como las cepas lisas, lo cual ha sido demostrado en el presente trabajo (Apartado 1.3.1 de Resultados), podría explicar entonces el bajo grado de activación de las células fagocíticas observado. Por tanto, estas dos cepas naturalmente rugosas, al igual que ocurre con las cepas lisas y al contrario que sucede con sus mutantes rugosos, serían capaces de llevar a cabo una modulación de la síntesis de mediadores inmunes por parte del macrófago durante el proceso infeccioso, lo que favorece su supervivencia intracelular.

1.3 Estudio de la tasa de multiplicación intracelular de *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66 en células fagocíticas profesionales.

Estudios sobre la virulencia en cultivos de macrófagos de cepas mutantes rugosas obtenidas a partir de estirpes lisas de *Brucella* han proporcionado diversos resultados experimentales en cuanto al comportamiento intracelular mostrado por éstas. Así, se han descrito mutantes rugosos que presentaban diferentes grados de atenuación en su supervivencia intracelular (Allen *et al.*, 1998; McQuiston *et al.*, 1999; Foulongne *et al.*, 2000; Ugalde *et al.*, 2000; Monreal *et al.*, 2003; Porte *et al.*, 2003; González *et al.*, 2008), mientras que otros, en cambio, mostraban una tasa de multiplicación intracelular muy similar a la de la cepa parental (Godfroid *et al.*, 1998). En el presente trabajo, hemos analizado la cinética de multiplicación intracelular de las cepas naturalmente rugosas *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66, y de la cepa mutante rugosa *B. abortus* RB51 en

cultivos de macrófagos J774.A1 y en cultivos de macrófagos esplénicos obtenidos de ratones BALB/c infectados con cada cepa. Los resultados obtenidos demostraron que tanto *B. ovis* PA como *B. canis* RM6/66 eran capaces de persistir en ambos tipos de cultivos, mostrando incluso, un incremento en el número de bacterias intracelulares presentes a las 72 horas p.i en la línea celular J774.A1 (Apartado 1.2 de Resultados, Figura 19). Este comportamiento intracelular se asemejó más al exhibido por la cepa lisa *B. abortus* 2308 que al de la cepa mutante rugosa *B. abortus* RB51, ya que ésta fue incapaz de replicarse en macrófagos J774.A1 y de sobrevivir en los cultivos de macrófagos esplénicos (Apartado 1.2 de Resultados, Figura 19).

Este diferente comportamiento intracelular podría residir en la utilización de rutas de entrada al macrófago distintas por parte de *B. abortus* RB51 y las dos cepas naturalmente rugosas. Así, tanto *B. ovis* PA como *B. canis* RM6/66 penetrarían a la célula fagocítica mediante una vía de entrada mediada por los "lípidos rafts", al igual que las cepas lisas (Apartado 1.3.1 de Resultados), y seguirían una ruta endocítica que permite el desarrollo de un nicho replicativo óptimo para la bacteria (Naroeni *et al.*, 2001; Porte *et al.*, 2003; Celli and Gorvel, 2004). En contraste, de acuerdo con lo descrito en otras cepas mutantes rugosas, *B. abortus* RB51 no emplearía esta ruta de entrada al macrófago, siendo rápidamente eliminada por fusión de los lisosomas con la vacuola que la transporta (Porte *et al.*, 2003).

Un segundo aspecto que explicaría la reducción que presenta *B. abortus* RB51 en la capacidad de supervivencia intracelular, en relación con la mostrada por las cepas naturalmente rugosas, podría ser el hecho de que este mutante es mucho más sensible que *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66 a la acción bactericida de la polimixina B, un péptido catiónico similar a los sintetizados por las células fagocíticas (Martín-Martín *et al.*, 2010), y a que además, a diferencia de estas dos últimas cepas, induce fuertes estados de activación en los macrófagos (Apartado 1.2 de Resultados). Por el contrario, resultados obtenidos también en este trabajo, descartan que la atenuación observada en la cepa *B. abortus* RB51 en los ensayos de infección realizados en macrófagos J774.A1 sea debida a un efecto citotóxico causado por la bacteria (Apartado 1.1 de Resultados).

Por otra parte, pudimos observar en los experimentos llevados a cabo en los cultivos de macrófagos esplénicos, que el número inicial de bacterias intracelulares de la cepa mutante rugosa *B. abortus* RB51 era bastante inferior al detectado en el caso de *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66 (Apartado 1.2 de Resultados, Figura 19). Esto podría estar relacionado con el grado de sensibilidad que presentan estas bacterias al efecto bactericida del suero no inmune y de los péptidos catiónicos, ambos mecanismos de la inmunidad innata de mamíferos involucrados en el control de patógenos extracelulares. Así, resultados obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66 son significativamente más resistentes a estos mecanismos que *B. abortus* RB51 (Martín-Martín *et al.*, 2010).

En vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que la ausencia de cadenas polisacáridicas *O* en el LPS de *B. ovis* PA y de *B. canis* RM6/66 no lleva asociada una disminución en la capacidad de supervivencia intracelular de las bacterias en las células fagocíticas, lo que justifica, al menos en parte, la marcada virulencia que muestran ambas cepas en sus respectivos hospedadores primarios.

1.4 Estudio de los mecanismos de infección empleados por *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66.

1.4.1 Papel de los "lípidos rafts" en la internalización y multiplicación intracelular de *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66 en macrófagos murinos.

Los "lípidos rafts" son microdominios especializados de la membrana plasmática de las células eucarióticas que están enriquecidos en colesterol, esfingomielina, gangliósidos y fosfolípidos que contienen cadenas de ácidos grasos saturados. Presentan además una gran variedad de proteínas, entre las que se encuentran quinasas de la familia src, proteínas glicosilfosfatidilinositol de anclaje a la membrana (proteínas GPI) o la enzima sintasa de óxido nitroso endotelial (Pike, 2003). Esto determina que los "lípidos rafts" no sean todos iguales, sino que muestren una cierta heterogeneidad en cuanto a su composición. Debido a la presencia de colesterol, estas regiones son menos fluidas que el resto de la membrana plasmática y se comportan como balsas lipídicas compactas y organizadas (Pike, 2003). Los "lípidos rafts" poseen un enorme dinamismo de formación y disgregación y se ha comprobado que se encuentran implicados en procesos celulares fundamentales tales como la transducción de señales o la endocitosis. Se han observado numerosos fenómenos donde sucede un reclutamiento de "lípidos rafts" para la iniciación de la transducción de una señal, como sucede en la activación de los linfocitos T (Simons and Toomre, 2000; Pike, 2003). Asimismo, se ha verificado que varios microorganismos patógenos utilizan los "lípidos rafts" como una puerta de entrada a la célula hospedadora. Entre éstos se encuentran *Mycobacterium bovis* (Gatfield and Pieters, 2000), *Legionella pneumophila* (Watarai *et al.*, 2001) y algunos virus de organismos mamíferos (Pelkmans, 2005).

Resultados obtenidos experimentalmente han demostrado que las especies lisas virulentas de *Brucella* penetran en los macrófagos usando una vía de entrada mediada por los "lípidos rafts" y siguen una ruta endocítica en la cual, escapan a la fusión con lisosomas (Kim *et al.*, 2002; Naroeni and Porte, 2002; Watarai *et al.*, 2002a; Watarai *et al.*, 2002b; Porte *et al.*, 2003). La presencia de estos "lípidos rafts" en la membrana de la BCV lleva asociada la inhibición de la fusión con los lisosomas y permite que la bacteria llegue a desarrollar un nicho replicativo óptimo (Naroeni *et al.*, 2001; Porte *et al.*, 2003;

Celli and Gorvel, 2004). En contraste, se ha descrito que las cepas mutantes rugosas obtenidas por ingeniería genética de estirpes lisas de *Brucella*, no utilizan los "lípidos rafts" como vía de entrada y se fusionan rápidamente con los lisosomas (Porte *et al.*, 2003; Pei *et al.*, 2008a). En vista de ello, estos autores han señalado que la presencia de cadenas polisacáridicas *O* en el LPS es necesaria para que la bacteria penetre en la célula fagocítica mediante los "lípidos rafts" y logre, de esta manera, sobrevivir y replicarse intracelularmente.

Se ha comprobado que la eliminación de las cadenas *O* en las estirpes lisas provoca que su membrana externa sea altamente hidrofóbica y que se encuentre cargada negativamente (González *et al.*, 2008), lo que podría favorecer el establecimiento de múltiples interacciones no específicas entre la bacteria y la membrana de la célula fagocítica. Esta circunstancia podría llevar asociada una posible pérdida de la capacidad de la bacteria para seleccionar el portal de entrada al macrófago mediante los dominios lipídicos, lo cual podría ser responsable de la atenuación observada en la virulencia de estas cepas mutantes rugosas (Allen *et al.*, 1998; McQuiston *et al.*, 1999; Foulongne *et al.*, 2000; Monreal *et al.*, 2003; Porte *et al.*, 2003; González *et al.*, 2008).

En contraste a esta última observación, los resultados obtenidos en el presente trabajo han demostrado que la entrada de las cepas naturalmente rugosas *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66 en los macrófagos es dependiente del colesterol y del gangliósido GM₁, dos componentes de los "lípidos rafts", ya que la internalización de ambas cepas se veía fuertemente reducida al tratar previamente a los macrófagos con β -metil-ciclodextrina y filipina (que secuestran y unen colesterol de la membrana plasmática) y con la subunidad B de la toxina colérica (un ligando del GM₁) (Apartado 1.3.1 de Resultados, Figura 20). Por tanto, la ausencia de cadenas *O* en el LPS de *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66 no afecta a la ruta de entrada de ambas cepas en macrófagos murinos, siendo capaces de infectarlos vía "lípidos rafts". Esta puerta de entrada les permitiría, entonces, poder restringir fusiones tempranas con los lisosomas y poder llegar a expresar los genes implicados en la construcción de un nicho replicativo. Esta hipótesis se vería apoyada además, por la virulencia que muestran ambas cepas naturalmente rugosas tanto en sus hospedadores primarios, carneros y perros, como en los modelos experimentales empleados en este trabajo: ratón y cultivos celulares.

Este diferente comportamiento entre las cepas naturalmente rugosas y las cepas mutantes rugosas de *Brucella* podría residir en las particulares características que presentan los mutantes rugosos en su superficie celular.

1.4.2 Implicación del receptor SR-A en la entrada de *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66 en macrófagos murinos.

Los receptores "scavenger" presentes en la superficie de los macrófagos se encuentran implicados en una gran variedad de funciones biológicas, desde la deposición de colesterol en las paredes arteriales durante procesos de aterogénesis hasta la eliminación de macromoléculas cargadas negativamente y defensa frente a patógenos (Peiser and Gordon, 2001; Peiser *et al.*, 2002a). Esto se debe a la amplia capacidad que poseen estos receptores para unir distintos ligandos. Los receptores "scavenger" se clasifican en diferentes clases: A (receptor SR-A de tipo I y II y receptor MARCO); B (receptores CD36 y SR-BI); C (receptor dSR-CI); D (receptor CD68); E (receptor LOX-1); F (receptor SREC) y receptores Fc (Gordon, 2002; Peiser *et al.*, 2002a). Se ha descrito que el receptor SR-A está constituido por una glicoproteína transmembranal homotrimérica que se halla en la superficie de células fagocíticas mononucleares (Krieger and Herz, 1994), donde media la endocitosis de lipoproteínas modificadas (Krieger y Herz, 1994), la fagocitosis de timocitos apoptóticos (Platt *et al.*, 1996) y la adhesión de los macrófagos a superficies cubiertas por proteínas séricas (Fraser *et al.*, 1993), proteínas glucosiladas de la membrana basal (El Khoury *et al.*, 1994) y péptidos β -amiloides fibrilares (El Khoury *et al.*, 1996).

Resultados experimentales previos han demostrado que la especie lisa *B. abortus* penetra en los macrófagos en condiciones no opsonizantes mediante la utilización de este receptor, el cual se ha comprobado que se encuentra asociado a los "lípidos rafts" (Kim *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos en el presente trabajo también demostraron que la entrada en los macrófagos de las dos cepas naturalmente rugosas estudiadas, *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66, es dependiente del receptor SR-A ya que la internalización de ambas cepas se veía fuertemente bloqueada en macrófagos J774.A1 tratados con ácido poliinosínico, un ligando específico de dicho receptor (Apartado 1.3.2 de Resultados, Figura 21). Estos resultados estarían en concordancia con el hecho de que tanto *B. ovis* PA como *B. canis* RM6/66 usen una ruta de entrada mediada por los "lípidos rafts" (Apartado 1.3.1 de Resultados).

Por otra parte, se ha observado que preparaciones de LPS obtenidas de especies lisas y rugosas de *Brucella* inhiben la penetración de *B. abortus* y *B. suis* en los macrófagos (Rittig *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004), y que el receptor SR-A es capaz de unir fracciones solubles del lípido A (Hampton *et al.*, 1991). Debido a esto, se ha sugerido que el lípido A podría estar involucrado en el reconocimiento del receptor SR-A y constituir entonces, un buen ligando para este receptor (Kim *et al.*, 2004). En contraste, en el presente trabajo ninguna de las preparaciones de LPS utilizadas bloqueó la internalización de *B. abortus* 2308, *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66 en los macrófagos J774.A1 (Apartado 1.3.2 de Resultados, Figura 21). Esta discrepancia con las

observaciones señaladas anteriormente puede deberse a diferencias experimentales en cuanto a los cultivos celulares usados y/o a la pureza de los LPS empleados, ya que en nuestro modelo experimental las preparaciones se encontraban altamente purificadas con niveles de proteínas inferiores al 6% (Monreal *et al.*, 2003). No obstante, cabe destacar que en el caso de *Neisseria meningitidis*, este microorganismo utiliza el receptor SR-A para su entrada en las células fagocíticas y sin embargo, se ha demostrado que el LPS no actúa como ligando de este receptor y sí otras proteínas presentes en la bacteria (Peiser *et al.*, 2002b, Peiser *et al.*, 2006). Por tanto, otras moléculas localizadas en la superficie de *Brucella* spp. podrían constituir posibles ligandos potenciales implicados en el reconocimiento del receptor SR-A, como por ejemplo, las PME. Futuras investigaciones se tendrán que llevar a cabo con el objeto de aclarar dicho aspecto.

1.4.3 Papel de la actividad enzimática de las PI3Ks en la internalización de *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66 en macrófagos murinos.

Las fosfatidilinositol quinasas (PIKs) son una familia de enzimas que están implicadas en una gran variedad de procesos biológicos, tales como transducción de señales (Van Haastert and Devreotes, 2004), arquitectura del citoesqueleto (Behnia and Munro, 2005) dinámica de la membrana (Di Paolo and De Camilla, 2006) y síntesis de citoquinas y quimioquinas de la respuesta inmune (Aksoy *et al.*, 2005; Polumuri *et al.*, 2007). Diversos estudios experimentales han demostrado que tanto la internalización como el tráfico intracelular de estirpes lisas de *Brucella* en las células hospedadoras, es dependiente de la actividad enzimática ejercida por fosfatidilinositol 3 quinasas (PI3Ks) (Guzmán-Verri *et al.*, 2001; Pei *et al.*, 2008a; Qin *et al.*, 2008). Más concretamente, se ha demostrado que las PI3Ks que intervienen en la fagocitosis de este patógeno en células eucarióticas pertenecen a la Clase I de este grupo de quinasas y se localizan cerca de la membrana plasmática, mientras que las PI3Ks que participan en el desarrollo de un nicho replicativo óptimo para *Brucella* spp. durante su tráfico intracelular, son de la Clase III y se sitúan cerca de los endosomas (Vieira *et al.*, 2001; Qin *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron que la entrada de la cepa lisa *B. abortus* 2308 en las células fagocíticas es dependiente de la actividad enzimática de las PI3Ks ya que la internalización de esta cepa se reducía fuertemente cuando los macrófagos eran tratados con wortmanina, un inhibidor de la actividad quinasa de las PI3Ks (Apartado 1.3.3 de Resultados, Figura 22). Estos resultados concuerdan con lo observado previamente por Guzmán-Verri *et al.*, 2001, Pei *et al.*, 2008a y Qin *et al.*, 2008 en ensayos realizados con las cepas lisas *B. abortus* 2308 y *B. melitensis* 16M en células HeLa, S2 y J774.A1. Sin embargo, discrepan con los

resultados obtenidos por Kim *et al.* en 2002 en experimentos llevados a cabo en cultivos de macrófagos aislados de médula ósea utilizando la cepa *B. abortus* 544, lo cual, podría atribuirse al uso de condiciones y procedimientos experimentales diferentes.

Por otra parte, en contraste con lo observado con la estirpe lisa *B. abortus* 2308, las cepas naturalmente rugosas *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66 presentaron una tasa de penetración en cultivos celulares tratados con wortmanina similar o incluso, ligeramente superior, a la obtenida en experimentos realizados en macrófagos no tratados (Apartado 1.3.3 de Resultados, Figura 22). Cabe señalar que este comportamiento también ha sido observado en mutantes rugosos derivados de la cepa lisa *B. abortus* 2308 (Pei *et al.*, 2008a; Qin *et al.*, 2008). Por tanto, las enzimas PI3Ks podrían desempeñar papeles diferentes en la internalización de estirpes lisas y rugosas de *Brucella* en los macrófagos, sin descartar además, que otras enzimas diferentes estén implicadas en dicha entrada.

2. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS PMEs DE LA FAMILIA Omp25/Omp31 EN *Brucella* spp. Y SU IMPLICACIÓN EN VIRULENCIA.

2.1 Implicación de las PMEs Omp25d y Omp22 en la internalización y multiplicación intracelular de la cepa naturalmente rugosa *B. ovis* PA en células fagocíticas.

Diversas investigaciones realizadas previamente han demostrado que *B. abortus* es capaz de penetrar y sobrevivir intracelularmente en células fagocíticas no profesionales tales como las células HeLa (Detilleux *et al.*, 1990; Pizarro-Cerdá *et al.*, 2000; Ferrero *et al.*, 2009). Se ha descrito que esta entrada la lleva a cabo utilizando un mecanismo de invasión denominado "fagocitosis por cremallera" observado también durante los procesos de internalización de *Listeria monocytogenes* y *Yersinia pestis* (Dramsí and Cossart, 1998). Este mecanismo se caracteriza por la reorganización de la membrana plasmática de la célula eucariota en el punto de contacto con la bacteria, que desencadena posteriormente, un recubrimiento progresivo del microorganismo gracias a la intervención del citoesqueleto de actina (Pizarro-Cerdá *et al.*, 1999). Los resultados obtenidos en el presente trabajo han demostrado que la cepa naturalmente rugosa *B. ovis* PA es capaz de invadir y de sobrevivir intracelularmente en células HeLa y, además, que la presencia de las PMEs Omp25d y Omp22 en su membrana externa era necesaria para que lleve a cabo la internalización (Apartado 2.1 de Resultados, Figura 24). Este hecho indica que ambas proteínas pueden estar implicadas en el mecanismo de "fagocitosis por cremallera" empleado por la bacteria para penetrar en las células HeLa.

Por otra parte, los resultados experimentales obtenidos en este trabajo de investigación han demostrado que la ausencia de las PMEs Omp31, Omp25d y Omp22 en

la membrana externa de *B. ovis* PA causa un descenso de la capacidad invasiva de esta bacteria en macrófagos murinos J774.A1 (Apartado 2.1 de Resultados, Figura 24). En vista de estos resultados, las tres PMEs podrían estar involucradas en la entrada de *B. ovis* PA en las células J774.A1 a través de procesos dependientes de los "lípidos rafts". Adicionalmente, debido a la ausencia de cadenas polisacáridicas *O* en el lipopolisacárido de esta cepa, las PMEs se encuentran directamente expuestas en la superficie de la bacteria, por lo que podrían actuar como posibles ligandos del receptor SR-A. Futuras investigaciones serán necesarias para aclarar este aspecto, al igual que el estudio de la posible implicación de otros componentes celulares en este proceso de fagocitosis.

En cuanto a la capacidad de supervivencia y multiplicación intracelular en macrófagos J774.A1 mostrada por las diferentes cepas mutantes de *B. ovis* PA en genes de la familia *omp25/omp31*, pudimos observar que solamente la ausencia de Omp25d o de Omp22 afectaba gravemente a la replicación intracelular de la bacteria. Así, mientras que la cepa mutante $\Delta omp25d$ fue capaz de sobrevivir en los macrófagos, la cepa mutante $\Delta omp22$ fue completamente eliminada a las 24 horas p.i. (Apartado 2.1 de Resultados, Figura 24). Esta incapacidad para multiplicarse intracelularmente mostrada por las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ de *B. ovis* PA, podría justificar, al menos en parte, la fuerte reducción en la virulencia que presentan ambas cepas en ratón (Caro-Hernández *et al.*, 2007). El hecho de que ambos mutantes presenten en su membrana externa alteraciones similares, o incluso, menos acusadas que las mostradas por las cepas mutantes no atenuadas $\Delta omp31$, $\Delta omp25$ y $\Delta omp25c$ de *B. ovis* PA obtenidas mediante el mismo procedimiento (Caro-Hernández *et al.*, 2007), hace pensar que Omp25d y especialmente Omp22, podrían estar involucradas en *B. ovis* PA en el establecimiento y desarrollo de un nicho replicativo óptimo esencial para su supervivencia y multiplicación intracelular.

Por tanto, en vista de los resultados obtenidos, las PMEs Omp25d y Omp22 no solamente estarían implicadas en el mantenimiento de la integridad de la membrana externa de la bacteria, sino que también, serían relevantes para la virulencia de *B. ovis* PA al ejercer papeles fundamentales en la capacidad de invasión y multiplicación intracelular del patógeno.

2.2 Estudio de la expresión de los genes de la familia *omp25/omp31* en diferentes especies de *Brucella*.

En el presente trabajo analizamos la expresión de los siete genes que codifican las PMEs que componen la familia Omp25/Omp31 en diversas especies de *Brucella* a través de la detección inmunológica de cada proteína con anticuerpos específicos. Los resultados obtenidos reflejaron una distribución de los miembros de esta familia diferente entre las especies de *Brucella* bajo estudio (Apartado 2.2 de Resultados), lo cual podría

contribuir a la divergencia en patogenicidad y preferencia de hospedador que existe entre ellas.

A pesar de que análisis de ADN llevados a cabo señalan como factible la presencia simultánea de los siete miembros de la familia Omp25/Omp31 en *B. suis* y *B. neotomae* (Vizcaíno *et al.*, 2004), en el presente trabajo no hemos podido confirmarla, posiblemente debido a las limitaciones que presenta la técnica empleada. Sin embargo, sí que hemos obtenido las primeras evidencias de la síntesis de la proteína Omp31b en *B. neotomae*, de Omp25c en *B. ovis*, *B. canis* y *B. neotomae* y de Omp22 en *B. ovis* y *B. neotomae*, datos que se añaden a los ya existentes (Guzmán-Verri *et al.*, 2002; Wagner *et al.*, 2002; Salhi *et al.*, 2003; Conolly *et al.*, 2006; Eschenbrenner *et al.*, 2006).

Por otro lado, de acuerdo con los datos obtenidos previamente en estudios de polimorfismo de ADN, en los cuales se descubrió la presencia de defectos y/o deleciones en genes de la familia *omp25/omp31* (Vizcaíno *et al.*, 1997; Vizcaíno *et al.*, 1999; Vizcaíno *et al.*, 2004), varias de las PMEs no se detectaron en algunas de las especies analizadas. Así, Omp31 no se halló en *B. abortus*, Omp31b en *B. melitensis*, *B. canis* y *B. ovis* y Omp25b en *B. abortus*, *B. canis* y *B. ovis*. Adicionalmente, estos datos de ADN justifican también el hecho de que la proteína Omp25 de *B. ovis* exhiba una masa molecular menor que la mostrada por dicha proteína en el resto de las especies evaluadas (Cloeckert *et al.*, 1996b).

En el caso del análisis de la proteína Omp25c, ésta se detectó en todas las especies de *Brucella* bajo estudio (Apartado 2.2.1 de Resultados, Figura 28), lo cual está en consonancia con el hecho de que la secuencia del gen que la codifica se encuentra altamente conservada dentro de este género (Vizcaíno *et al.*, 2004). El revelado de esta proteína con el suero anti-Omp25c dio como resultado dos bandas, aunque la identidad de la de menor tamaño solamente se pudo confirmar en *B. ovis* PA. Esto es debido a que la masa molecular de la proteína Omp25 de *B. ovis* PA es inferior a la del resto de las especies analizadas, en las cuales la masa molecular de Omp25 coincide con la de la banda de menor tamaño de Omp25c (Cloeckert *et al.*, 1996b) impidiendo su correcta identificación. Asimismo, pudimos observar que Omp25c parece ser una de las PMEs de la familia Omp25/Omp31 más abundante en la composición de la membrana externa de *B. ovis* PA y que, además, existía un aumento de su síntesis en el mutante $\Delta omp31$ de esta cepa rugosa (Apartado 2.2.1 de Resultados, Figura 28). Este hecho podría ser un posible mecanismo compensatorio en respuesta a la eliminación de la proteína mayoritaria Omp31 para reestablecer el equilibrio en la membrana externa de *B. ovis* PA, el cual se ha demostrado que es esencial para la bacteria (Caro-Hernández *et al.*, 2007). Un mecanismo similar se ha descrito en esta familia de PMEs en la cepa *B. suis* 1330 (Salhi *et al.*, 2003) y también en la ortógola Hbp de *Bartonella quintana* (Minnick *et al.*,

2003), lo que avala dicha hipótesis (Guzmán-Verri *et al.*, 2002; Wagner *et al.*, 2002; Salhi *et al.*, 2003; Conolly *et al.*, 2006; Eschenbrenner *et al.*, 2006).

Igual que lo acontecido en otros estudios, no detectamos la proteína Omp25d en ninguna de las cepas silvestres evaluadas (Apartado 2.2.1 de Resultados). Salhi *et al.* en 2003 sugirieron que Omp25d podría ser una banda proteica revelada con anticuerpos monoclonales anti-Omp25 en una cepa mutante $\Delta omp25$ de *B. suis*. Sin embargo, es más probable que ésta se trate realmente de la proteína Omp25c ya que en esta especie, la banda de menor tamaño molecular de dicha proteína y Omp25 deberían migrar a la vez. Una posible explicación a esta falta de detección de la proteína Omp25d en *Brucella* spp. podría residir en un posible mecanismo de control post-transcripcional relacionado con el proceso de traducción o con el reciclaje de proteínas ya que el gen que la codifica se encuentra bastante conservado en este género, no se han encontrado defectos en su secuencia y posee un claro sitio de unión al ribosoma (Vizcaíno *et al.*, 2004). Además, en nuestro laboratorio hemos comprobado que el gen que lo codifica se transcribe en todas las especies analizadas (datos no mostrados).

En lo que se refiere a la detección de la proteína Omp22 (Apartado 2.2.1 de Resultados, Figura 29), únicamente pudimos confirmar su presencia en *B. ovis* y *B. neotomae*. En *B. canis* RM6/66, *B. suis* 1330 y en las cepas de *B. abortus* 544, B19 y 45/20, observamos una banda proteica que coincidía en tamaño con Omp22 pero que sin embargo, no desaparecía tras la adsorción del suero anti-Omp22 con la proteína purificada. A pesar de ello, no puede descartarse la presencia de Omp22 en dichas cepas ya que la aparición de esta banda podría interferir en la correcta identificación de la proteína. Por otra parte, a diferencia de otros estudios previos (Guzmán-Verri *et al.*, 2002; Connolly *et al.*, 2006), no hemos podido detectar esta PME en la cepa *B. abortus* 2308. Esta desigualdad en los resultados podría ser debida a la utilización de técnicas y condiciones experimentales diferentes, ya que estos autores emplearon fracciones de membrana en vez de lisados celulares y espectrometría de masas en lugar de Western Blot (Guzmán-Verri *et al.*, 2002; Connolly *et al.*, 2006).

Investigaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio pusieron de manifiesto que la ausencia de las PMEs Omp25d y Omp22 en *B. ovis* PA causa una atenuación en la virulencia de la bacteria en ratón (Caro-Hernández *et al.*, 2007). Adicionalmente, en el presente trabajo hemos demostrado que las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ de *B. ovis* PA muestran una clara disminución en su capacidad de invasión y de multiplicación intracelular en células fagocíticas tanto profesionales como no profesionales en comparación con la cepa parental (Apartado 2.1 de Resultados). Estos resultados sostienen la síntesis de Omp25d en *B. ovis* PA, la cual no ha sido evidenciada en este estudio. Sin embargo, el hecho de que en la cepa mutante $\Delta omp25d$ hayamos detectado bajos niveles de la proteína Omp22 (Apartado 2.2.1 de Resultados, Figura 29) y en vista de que el mutante $\Delta omp22$ se encuentra más atenuado, hace pensar que las

alteraciones que manifiesta la cepa $\Delta omp25d$ puedan deberse, al menos en parte, a una escasa síntesis de la proteína Omp22. Asimismo, observamos que tras complementar los mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ con el gen silvestre correspondiente, no se recuperaban en ambos los niveles de Omp22 presentados por la cepa parental (Apartado 2.2.1 de Resultados, Figura 29). Esto también podría justificar el hecho de por qué el proceso de complementación no haya restaurado la virulencia en los dos mutantes. Además, cabe destacar que en el caso de la cepa $\Delta omp22$ complementada, a pesar de detectar muy débilmente la proteína Omp22, sí que confirmamos mediante RT-PCR que se producía en ella una marcada sobreexpresión del gen *omp22* (datos no mostrados), lo que sugiere que también podría existir un posible mecanismo de regulación post-transcripcional de Omp22 en *B. ovis* PA.

Finalmente, en el presente trabajo hemos puesto de manifiesto la estrecha relación antigénica que existe entre las proteínas Omp31 y Omp31b, reflejada en la fuerte reactividad cruzada mostrada por el suero anti-Omp31b con la proteína Omp31 (Apartado 2.2.1 de Resultados, Figura 26). En vista de que Omp31 protege frente a infecciones por la especie rugosa *B. ovis* y por la lisa *B. melitensis* (Estein *et al.*, 2003; Estein *et al.*, 2004; Cassataro *et al.*, 2005a; Cassataro *et al.*, 2005b), sería entonces de gran interés analizar el posible empleo de Omp31b como vacuna subcelular frente a infecciones causadas por cepas de *Brucella* que sintetizan esta proteína, Omp31 o ambas. Del mismo modo, la reacción serológica cruzada que presentó el suero anti-Omp25c con Omp25 y Omp25b y el hecho de que Omp25c se detectara en todas las cepas de *Brucella* analizadas en este estudio (Apartado 2.2.1 de Resultados, Figura 28), incentivan también la evaluación de un posible papel de Omp25c como vacuna subcelular.

2.3 Análisis del papel ejercido por las PMEs Omp25d y Omp22 en la virulencia de la cepa naturalmente rugosa *B. canis* RM6/66 y de las cepas lisas *B. abortus* 2308 y *B. neotomae* 5K33.

En vista de los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, en los cuales demostramos que deleciones en los genes *omp25d* y *omp22* en *B. ovis* PA tenían como consecuencia una atenuación importante en la virulencia de este microorganismo (Caro-Hernández *et al.*, 2007 y Apartado 2.1 de Resultados), evaluamos si la inactivación de dichos genes en la cepa rugosa *B. canis* RM6/66 y en las estirpes lisas *B. abortus* 2308 y *B. neotomae* 5K33 causaba el mismo efecto. Para ello, reemplazamos el gen silvestre de interés por otro inactivado siguiendo la misma metodología descrita por Caro-Hernández *et al.*, 2007 (ver Apartado 5.1 de Materiales y Métodos). En este proceso empleamos para la amplificación de los genes *omp25d* y *omp22*, el ADN de la cepa *B. abortus* 2308 debido a que el análisis de las secuencias nucleóticas de *B. canis* RM6/66 y *B. neotomae*

5K33 reveló que los genes *omp25d* y *omp22* (y los genes adyacentes incluidos en la amplificación por PCR usada para la inactivación del gen *omp* por reemplazamiento) de dichas cepas presentaban entre un 99 y un 100 % de identidad con las secuencias codificantes de *B. abortus* 2308 y a que los cambios nucleotídicos que existían, no introducían cambios relevantes en la secuencia aminoacídica de las proteínas.

Los ensayos llevados a cabo para evaluar la sensibilidad que presentaban las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ a la polimixina B, al desoxicolato de sodio, al H₂O₂ y al suero humano no inmune demostraron que no existían diferencias significativas en comparación con la mostrada por las cepas parentales correspondientes (Apartado 2.3.2 de Resultados, Tabla XVII). Dichos mutantes tampoco exhibieron defectos en la capacidad de invasión y multiplicación intracelular en cultivos de células HeLa y macrófagos J774.A1 (Apartado 2.3.3 de Resultados, Figura 31). Además, en el caso de las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ de *B. canis* RM6/66, éstas siguieron la misma cinética de colonización esplénica en ratón que la cepa parental (Apartado 2.3.4 de Resultados, Figura 32). Por tanto, la ausencia de las PMEs Omp25d y Omp22 en la membrana externa de *B. canis* RM6/66, de *B. abortus* 2308 y de *B. neotomae* 5K33 no afectó a la estabilidad de la envuelta celular de estas bacterias ni tampoco causó una atenuación en su virulencia.

Estos resultados contrastan con lo observado en la cepa *B. ovis* PA pero concuerdan con los datos obtenidos previamente por Manterola *et al.* en 2007. Estos autores generaron también una cepa mutante $\Delta omp22$ de *B. abortus* 2308 que no mostró alterada la resistencia a polimixina B y a suero no inmune, que fue capaz de multiplicarse intracelularmente en células HeLa y macrófagos murinos y que además, no presentó atenuada su virulencia en ratón. Una posible explicación al hecho de que la ausencia de las proteínas Omp25d y Omp22 en la membrana externa de *B. abortus* 2308 y *B. neotomae* 5K33 no cause los mismo efectos que en *B. ovis* PA puede residir en que, las dos primeras poseen un LPS en fase lisa, mientras que ésta última es una cepa naturalmente rugosa. Debido a ello, es probable que la pérdida de estas PMEs en *B. ovis* PA provoque cambios más drásticos en las propiedades de la membrana externa que hagan que la bacteria tenga un comportamiento diferente. Adicionalmente, al no estar enmascaradas por las cadenas O, las PMEs se encuentran expuestas en la superficie de *B. ovis* PA y pueden llevar a cabo otras funciones que estén implicadas directamente con la virulencia de esta cepa rugosa.

Por otra parte, a diferencia de *B. ovis* PA y a pesar de tratarse también de una cepa naturalmente rugosa, los mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ de *B. canis* RM6/66 no mostraron ningún tipo de atenuación en ratón y en cultivos celulares. Esta discrepancia puede ser debida a las diferencias que existen entre las membranas externas de *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66, entre las que se encuentra una distinta distribución y abundancia de las PMEs de la familia Omp25/Omp31 (Apartado 2.2 de Resultados). De hecho, se ha

comprobado que las propiedades relacionadas con la membrana externa de estas dos cepas difieren de manera importante y que la membrana externa de *B. canis* RM6/66 presenta una mayor estabilidad que la del resto de las especies clásicas de este género (Martín-Martín *et al.*, 2010). De este modo, podría suceder que la pérdida de estas PMEs en *B. canis* RM6/66 no afectase gravemente a la integridad y funcionalidad de su membrana externa y que no repercutiese en definitiva, en la virulencia que presenta esta cepa naturalmente rugosa.

3. ESTUDIO DEL POSIBLE PAPEL EJERCIDO POR GENES IMPLICADOS EN LA VIRULENCIA DE ESPECIES LISAS DE *Brucella* EN EL ESTABLECIMIENTO DE UNA INFECCIÓN POR *B. ovis* PA.

3.1 El operón *virB* y el gen *virB2*.

En la última década se ha descubierto la presencia en el género *Brucella* de un Sistema de Secreción de Tipo IV homólogo al de *Agrobacterium tumefaciens* (O'Callaghan *et al.*, 1999; Sieira *et al.*, 2000), microorganismo en el que está implicado en la transferencia de ADN a la planta y que es necesaria para el establecimiento de la infección (Christie, 1997). En el presente trabajo analizamos el papel de este T4SS (codificado por el operón *virB*) en la virulencia de cepa naturalmente rugosa *B. ovis* PA. Para ello, generamos un mutante polar de esta cepa mediante la inserción al inicio del gen *virB2* de un "cassette Kan^r" que incluía un terminador de transcripción (Apartado 5.2.1 de Materiales y Métodos). Por tanto, presumiblemente, esta cepa mutante de *B. ovis* PA sería únicamente capaz de sintetizar la proteína VirB1, la cual, parece ser que ejerce una función no relevante en la patogénesis de *Brucella* (den Hartigh *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que la mutación polar introducida en el operón *virB* causaba una pérdida de la capacidad de *B. ovis* PA para sobrevivir y multiplicarse intracelularmente en macrófagos J774A.1 ya que a las 24 horas p.i. la bacteria era totalmente eliminada del cultivo celular (Apartado 3.6 de Resultados, Figura 41). Además dicha cepa mutante tampoco fue capaz de establecer una infección crónica en ratón (Apartado 3.5 de Resultados, Figura 40). Podemos concluir entonces, que la presencia de un T4SS completo y funcional es esencial para la virulencia de la cepa rugosa *B. ovis* PA, tal y como se ha observado que sucede también en las cepas lisas *B. abortus* 2308, *B. suis* 1330 y *B. melitensis* 16M (O'Callaghan *et al.*, 1999; Sieira *et al.*, 2000; Comerci *et al.*, 2001; Delrue *et al.*, 2001; Celli *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003; den Hartigh *et al.*, 2004).

Con el objeto de determinar el papel que realiza el T4SS en el establecimiento de una infección por *Brucella* spp., se han llevado a cabo diversas investigaciones en los

últimos años. Éstas han demostrado que el T4SS es imprescindible para que la BCV consiga interaccionar con el retículo endoplasmático y se desarrolle de este modo, un compartimento que posea las condiciones óptimas para la replicación intracelular del microorganismo (Pizarro-Cerdá *et al.*, 1998a; Comerci *et al.*, 2001; Delrue *et al.*, 2001; Celli *et al.*, 2003; Starr *et al.*, 2008). Recientemente se han identificado posibles proteínas efectoras secretadas por el T4SS al interior de la BCV y que podrían ser las responsables de alterar el tráfico intracelular de la vacuola (de Jong *et al.*, 2008; Delpino *et al.*, 2009). Parece entonces plausible que la BCV que transporta la cepa mutante $\Delta virB$ polar de *B. ovis* PA, al no ser capaz de asociarse con el retículo endoplasmático, puede que tampoco pueda escapar a la fusión con los lisosomas. De este modo, la bacteria terminaría siendo eliminada por la célula hospedadora, el macrófago en nuestro caso.

Por otra parte, existen datos contradictorios sobre un posible papel ejercido por el T4SS en la internalización de *Brucella* spp en los macrófagos (Kim *et al.*, 2002; Watarai *et al.*, 2002a; Watarai *et al.*, 2002b; Porte *et al.*, 2003). En el presente trabajo, en los ensayos de infección realizados en cultivos de células J774A.1 no hemos detectado diferencias entre el mutante $\Delta virB$ -polar de *B. ovis* PA y la cepa parental en cuanto al número de bacterias intracelulares determinadas a tiempo cero (Apartado 3.6 de Resultados, Figura 41). Debido a ello, parece poco probable que el T4SS se encuentre implicado en los mecanismos de entrada que emplea la cepa naturalmente rugosa *B. ovis* PA para penetrar en los macrófagos, ni tampoco en las primeras horas de la infección. De hecho, en condiciones de laboratorio, la expresión del operón *virB* es muy reducida (Rouot *et al.*, 2003; Viadas *et al.*, 2010), mientras que se induce fuertemente en condiciones de pH ácido como las que la bacteria se encuentra en el interior de los fagocitos (Boschiroli *et al.*, 2002; Rouot *et al.*, 2003).

Adicionalmente, en el presente trabajo de investigación generamos un mutante $\Delta virB2$ no polar (Apartado 5.2.2 de Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos han demostrado que esta cepa mutante había perdido la capacidad de multiplicarse intracelularmente en macrófagos y además, tampoco era capaz de causar una infección esplénica persistente en ratón (Apartado 3.5 y 3.6 de Resultados). En contraste, la virulencia del mutante $\Delta virB2$ en infecciones llevadas a cabo en cultivos de células J774.A1 se restauraba casi por completo cuando la cepa era complementada con un plásmido de alto número de copias que portaba una copia silvestre de *virB2*. Todos estos datos concuerdan con lo observado previamente por den Hartigh *et al.*, 2004 y sugieren que VirB2 realiza una función esencial en el T4SS durante el proceso infeccioso de *Brucella* spp.. Se ha comprobado en *A. tumefaciens* que la proteína codificada por *virB2* es el componente mayoritario que constituye el denominado *pilus* del T4SS situado en la superficie de la bacteria (Lai *et al.*, 1998). Debido a su localización, éste podría entrar en contacto directo con la célula hospedadora e iniciar la transferencia de las proteínas

efectoras a través del canal del T4SS, lo cual parece ser esencial para la consecución de un nicho replicativo óptimo para *Brucella* spp..

Algunos análisis proteómicos han señalado que mutaciones en el T4SS modifican los niveles de varias proteínas, entre ellas las proteínas Omp25c y Omp31, y producen un incremento de la sensibilidad al péptido catiónico polimixina B y a distintos tipos de estrés ambiental (Wang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010). Debido a ello, se ha sugerido que este sistema de secreción podría ser necesario para el mantenimiento de la integridad de la envuelta celular de *Brucella* (Wang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010). Sin embargo, la cepa empleada en estos estudios es una cepa derivada de *B. melitensis* que se utiliza como vacuna en China y que por tanto, ya está previamente atenuada. Además, se desconoce el motivo o los motivos de la disminución en la virulencia que presenta. En contraste, en el presente trabajo no hemos detectado que la síntesis de las PME de la familia Omp25/Omp31 se haya visto afectada por la inactivación del operón *virB* o por la delección causada en el gen *virB2* en *B. ovis* PA (Apartado 3.4 de Resultados, Figura 39), ni tampoco observamos un cambio aparente en las propiedades de la membrana externa de las cepas mutantes en los diferentes ensayos realizados (Apartado 3.3 de Resultados, Figura 38). Por tanto, es probable que en el caso de *B. ovis* PA, el T4SS no ejerza un papel primordial en el mantenimiento de la envuelta celular, al menos en condiciones de cultivo de laboratorio.

3.2 El gen *vjbR*.

Otro objetivo de la presente investigación fue el de analizar el papel del activador transcripcional VjbR en la virulencia de *B. ovis* PA. Para ello, generamos un mutante en fase $\Delta vjbR$ de esta cepa rugosa y posteriormente, evaluamos la repercusión que tenía la disrupción de este gen sobre el comportamiento de la bacteria. Los resultados obtenidos demostraron que la cepa mutante $\Delta vjbR$ estaba atenuada en todos los modelos experimentales de infección empleados (cultivos de macrófagos murinos y ratón) (Apartado 3.5 y 3.6 de Resultados). Delrue *et al.* en 2005 obtuvieron unos resultados similares mediante el empleo de la cepa lisa *B. melitensis* 16M y demostraron además, que el factor VjbR activa la expresión de los genes *virB*, entre otros muchos. Considerando el hecho de que la presencia del T4SS en la envuelta celular de *B. ovis* PA es esencial para que esta cepa logre sobrevivir y multiplicarse intracelularmente en macrófagos (Apartado 3.5 de Resultados), parece lógico que la ausencia del activador VjbR afecte gravemente a la virulencia de esta cepa naturalmente rugosa debido a una baja expresión del operón *virB*.

Adicionalmente, se ha observado en *B. melitensis* 16M que el factor VjbR controla directa o indirectamente la expresión de otra gran variedad de genes, entre los que se encuentran, genes que codifican componentes flagelares, adhesinas, proteasas,

transportadores, reguladores transcripcionales y proteínas implicadas en el metabolismo de la bacteria, en la biogénesis de la membrana plasmática y en la adaptación a diferentes condiciones de estrés (Uzureau *et al.*, 2007; de Jong *et al.*, 2008; Arocena *et al.*, 2010; Uzureau *et al.*, 2010; Weeks *et al.*, 2010). Todos estos datos apoyan la idea de que VjbR es un regulador global que está implicado en la adaptación de la bacteria a las diferentes condiciones ambientales que se encuentra dentro de la BCV durante el tránsito de ésta hasta el nicho replicativo. Además, también señalan a VjbR como un factor importante involucrado fuertemente en el control de las propiedades de la envuelta celular de *Brucella* spp.. Así, se ha observado que la disrupción del gen *vjbR* en *B. melitensis* 16M desencadena una sobreproducción de exopolisacárido en la bacteria, la cual, forma agregados cuando es cultivada en medio líquido (Uzureau *et al.*, 2007). En el caso de *B. ovis* PA, ésta permanece en suspensión más de 48 horas a diferencia de lo que sucede con la otra cepa naturalmente rugosa analizada en este trabajo, *B. canis* RM6/66 (Apartado 3.3.3 de Resultados, Figura 37). En contraste, la cepa mutante $\Delta vjbR$ de *B. ovis* PA obtenida en este trabajo presentó una ligera capacidad de autoaglutinación a las 48 horas con respecto a la cepa parental (Apartado 3.3.3 de Resultados, Figura 37), lo que podría indicar que la represión de los genes implicados en la síntesis y transporte extracelular de exopolisacárido podría estar controlada por la homoserina-lactona C12-HSL vía VjbR, tanto en la cepa lisa *B. melitensis* 16M como en la rugosa *B. ovis* PA. Sin embargo, la presencia de exopolisacárido en *B. ovis* todavía no se ha investigado, por lo que habría que realizar estudios adicionales para comprobar esta hipótesis.

Por otra parte, cabe destacar que el mutante $\Delta vjbR$ de *B. ovis* PA no mostró otras alteraciones relacionadas con las propiedades de su membrana externa en los diversos ensayos llevados a cabo. Estos resultados coinciden también con lo observado por Uzureau *et al.*, en 2007 y 2010 en la cepa $\Delta vjbR$ de *B. melitensis* 16M ya que ésta tampoco presentó incrementos en la sensibilidad a polimixina B y a un pH ácido. Por el contrario, ambos mutantes sí que vieron disminuida la abundancia de Omp25 en su membrana externa, aunque muy sutilmente en el caso de la cepa $\Delta vjbR$ *B. ovis* PA (Apartado 3.4 de Resultados y Uzureau *et al.*, 2007). Un análisis realizado empleando la homoserina-lactona C12-HSL reveló que cuando ésta se añadía a un cultivo de *B. melitensis* 16M se producía un aumento de la síntesis de esta PME en la bacteria (Uzureau *et al.*, 2007). Por tanto, probablemente el factor VjbR actúa activando la transcripción del gen *omp25* a través del proceso de regulación "quórum sensing". En las cepas *B. abortus* 2308, *B. melitensis* 16M y *B. ovis* LSU99 se ha comprobado que la ausencia, o una menor presencia, de Omp25 en su membrana externa causa una fuerte atenuación de la bacteria en los modelos experimentales utilizados (ratón, cabra o novilla) (Edmonds *et al.*, 2001; Edmonds *et al.*, 2002a; Edmonds *et al.*, 2002b; Manterola *et al.*, 2005). Sin embargo, nuestro grupo ha demostrado que la inactivación del gen *omp25* en *B. ovis* PA no afecta a su virulencia (Caro-Hernández *et al.*, 2007,

Apartado 2.1 de Resultados), por lo que la atenuación mostrada por el mutante $\Delta vjbR$ de esta cepa rugosa no puede atribuirse al hecho de que en ella exista una menor síntesis de Omp25. Adicionalmente, Uzureau *et al.*, 2007 apreciaron también una menor producción de Omp31, la otra proteína mayoritaria de la familia Omp25/Omp31, en la cepa mutante $\Delta vjbR$ de *B. melitensis* 16M. En contraste, nosotros no observamos que la síntesis de esta PME se viese alterada en el mutante $\Delta vjbR$ de *B. ovis* PA (Apartado 3.4 de Resultados, Figura 39). Esta discrepancia de resultados podría residir en las diferencias existentes entre las distintas especies de *Brucella* y que determinan la preferencia de hospedador y virulencia que presenta cada una de ellas.

Finalmente, en los últimos años se están llevando a cabo trabajos de investigación en los cuales se intentan mejorar las vacunas existentes u obtener nuevas cepas atenuadas que sean eficaces en la profilaxis de la brucelosis. De este modo, se han realizado experimentos utilizando cepas mutantes $\Delta vjbR$ de *B. melitensis* 16M y de *B. abortus* S19 con el fin de evaluar la capacidad de protección que confieren en ratón frente a una infección por la cepa parental correspondiente (Arenas-Gamboa *et al.*, 2008; Arenas-Gamboa *et al.*, 2009). Adicionalmente, estos autores emplearon cada cepa mutante encapsulada con microesferas de alginato recubiertas con la proteína no inmunogénica VpB ("Vitalline protein B") del parásito *Fasciola hepática* con el fin de aumentar su eficiencia. En vista de los resultados obtenidos, los cuales demostraron que ambos mutantes encapsulados ofrecían un elevado grado de protección frente a la infección, la cepa mutante $\Delta vjbR$ de *B. ovis* PA generada en el presente trabajo presenta un interés especial como una potencial candidata a vacuna frente a la enfermedad causada por esta cepa naturalmente rugosa.

3.3 El gen *cgs*.

Con el fin de evaluar el efecto que tenía la ausencia de los β -(1,2) glucanos cíclicos en la virulencia de *B. ovis* PA, en el presente trabajo generamos un mutante Δcgs de esta cepa naturalmente rugosa. Los resultados obtenidos han demostrado una fuerte disminución de la capacidad de colonización esplénica de la bacteria en ratón (Apartado 3.5 de Resultados, Figura 40). Estos datos concuerdan con lo descrito previamente en la cepa lisa *B. abortus* 2308 por Briones *et al.*, 2001 y Arellano-Reynoso *et al.*, 2005, aunque la atenuación que observaron estos autores al inactivar el gen *cgs* fue mucho menos marcada. Una posible explicación a la atenuación mostrada por la cepa mutante Δcgs de *B. ovis* PA podría residir en la posible función que pueden llevar a cabo los C β G en *Brucella*, señalada por Arellano-Reynoso *et al.* en 2005. Estos autores establecen que debido a la estructura química que presentan los C β G, éstos pueden secuestrar moléculas de colesterol de la membrana de las BCVs de forma similar a cómo lo hace la β -metil-ciclodextrina (Ohtani *et al.*, 1989; Atger *et al.*, 1997; Hartel *et al.*, 1998; Bohin, 2000).

De esta manera, desestabilizarían la organización de los "lípidos rafts" y lograrían prevenir la fusión con los lisosomas ya que estos dominios lipídicos parecen estar implicados en la biogénesis de fagolisosomas (Dermine *et al.*, 2001). Sin embargo, en contraste a lo descrito por estos autores, los cuales observaron una disminución de la capacidad de multiplicación intracelular de la cepa mutante Δcgs de *B. abortus* 2308 en cultivos de células HeLa, en el presente trabajo, a pesar de demostrar que *B. ovis* PA utiliza una ruta de entrada al macrófago mediada por los "lípidos rafts" (Apartado 1.3.1 de Resultados), el mutante Δcgs de esta cepa rugosa mostró una tasa de multiplicación intracelular en cultivos de células J774.A1 similar a la de la cepa parental (Apartado 3.6 de Resultados, Figura 41). Estos resultados parecen indicar que *B. ovis* PA podría usar otros mecanismos o estrategias diferentes con el fin de evitar ser destruida intracelularmente y poder llegar a desarrollar un nicho replicativo óptimo, o que, los C β G podrían realizar en esta cepa naturalmente rugosa otras funciones implicadas también en la virulencia de la bacteria.

Cabe señalar que en los ensayos de infección llevados a cabo en cultivos de macrófagos murinos, el número de bacterias intracelulares viables detectadas de la cepa Δcgs de *B. ovis* PA a tiempo cero (tras una hora de incubación con gentamicina) fue significativamente menor en relación al obtenido con la cepa parental (Apartado 3.6 de Resultados, Figura 41). Ello podría estar relacionado con el hecho de que en el mutante Δcgs de esta cepa rugosa, la síntesis de la proteína Omp22 parece ser ligeramente menor (Apartado 3.4 de Resultados, Figura 39). Considerando que la ausencia de dicha PME en la membrana externa de *B. ovis* PA causa una grave atenuación en la capacidad de invasión y de supervivencia de la bacteria (Apartado 2.1 de Resultados, Caro-Hernández *et al.*, 2007), una menor producción de Omp22 podría ser entonces la responsable de la pérdida de efectividad en el proceso infeccioso de la cepa mutante Δcgs de *B. ovis* PA. Adicionalmente, sería interesante analizar tanto la expresión del gen *omp22* como la presencia de la PME que codifica en la membrana externa de la cepa mutante Δcgs complementada con el gen silvestre para evaluar si una menor síntesis de la proteína Omp22 pudiera ser también la causante de que el proceso de complementación no permitiese a la cepa mutante restaurar los niveles de infección alcanzados por *B. ovis* PA en cultivos de macrófagos murinos (Apartado 3.6 de Resultados, Figura 42). También observamos mediante Western Blot que la cepa mutante Δcgs de *B. ovis* PA presentaba una menor abundancia de la PME Omp25c en comparación con la cepa parental (Apartado 3.4 de Resultados, Figura 39). Esta menor síntesis de Omp25c podría estar relacionada con el incremento en la capacidad de autoaglutinación mostrada por el mutante Δcgs en medio líquido ya que previamente, Caro-Hernández *et al.*, 2007 observaron que *B. ovis* PA sedimentaba cuando no estaba presente esta PME en su membrana externa.

A pesar de que la virulencia de *Brucella* se asocia con la supervivencia en células fagocíticas, este mutante se replica en macrófagos murinos pero está muy atenuado en ratón (Apartado 3.5 y 3.6 de Resultados). Esta característica se ha encontrado en otros mutantes de *Brucella* spp. como por ejemplo, en una cepa mutante rugosa en el gen que codifica la perosamina sintetasa (implicada en la síntesis de cadenas O del LPS) de *B. melitensis* 16M (Godfroid *et al.*, 1998). Posiblemente, la menor penetración de la cepa Δcgs de *B. ovis* PA observada en los cultivos celulares pueda contribuir a la marcada atenuación que presenta este mutante en el modelo *in vivo*. Sin embargo, deben existir otros factores que la expliquen. Uno de ellos podría ser una mayor susceptibilidad a mecanismos de defensa extracelulares de la respuesta inmune innata del hospedador pero, aunque no se han evaluado todas las posibilidades, el mutante Δcgs no presenta alteraciones evidentes en las propiedades de la membrana externa y se comporta como la cepa parental en cuanto a la sensibilidad a péptidos catiónicos y a suero no inmune, dos mecanismos asociados al control de patógenos en el medio extracelular (Apartado 3.3.3 de Resultados). Otra posible explicación es que en el presente trabajo, hemos empleado una línea celular cultivada *in vitro*, mientras que en los modelos *in vivo*, *Brucella* puede ser fagocitada por distintos tipos celulares con propiedades diferentes, algunos de los cuales podrían ser capaces de destruir a la bacteria mutante. Por otro lado, pudiera ser que la mutación causada en el gen *cgs* produjese modificaciones en la bacteria que a su vez, pudiesen estimular la respuesta inmune del hospedador. Una de ellas podría ser la alteración de la exposición de PAMPs que se encuentran enmascaradas por componentes de la membrana externa (Barquero-Calvo *et al.*, 2007), ocasionando la eliminación del patógeno. En este sentido y tal y como se ha comentado anteriormente, el perfil de PMEs de este mutante se encuentra alterado con respecto a la cepa parental (Apartado 3.4 de Resultados), lo que indica diferencias en la superficie de la bacteria que podrían dejar expuestas PAMPs activadoras de la respuesta inmune. Por otra parte, esta atenuación mostrada por el mutante Δcgs de *B. ovis* PA podría estar también relacionada con la observación hecha por Banta *et al.* en 1998. Dichos autores han comprobado que una cepa mutante en el gen que codifica la glucano sintetasa de *A. tumefaciens* (*chvb*), muestra niveles de síntesis de la proteína VirB10 más bajos que la cepa parental. Teniendo en cuenta que la ausencia de esta proteína en *B. abortus* causa una pérdida de la capacidad de multiplicación intracelular de la bacteria (Sieira *et al.*, 2000) y que en este trabajo hemos demostrado que la presencia de un T4SS completo y funcional es esencial para la virulencia de *B. ovis* PA (Apartado 3.5 y 3.6 de Resultados), sería interesante analizar si la falta de producción de C β G en esta cepa rugosa podría afectar también a la expresión y traducción del operón *virB*.

Finalmente, Briones *et al.*, 2001 evaluaron en el modelo murino, el posible papel en la protección frente a la infección de un mutante Δcgs obtenido a partir de la cepa vacunal *B. abortus* S19. Los resultados obtenidos revelaron que dicho mutante protegía

frente a una infección por la cepa virulenta *B. abortus* 2308 de forma similar a *B. abortus* S19 a través de una respuesta inmune del hospedador principalmente celular. Por ello, la cepa mutante Δcgs de *B. ovis* PA generada en el presente trabajo deberá ser tenida en cuenta en próximas investigaciones enfocadas al desarrollo de nuevas vacunas atenuadas.

3.4 El gen *bacA*.

Diversas investigaciones han demostrado que BacA, una proteína integral de la membrana citoplasmática, es esencial para el establecimiento de infecciones crónicas en bazo o en hígado en el modelo murino por parte de la cepa lisa *B. abortus* 2308 (LeVier *et al.*, 2000; Parent *et al.*, 2007). Además se ha observado que su ausencia provoca un aumento de la sensibilidad que muestra esta cepa a ciertos detergentes, a etanol o a pH ácido (Roop *et al.*, 2002), lo cual se ha relacionado con la marcada disminución que muestra la cepa mutante $\Delta bacA$ de *B. abortus* 2308 en la capacidad de multiplicarse intracelularmente en cultivos de macrófagos (Roop *et al.*, 2002). En contraste, en este trabajo hemos obtenido un mutante en fase $\Delta bacA$ de la cepa naturalmente rugosa *B. ovis* PA que no presenta atenuada su virulencia ni en cultivos de macrófagos murinos ni en ratón, y que apenas exhibe alteraciones en las propiedades de su membrana externa (Apartados 3.3.3, 3.5 y 3.6 de Resultados).

Esta discrepancia de resultados puede residir en el posible mecanismo molecular de acción que utiliza la proteína BacA a la hora de llevar a cabo su función biológica, la cual parece ser que es modificar el contenido de ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFAs) del lípido A del LPS. Ferguson *et al.* en 2004 postularon dos posibles mecanismos de actuación de esta proteína. Uno de ellos sería el transporte directo de los VLCFAs desde el citoplasma hacia el espacio periplásmico, donde una proteína similar a PagP de *Salmonella* (Bishop *et al.*, 2000), los ligaría al lípido A. Esta hipótesis se apoya en la similitud que presenta la secuencia aminoacídica de BacA con la de la proteína de la adrenoleucodistrofia humana (hALDP), incluida dentro de la familia de proteínas de membrana de transporte peroxisomal (Takahashi *et al.*, 2007). Por tanto, la ausencia de este transportador provocaría que el lípido A viese alterado su grado de acilación, lo que podría afectar a la integridad de la membrana externa de la bacteria y repercutir en la virulencia del microorganismo.

Por otra parte, se ha observado que la cepa mutante $\Delta bacA$ de *B. abortus* 2308 todavía produce partes del lípido A que contienen VLCFAs (Ferguson *et al.*, 2004). Debido a ello, se propuso otro modelo de actuación de BacA, en el cual, ésta potenciaría la función llevada a cabo por proteínas similares a la denominada MsbA de *E. coli*. Se ha demostrado que esta proteína transloca el LPS, ensamblado en fase rugosa, desde la cara interna de la membrana citoplasmática hasta la cara periplasmática a través de un

mecanismo “flip-flop” (Chang and Roth, 2001). Por tanto, si este mecanismo existiese en *Brucella* spp., a pesar de no estar presente la proteína BacA, la bacteria podría seguir modificando su lípido A. En el caso concreto de *B. ovis* PA, podría suceder que, aunque este último mecanismo resultara ser menos efectivo sin la ayuda de BacA, fuese lo suficientemente funcional como para mantener el contenido adecuado de VLCFAs en el lípido A, por lo que la disrupción del gen *bacA* no afectaría entonces a la virulencia de esta cepa naturalmente rugosa.

Adicionalmente, los VLCFAs de *Brucella* spp. se han relacionado con las propiedades particulares que presenta la membrana externa de estos microorganismos en comparación con otras bacterias Gram negativas; una mayor hidrofobicidad y permeabilidad a compuestos hidrófobos, así como una mayor resistencia al efecto bactericida de péptidos catiónicos y EDTA (Moreno *et al.*, 1990; Bhat *et al.*, 1991; Velasco *et al.*, 2000). Mientras que en muchas bacterias Gram negativas, la integridad de la membrana externa se consigue por estabilización de las cargas negativas de la superficie con cationes divalentes (Nikaido, 2003), en *Brucella* spp. se ha detectado una carga negativa reducida (Moriyón and López-Goñi, 1998), por lo que la estabilidad de la membrana externa debe conseguirse por otros mecanismos. Entre estos últimos se ha incluido la presencia de los VLCFAs (Moreno *et al.*, 1990; Bhat *et al.*, 1991; Velasco *et al.*, 2000) ya que teóricamente podrían atravesar completamente la membrana externa y localizar el grupo hidroxilo terminal en el periplasma, favoreciendo así, el anclaje del LPS (Velasco *et al.*, 2000; Iriarte *et al.*, 2004; Barquero-Calvo *et al.*, 2009). Considerando estos aspectos, otra posible explicación a la falta de atenuación del mutante $\Delta bacA$ de *B. ovis* PA tanto en cultivos celulares como en el modelo *in vivo*, podría ser que las diferencias que se han detectado en la membrana externa entre las diferentes especies de *Brucella* (Martín-Martín *et al.*, 2010) hicieran que la presencia de VLCFAs no fuera tan necesaria en *B. ovis* PA para el mantenimiento de la integridad y las propiedades de la membrana externa como en otras especies

Conclusiones

En vista de los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación podemos establecer las siguientes conclusiones:

- 1.** Las cepas naturalmente rugosas *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66 se internalizan y multiplican intracelularmente en células fagocíticas profesionales sin causar en ellas un efecto citotóxico o un elevado estado de activación.
- 2.** *B. ovis* PA y *B. canis* RM6/66 penetran en las células fagocíticas profesionales a través de los "lípidos rafts" y del receptor SR-A. Estos mecanismos son similares a los usados por especies lisas de *Brucella*.
- 3.** Las infecciones causadas por *B. ovis* PA y por *B. canis* RM6/66 en macrófagos murinos son independientes de la actividad enzimática de las fosfatidilinositol 3 quinasas.
- 4.** Las PMEs Omp25d y Omp22 ejercen un importante papel en la virulencia de *B. ovis* PA y su ausencia de la membrana externa causa una marcada atenuación en su capacidad invasiva y de multiplicación intracelular en células fagocíticas. Por el contrario, ambas PMEs no parecen ser esenciales para la virulencia de la cepa naturalmente rugosa *B. canis* RM6/66 y de las cepas lisas *B. abortus* 2308 y *B. neotomae* 5K33.
- 5.** Las cepas representativas de las seis especies clásicas de *Brucella* estudiadas en este trabajo presentan una distinta distribución de los siete miembros que componen la familia de PMEs Omp25/Omp31, lo cual podría estar relacionado con las diferencias de patogenicidad y preferencia de hospedador que existen entre ellas.
- 6.** Las PMEs Omp31b y Omp25c podrían ser candidatas potenciales a vacunas subcelulares en base a la distribución que presentan entre las diferentes especies de *Brucella* y a la estrecha relación antigénica que poseen con otros miembros de la familia Omp25/Omp31.
- 7.** Tanto el operón *virB* como los genes *vjbR*, *cgs* o *virB2* son esenciales para la virulencia *B. ovis* PA en ratón. Además el gen *cgs* es necesario para la correcta internalización de *B. ovis* PA en macrófagos murinos, mientras que los demás genes están implicados en la multiplicación intracelular de la bacteria. En contraste, el papel del gen *bacA* en la virulencia de esta cepa naturalmente rugosa parece ser poco relevante.

Bibliografía

A

- **Aksoy, E., Vanden Berghe, W., Detienne, S., Amraoui, Z., Fitzgerald, K.A., Haegeman, G., Goldman, M., and Willems, F. 2005.** Inhibition of phosphoinositide 3-kinase enhances TRIF-dependent NF-kappa B activation and IFN-beta synthesis downstream of Toll-like receptor 3 and 4. *Eur J Immunol* 35, 2200-2209.
- **Aktas, M., Wessel, M., Hacker, S., Klusener, S., Gleichenhagen, J., and Narberhaus, F. 2010.** Phosphatidylcholine biosynthesis and its significance in bacteria interacting with eukaryotic cells. *Eur J Cell Biol*. doi: [S0171-9335\(10\)00127-5 \[pii\]10.1016/j.ejcb.2010.06.013](https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2010.06.013).
- **Allen, C.A., Adams, L.G., and Ficht, T.A. 1998.** Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. *Infect Immun* 66, 1008-1016.
- **Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D. and Verger, J. 1988.** Techniques for the brucellosis laboratory. INRA. Paris, France.
- **Amann, E., Brosius, J., and Ptashne, M. 1983.** Vectors bearing a hybrid trp-lac promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* 25, 167-178.
- **Anand, S.K., and Griffiths, M.W. 2003.** Quorum sensing and expression of virulence in *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol* 85, 1-9.
- **Andrews, H.L., Vogel, J.P., and Isberg, R.R. 1998.** Identification of linked *Legionella pneumophila* genes essential for intracellular growth and evasion of the endocytic pathway. *Infect Immun* 66, 950-958.
- **Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., Briones, G., Ciocchini, A.E., Ugalde, R., Moreno, E., Moriyón, I., and Gorvel, J.P. 2005.** Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol* 6, 618-625.
- **Arenas, G.N., Staskevich, A.S., Aballay, A., and Mayorga, L.S. 2000.** Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. *Infect Immun* 68, 4255-4263.
- **Arenas-Gamboa, A.M., Ficht, T.A., Kahl-McDonagh, M.M., and Rice-Ficht, A.C. 2008.** Immunization with a single dose of a microencapsulated *Brucella melitensis* mutant enhances protection against wild-type challenge. *Infect Immun* 76, 2448-2455.
- **Arenas-Gamboa, A.M., Ficht, T.A., Kahl-McDonagh, M.M., Gómez, G., and Rice-Ficht, A.C. 2009.** The *Brucella abortus* S19 DeltavjB live vaccine candidate is safer than S19 and confers protection against wild-type challenge in BALB/c mice when delivered in a sustained-release vehicle. *Infect Immun* 77, 877-884.
- **Aridor, M., Fish, K.N., Bannykh, S., Weissman, J., Roberts, T.H., Lippincott-Schwartz, J., and Balch, W.E. 2001.** The Sar1 GTPase coordinates biosynthetic cargo selection with endoplasmic reticulum export site assembly. *J Cell Biol* 152, 213-229.
- **Arocena, G.M., Sieira, R., Comerci, D.J., and Ugalde, R.A. 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.
- **Atger, V.M., de la Llera Moya, M., Stoudt, G.W., Rodriguez, W.V., Phillips, M.C., and Rothblat, G.H. 1997.** Cyclodextrins as catalysts for the removal of cholesterol from macrophage foam cells. *J Clin Invest* 99, 773-780.
- **Atmakuri, K., Cascales, E., and Christie, P.J. 2004.** Energetic components VirD4, VirB11 and

VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion. *Mol Microbiol* 54, 1199-1211.

• **Audic, S., Lescot, M., Claverie, J.M., and Scholz, H.C. 2009.** *Brucella microti*: the genome sequence of an emerging pathogen. *BMC Genomics* 10, 352.

B

• **Backert, S., Ziska, E., Brinkmann, V., Zimny-Arndt, U., Fauconnier, A., Jungblut, P.R., Naumann, M., and Meyer, T.F. 2000.** Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol* 2, 155-164.

• **Bandara, A.B., Contreras, A., Contreras-Rodríguez, A., Martins, A.M., Dobrea, V., Poff-Reichow, S., Rajasekaran, P., Sriranganathan, N., Schurig, G.G., and Boyle, S.M. 2007.** *Brucella suis* urease encoded by *ure1* but not *ure2* is necessary for intestinal infection of BALB/c mice. *BMC Microbiol* 7, 57.

• **Banta, L.M., Bohne, J., Lovejoy, S.D., and Dostal, K. 1998.** Stability of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB10 protein is modulated by growth temperature and periplasmic osmoadaptation. *J Bacteriol* 180, 6597-6606.

• **Baron, C., Llosa, M., Zhou, S., and Zambryski, P.C. 1997.** VirB1, a component of the T-complex transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*, is processed to a C-terminal secreted product, VirB1. *J Bacteriol* 179, 1203-1210.

• **Barquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., Weiss, D.S., Guzmán-Verri, C., Chacón-Díaz, C., Rucavado, A., Moriyón, I., and Moreno, E. 2007.** *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS One* 2, e631.

• **Barquero-Calvo, E., Conde-Álvarez, R., Chacón-Díaz, C., Quesada-Lobo, L., Martirosyan, A., Guzmán-Verri, C., Iriarte, M., Mancek-Keber, M., Jerala, R., Gorvel, J.P., Moriyón, I., Moreno, E., and Chaves-Olarte, E. 2009.** The differential interaction of *Brucella* and ochrobactrum with innate immunity reveals traits related to the evolution of stealthy pathogens. *PLoS One* 4, e5893.

• **Bellaire, B.H., Roop, R.M., 2nd, and Cardelli, J.A. 2005.** Oposonized virulent *Brucella abortus* replicates within nonacidic, endoplasmic reticulum-negative, LAMP-1-positive phagosomes in human monocytes. *Infect Immun* 73, 3702-3713.

• **Behnia, R., and Munro, S. 2005.** Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* 438, 597-604.

• **Berger, B.R., and Christie, P.J. 1994.** Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens virB* operon: *virB2* through *virB11* are essential virulence genes. *J Bacteriol* 176, 3646-3660.

• **Bhat, U.R., Carlson, R.W., Busch, M., and Mayer, H. 1991.** Distribution and phylogenetic significance of 27-hydroxy-octacosanoic acid in lipopolysaccharides from bacteria belonging to the alpha-2 subgroup of Proteobacteria. *Int J Syst Bacteriol* 41, 213-217.

• **Billard, E., Cazevaille, C., Dornand, J., and Gross, A. 2005.** High susceptibility of human dendritic cells to invasion by the intracellular pathogens *Brucella suis*, *B. abortus*, and *B. melitensis*. *Infect Immun* 73, 8418-8424.

• **Billard, E., Dornand, J., and Gross, A. 2007a.** Interaction of *Brucella suis* and *Brucella abortus* rough strains with human dendritic cells. *Infect Immun* 75, 5916-5923.

• **Billard, E., Dornand, J., and Gross, A.**

- 2007b.** *Brucella suis* prevents human dendritic cell maturation and antigen presentation through regulation of tumor necrosis factor alpha secretion. *Infect Immun* 75, 4980-4989.
- **Birnboim, H.C., and Doly, J. 1979.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
 - **Bishop, R.E., Gibbons, H.S., Guina, T., Trent, M.S., Miller, S.I., and Raetz, C.R. 2000.** Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of gram-negative bacteria. *EMBO J* 19, 5071-5080.
 - **Blasco, J.M., Marín, C.M., Barberán, M., Moriyón, I., and Díaz, R. 1987.** Immunization with *Brucella melitensis* Rev 1 against *Brucella ovis* infection of rams. *Vet Microbiol* 14, 381-392.
 - **Blasco, J.M. 1990.** *Brucella ovis*. In *Animal Brucellosis*, p 351-378. Edited by K. Nielsen and J.R. Duncan. CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA.
 - **Blasco, J.M., and Díaz, R. 1993.** *Brucella melitensis* Rev-1 vaccine as a cause of human brucellosis. *Lancet* 342, 805.
 - **Blasco, J.M. 1997.** A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev Vet Med* 31, 275-283.
 - **Bohin, J.P. 2000.** Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 186, 11-19.
 - **Boigegrain, R.A., Salhi, I., Álvarez-Martínez, M.T., Machold, J., Fedon, Y., Arpagaus, M., Weise, C., Rittig, M., and Rouot, B. 2004.** Release of periplasmic proteins of *Brucella suis* upon acidic shock involves the outer membrane protein Omp25. *Infect Immun* 72, 5693-5703.
 - **Boschioli, M.L., Ouahrani-Bettache, S., Foulongne, V., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Allardet-Servent, A., Cazevielle, C., Liautard, J.P., Ramuz, M., and O'Callaghan, D. 2002.** The *Brucella suis* *virB* operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1544-1549.
 - **Bowden, R.A., Cloeckert, A., Zygmunt, M.S., Bernard, S., and Dubray, G. 1995a.** Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infect Immun* 63, 3945-3952.
 - **Bowden, R.A., Cloeckert, A., Zygmunt, M.S., and Dubray, G. 1995b.** Outer-membrane protein- and rough lipopolysaccharide-specific monoclonal antibodies protect mice against *Brucella ovis*. *J Med Microbiol* 43, 344-347.
 - **Bowden, R.A., Cloeckert, A., Zygmunt, M.S., and Dubray, G. 1998.** Evaluation of immunogenicity and protective activity in BALB/c mice of the 25-kDa major outer-membrane protein of *Brucella melitensis* (Omp25) expressed in *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 47, 39-48.
 - **Bowden, R.A., Estein, S.M., Zygmunt, M.S., Dubray, G., and Cloeckert, A. 2000.** Identification of protective outer membrane antigens of *Brucella ovis* by passive immunization of mice with monoclonal antibodies. *Microbes Infect* 2, 481-488.
 - **Bradford, M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
 - **Breedveld, M.W., and Miller, K.J. 1994.** Cyclic beta-glucans of members of the family Rhizobiaceae. *Microbiol Rev* 58, 145-161.
 - **Briones, G., Iñón de Iannino, N., Steinberg, M., and Ugalde, R.A. 1997.** Periplasmic cyclic 1,2-beta-glucan in *Brucella* spp. is not

osmoregulated. *Microbiology* 143 (Pt 4), 1115-1124.

• **Briones, G., Iñón de Iannino, N., Roset, M., Vigliocco, A., Paulo, P.S., and Ugalde, R.A. 2001.** *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. *Infect Immun* 69, 4528-4535.

• **Bryk, R., Griffin, P., and Nathan, C. 2000.** Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* 407, 211-215.

• **Bundle, D.R., Cherwonogrodzky, J.W., Gidney, M.A., Meikle, P.J., Perry, M.B., and Peters, T. 1989.** Definition of *Brucella* A and M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides. *Infect Immun* 57, 2829-2836.

• **Burnette, W.N. 1981.** "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112, 195-203.

C

• **Camilli, A., and Bassler, B.L. 2006.** Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* 311, 1113-1116.

• **Cardoso, P.G., Macedo, G.C., Azevedo, V., and Oliveira, S.C. 2006.** *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb Cell Fact* 5, 13.

• **Carmichael, L.E. 1966.** Abortion in 200 beagles. *J AM Vet Med Assoc* 149-1126.

• **Carmichael, L.E., and Joubert, J.C. 1987.** A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant

(M-) organism as antigen. *Cornell Vet* 77, 3-12.

• **Caro-Hernández, P., Fernández-Lago, L., de Miguel, M.J., Martín-Martín, A.I., Cloeckart, A., Grilló, M.J., and Vizcaíno, N. 2007.** Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*. *Infect Immun* 75, 4050-4061.

• **Caron, E., Peyrard, T., Köhler, S., Cabane, S., Liautard, J.P., and Dornand, J. 1994.** Live *Brucella* spp. fail to induce tumor necrosis factor alpha excretion upon infection of U937-derived phagocytes. *Infect Immun* 62, 5267-5274.

• **Caron, E., Gross, A., Liautard, J.P., and Dornand, J. 1996.** *Brucella* species release a specific, protease-sensitive, inhibitor of TNF-alpha expression, active on human macrophage-like cells. *J Immunol* 156, 2885-2893.

• **Carroll, J.A., Coleman, S.A., Smitherman, L.S., and Minnick, M.F. 2000.** Hemin-binding surface protein from *Bartonella quintana*. *Infect Immun* 68, 6750-6757.

• **Cassataro, J., Velikovskiy, C.A., de la Barrera, S., Estein, S.M., Bruno, L., Bowden, R., Pasquevich, K.A., Fossati, C.A., and Giambartolomei, G.H. 2005a.** A DNA vaccine coding for the *Brucella* outer membrane protein 31 confers protection against *B. melitensis* and *B. ovis* infection by eliciting a specific cytotoxic response. *Infect Immun* 73, 6537-6546.

• **Cassataro, J., Estein, S.M., Pasquevich, K.A., Velikovskiy, C.A., de la Barrera, S., Bowden, R., Fossati, C.A., and Giambartolomei, G.H. 2005b.** Vaccination with the recombinant *Brucella* outer membrane protein 31 or a derived 27-amino-acid synthetic peptide elicits a CD4+ T helper 1 response that protects against *Brucella melitensis* infection. *Infect Immun* 73, 8079-8088.

• **Cassataro, J., Pasquevich, K.A., Estein,**

- S.M., Laplagne, D.A., Zwerdling, A., de la Barrera, S., Bowden, R., Fossati, C.A., Giambartolomei, G.H., and Goldbaum, F.A. 2007a.** A DNA vaccine coding for the chimera BLSOmp31 induced a better degree of protection against *B. ovis* and a similar degree of protection against *B. melitensis* than Rev.1 vaccination. *Vaccine* 25, 5958-5967.
- **Cassataro, J., Pasquevich, K.A., Estein, S.M., Laplagne, D.A., Velikovskiy, C.A., de la Barrera, S., Bowden, R., Fossati, C.A., Giambartolomei, G.H., and Goldbaum, F.A. 2007b.** A recombinant subunit vaccine based on the insertion of 27 amino acids from Omp31 to the N-terminus of BLS induced a similar degree of protection against *B. ovis* than Rev.1 vaccination. *Vaccine* 25, 4437-4446.
 - **Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D.M., Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E., and Gorvel, J.P. 2003.** *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 198, 545-556.
 - **Celli, J., and Gorvel, J.P. 2004.** Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Microbiol* 7, 93-97.
 - **Celli, J., Salcedo, S.P., and Gorvel, J.P. 2005.** *Brucella* coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1673-1678.
 - **Celli, J. 2006.** Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. *Res Microbiol* 157, 93-98.
 - **Ciocchini, A.E., Roset, M.S., Iñón de Iannino, N., and Ugalde, R.A. 2004.** Membrane topology analysis of cyclic glucan synthase, a virulence determinant of *Brucella abortus*. *J Bacteriol* 186, 7205-7213.
 - **Ciocchini, A.E., Roset, M.S., Briones, G., Iñón de Iannino, N., and Ugalde, R.A. 2006.** Identification of active site residues of the inverting glycosyltransferase Cgs required for the synthesis of cyclic beta-1,2-glucan, a *Brucella abortus* virulence factor. *Glycobiology* 16, 679-691.
 - **Cirl, C., Wieser, A., Yadav, M., Duerr, S., Schubert, S., Fischer, H., Stappert, D., Wantia, N., Rodríguez, N., Wagner, H., Svanborg, C., and Miethke, T. 2008.** Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. *Nat Med* 14, 399-406.
 - **CloECKaert, A., de Wergifosse, P., Dubray, G., and Limet, J.N. 1990.** Identification of seven surface-exposed *Brucella* outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: immunogold labeling for electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect Immun* 58, 3980-3987.
 - **CloECKaert, A., Jacques, I., Bosseray, N., Limet, J.N., Bowden, R., Dubray, G., and Plommet, M. 1991.** Protection conferred on mice by monoclonal antibodies directed against outer-membrane-protein antigens of *Brucella*. *J Med Microbiol* 34, 175-180.
 - **CloECKaert, A., Zygmunt, M.S., Nicolle, J.C., Dubray, G., and Limet, J.N. 1992a.** O-chain expression in the rough *Brucella melitensis* strain B115: induction of O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies and intracellular localization demonstrated by immunoelectron microscopy. *J Gen Microbiol* 138, 1211-1219.
 - **CloECKaert, A., Zygmunt, M.S., de Wergifosse, P., Dubray, G., and Limet, J.N. 1992b.** Demonstration of peptidoglycan-associated *Brucella* outer-membrane proteins by use of monoclonal antibodies. *J Gen Microbiol* 138, 1543-1550.

- Cloeckaert, A., Zygmunt, M.S., Dubray, G., and Limet, J.N. 1993. Characterization of O-polysaccharide specific monoclonal antibodies derived from mice infected with the rough *Brucella melitensis* strain B115. *J Gen Microbiol* 139, 1551-1556.
- Cloeckaert, A., Verger, J.M., Grayon, M., and Grepinet, O. 1995a. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology* 141 (Pt 9), 2111-2121.
- Cloeckaert, A., Jacques, I., Limet, J.N., and Dubray, G. 1995b. Immunogenic properties of *Brucella melitensis* cell-wall fractions in BALB/c mice. *J Med Microbiol* 42, 200-208.
- Cloeckaert, A., Verger, J.M., Grayon, M., and Vizcaíno, N. 1996a. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *FEMS Microbiol Lett* 145, 1-8.
- Cloeckaert, A., Verger, J.M., Grayon, M., Zygmunt, M.S., and Grepinet, O. 1996b. Nucleotide sequence and expression of the gene encoding the major 25-kilodalton outer membrane protein of *Brucella ovis*: Evidence for antigenic shift, compared with other *Brucella* species, due to a deletion in the gene. *Infect Immun* 64, 2047-2055.
- Cloeckaert, A., Weynants, V., Godfroid, J., Verger, J.M., Grayon, M., and Zygmunt, M.S. 1998. O-Polysaccharide epitopic heterogeneity at the surface of *Brucella* spp. studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol* 5, 862-870.
- Cloeckaert, A., Verger, J.M., Grayon, M., Paquet, J.Y., Garin-Bastuji, B., Foster, G., and Godfroid, J. 2001. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. *Microbes Infect* 3, 729-738.
- Cloeckaert, A., Vizcaíno, N., Paquet, J.Y., Bowden, R.A., and Elzer, P.H. 2002. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Vet Microbiol* 90, 229-247.
- Cloeckaert, A., Jacques, I., Grilló, M.J., Marín, C.M., Grayon, M., Blasco, J.M., and Verger, J.M. 2004. Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev.1 single and double deletion mutants of the *bp26* and *omp31* genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis. *Vaccine* 22, 2827-2835.
- Cohen, S.N., Chang, A.C., and Hsu, L. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 2110-2114.
- Comerci, D.J., Martínez-Lorenzo, M.J., Sieira, R., Gorvel, J.P., and Ugalde, R.A. 2001. Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell Microbiol* 3, 159-168.
- Commander, N.J., Spencer, S.A., Wren, B.W., and MacMillan, A.P. 2007. The identification of two protective DNA vaccines from a panel of five plasmid constructs encoding *Brucella melitensis* 16M genes. *Vaccine* 25, 43-54.
- Conde-Álvarez, R., Grilló, M.J., Salcedo, S.P., de Miguel, M.J., Fugier, E., Gorvel, J.P., Moriyón, I., and Iriarte, M. 2006. Synthesis of phosphatidylcholine, a typical eukaryotic phospholipid, is necessary for full virulence of the intracellular bacterial parasite *Brucella abortus*. *Cell Microbiol* 8, 1322-1335.
- Connolly, J.P., Comerci, D., Alefantis, T.G., Walz, A., Quan, M., Chafin, R., Grewal, P., Mujer, C.V., Ugalde, R.A., and DelVecchio, V.G. 2006. Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development.

Proteomics 6, 3767-3780.

• **Coppolino, M.G., Krause, M., Hagendorff, P., Monner, D.A., Trimble, W., Grinstein, S., Wehland, J., and Sechi, A.S. 2001.** Evidence for a molecular complex consisting of Fyb/SLAP, SLP-76, Nck, VASP and WASP that links the actin cytoskeleton to Fcγ receptor signalling during phagocytosis. *J Cell Sci* 114, 4307-4318.

• **Corbeil, L.B., Blau, K., Inzana, T.J., Nielsen, K.H., Jacobson, R.H., Corbeil, R.R., and Winter, A.J. 1988.** Killing of *Brucella abortus* by bovine serum. *Infect Immun* 56, 3251-3261.

• **Corbel, M.J., and Brinley-Morgan, W.J. 1984.** Genus *Brucella*, Meyer and Shaw 1920, 173 AL. In: Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1., p 377-88. Edited by A.E. Baltimore, Williams & Wilkins Co., Baltimore. USA.

• **Corbel, M. J. 1990.** *Brucella*. In: Topley & Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity. 8th. ed. Edited by M. T. Parker & L. H. Collier. Edward Arnold, London.

CH

• **Chain, P.S., Comerci, D.J., Tolmasky, M.E., Larimer, F.W., Malfatti, S.A., Vergez, L.M., Agüero, F., Land, M.L., Ugalde, R.A., and García, E. 2005.** Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*. *Infect Immun* 73, 8353-8361.

• **Chang, G., and Roth, C.B. 2001.** Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science* 293, 1793-1800.

• **Charles, T.C., and Nester, E.W. 1993.** A chromosomally encoded two-component sensory transduction system is required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 175, 6614-6625.

• **Chaves-Olarte, E., Guzmán-Verri, C., Meresse, S., Desjardins, M., Pizarro-Cerdá, J., Badilla, J., Gorvel, J.P., and Moreno, E. 2002.** Activation of Rho and Rab GTPases dissociates *Brucella abortus* internalization from intracellular trafficking. *Cell Microbiol* 4, 663-676.

• **Cheng, H.P., and Walker, G.C. 1998.** Succinoglycan production by *Rhizobium meliloti* is regulated through the ExoS-ChvI two-component regulatory system. *J Bacteriol* 180, 20-26.

• **Chen, F., and He, Y. 2009.** Caspase-2 mediated apoptotic and necrotic murine macrophage cell death induced by rough *Brucella abortus*. *PLoS One* 4, e6830.

• **Christie, P.J. 1997.** *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *J Bacteriol* 179, 3085-3094.

• **Christie, P.J. 2004.** Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochim Biophys Acta* 1694, 219-234.

• **Christie, P.J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S., and Cascales, E. 2005.** Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol* 59, 451-485.

• **Chumakov, M.I., and Kurbanova, I.V. 1998.** Localization of the protein VirB1 involved in contact formation during conjugation among *Agrobacterium* cells. *FEMS Microbiol Lett* 168, 297-301.

D

• **Damp, S.C., Crumrine, M.H., and Lewis, G.E., Jr. 1973.** Microtiter plate agglutination test for *Brucella canis* antibodies. *Appl Microbiol* 25, 489-490.

- **Davis, D.S., and Elzer, P.H. 2002.** *Brucella* vaccines in wildlife. *Vet Microbiol* 90, 533-544.
- **Dawson, C.E., Stubberfield, E.J., Perrett, L.L., King, A.C., Whatmore, A.M., Bashiruddin, J.B., Stack, J.A., and Macmillan, A.P. 2008.** Phenotypic and molecular characterisation of *Brucella* isolates from marine mammals. *BMC Microbiol* 8, 224.
- **De, B.K., Stauffer, L., Koylass, M.S., Sharp, S.E., Gee, J.E., Helsel, L.O., Steigerwalt, A.G., Vega, R., Clark, T.A., Daneshvar, M.I., Wilkins, P.P., and Whatmore, A.M. 2008.** Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. *J Clin Microbiol* 46, 43-49.
- **de Jong, M.F., Sun, Y.H., den Hartigh, A.B., van Dijl, J.M., and Tsolis, R.M. 2008.** Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the *Brucella* type IV secretion system. *Mol Microbiol* 70, 1378-1396.
- **de Wergifosse, P., Lintermans, P., Limet, J.N., and Cloeckaert, A. 1995.** Cloning and nucleotide sequence of the gene coding for the major 25-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*. *J Bacteriol* 177, 1911-1914.
- **Delpino, M.V., Cassataro, J., Fossati, C.A., Goldbaum, F.A., and Baldi, P.C. 2006.** *Brucella* outer membrane protein Omp31 is a haemin-binding protein. *Microbes Infect* 8, 1203-1208.
- **Delpino, M.V., Comerci, D.J., Wagner, M.A., Eschenbrenner, M., Mujer, C.V., Ugalde, R.A., Fossati, C.A., Baldi, P.C., and Delvecchio, V.G. 2009.** Differential composition of culture supernatants from wild-type *Brucella abortus* and its isogenic *virB* mutants. *Arch Microbiol* 191, 571-581.
- **Delrue, R.M., Martínez-Lorenzo, M., Lestrade, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Gorvel, J.P., and Letesson, J.J. 2001.** Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol* 3, 487-497.
- **Delrue, R.M., Deschamps, C., Léonard, S., Nijskens, C., Danese, I., Schaus, J.M., Bonnot, S., Ferooz, J., Tibor, A., De Bolle, X., and Letesson, J.J. 2005.** A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. *Cell Microbiol* 7, 1151-1161.
- **DelVecchio, V.G., Kapatral, V., Elzer, P., Patra, G., and Mujer, C.V. 2002.** The genome of *Brucella melitensis*. *Vet Microbiol* 90, 587-592.
- **den Hartigh, A.B., Sun, Y.H., Sondervan, D., Heuvelmans, N., Reinders, M.O., Ficht, T.A., and Tsolis, R.M. 2004.** Differential requirements for VirB1 and VirB2 during *Brucella abortus* infection. *Infect Immun* 72, 5143-5149.
- **den Hartigh, A.B., Rolán, H.G., de Jong, M.F., and Tsolis, R.M. 2008.** VirB3 to VirB6 and VirB8 to VirB11, but not VirB7, are essential for mediating persistence of *Brucella* in the reticuloendothelial system. *J Bacteriol* 190, 4427-4436.
- **Dermine, J.F., Duclos, S., Garin, J., St-Louis, F., Rea, S., Parton, R.G., and Desjardins, M. 2001.** Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *J Biol Chem* 276, 18507-18512.
- **Detilleux, P.G., Deyoe, B.L., and Cheville, N.F. 1990.** Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells *in vitro*. *Infect Immun* 58, 2320-2328.
- **Di Paolo, G., and De Camilli, P. 2006.** Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443, 651-657.
- **Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. 1991.**

Construction of an eae deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun* 59, 4310-4317.

• **Dornand, J., Gross, A., Lafont, V., Liautard, J., Oliaro, J., and Liautard, J.P. 2002.** The innate immune response against *Brucella* in humans. *Vet Microbiol* 90, 383-394.

• **Douglas, J.T., and Buchanan, T.M. 1980.** Quantitation of *Brucella* lipopolysaccharide antigen by enzyme-linked immunosorbent assay. *Abstr Annu Meet Am Soc Microbiol* B29, 22.

• **Douglas, J.T., Rosenberg, E.Y., Nikaido, H., Verstreat, D.R., and Winter, A.J. 1984.** Porins of *Brucella* species. *Infect Immun* 44, 16-21.

• **Dozot, M., Boigegrain, R.A., Delrue, R.M., Hallez, R., Ouahrani-Bettache, S., Danese, I., Letesson, J.J., De Bolle, X., and Köhler, S. 2006.** The stringent response mediator Rsh is required for *Brucella melitensis* and *Brucella suis* virulence, and for expression of the type IV secretion system *virB*. *Cell Microbiol* 8, 1791-1802.

• **Dramsi, S., and Cossart, P. 1998.** Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 137-166.

• **Dubray, G., and Bézard, G. 1980.** Isolation of three *Brucella abortus* cell-wall antigens protective in murine experimental brucellosis. *Ann Rech Vet* 11, 367-373.

• **Dubray, G., and Charriaut, C. 1983.** Evidence of three major polypeptide species and two major polysaccharide species in the *Brucella* outer membrane. *Ann Rech Vet* 14, 311-318.

• **Dylan, T., Ielpi, L., Stanfield, S., Kashyap, L., Douglas, C., Yanofsky, M., Nester, E., Helinski, D.R., and Ditta, G. 1986.** *Rhizobium meliloti* genes required for nodule development

are related to chromosomal virulence genes in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4403-4407.

E

• **Edmonds, M.D., Cloeckart, A., Booth, N.J., Fulton, W.T., Hagius, S.D., Walker, J.V., and Elzer, P.H. 2001.** Attenuation of a *Brucella abortus* mutant lacking a major 25 kDa outer membrane protein in cattle. *Am J Vet Res* 62, 1461-1466.

• **Edmonds, M.D., Cloeckart, A., and Elzer, P.H. 2002a.** *Brucella* species lacking the major outer membrane protein Omp25 are attenuated in mice and protect against *Brucella melitensis* and *Brucella ovis*. *Vet Microbiol* 88, 205-221.

• **Edmonds, M.D., Cloeckart, A., Hagius, S.D., Samartino, L.E., Fulton, W.T., Walker, J.V., Enright, F.M., Booth, N.J., and Elzer, P.H. 2002b.** Pathogenicity and protective activity in pregnant goats of a *Brucella melitensis* Delta*omp25* deletion mutant. *Res Vet Sci* 72, 235-239.

• **Eisenschenk, F.C., Houle, J.J., and Hoffmann, E.M. 1995.** Serum sensitivity of field isolates and laboratory strains of *Brucella abortus*. *Am J Vet Res* 56, 1592-1598.

• **Eisenschenk, F.C., Houle, J.J., and Hoffmann, E.M. 1999.** Mechanism of serum resistance among *Brucella abortus* isolates. *Vet Microbiol* 68, 235-244.

• **El Khoury, J., Thomas, C.A., Loike, J.D., Hickman, S.E., Cao, L., and Silverstein, S.C. 1994.** Macrophages adhere to glucose-modified basement membrane collagen IV via their scavenger receptors. *J Biol Chem* 269, 10197-10200.

• **El Khoury, J., Hickman, S.E., Thomas, C.A., Cao, L., Silverstein, S.C., and Loike, J.D.**

1996. Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature* 382, 716-719.
- **Elzer, P.H., Phillips, R.W., Kovach, M.E., Peterson, K.M., and Roop, R.M., 2nd 1994.** Characterization and genetic complementation of a *Brucella abortus* high-temperature-requirement A (*htrA*) deletion mutant. *Infect Immun* 62, 4135-4139.
 - **Endley, S., McMurray, D., and Ficht, T.A. 2001.** Interruption of the *cydB* locus in *Brucella abortus* attenuates intracellular survival and virulence in the mouse model of infection. *J Bacteriol* 183, 2454-2462.
 - **Eschenbrenner, M., Wagner, M.A., Horn, T.A., Kraycer, J.A., Mujer, C.V., Hagijs, S., Elzer, P., and DelVecchio, V.G. 2002.** Comparative proteome analysis of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev 1 and a virulent strain, 16M. *J Bacteriol* 184, 4962-4970.
 - **Eschenbrenner, M., Horn, T.A., Wagner, M.A., Mujer, C.V., Miller-Scandle, T.L., and DelVecchio, V.G. 2006.** Comparative proteome analysis of laboratory grown *Brucella abortus* 2308 and *Brucella melitensis* 16M. *J Proteome Res* 5, 1731-1740.
 - **Estein, S.M., Cassataro, J., Vizcaíno, N., Zygmunt, M.S., Cloeckert, A., and Bowden, R.A. 2003.** The recombinant Omp31 from *Brucella melitensis* alone or associated with rough lipopolysaccharide induces protection against *Brucella ovis* infection in BALB/c mice. *Microbes Infect* 5, 85-93.
 - **Estein, S.M., Cheves, P.C., Fiorentino, M.A., Cassataro, J., Paolicchi, F.A., and Bowden, R.A. 2004.** Immunogenicity of recombinant Omp31 from *Brucella melitensis* in rams and serum bactericidal activity against *B. ovis*. *Vet Microbiol* 102, 203-213.
 - **Estein, S.M., Fiorentino, M.A., Paolicchi, F.A., Clause, M., Manazza, J., Cassataro, J., Giambartolomei, G.H., Coria, L.M., Zylberman, V., Fossati, C.A., Kjekens, R., and Goldbaum, F.A. 2009.** The polymeric antigen BLSOmp31 confers protection against *Brucella ovis* infection in rams. *Vaccine* 27, 6704-6711.
- F
- **Fensterbank, R., Pardon, P., and Marly, J. 1982.** Efficacy of *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine against *Brucella ovis* infection in rams. *Ann Rech Vet* 13, 185-190.
 - **Fensterbank, R., Pardon, P., and Marly, J. 1985.** Vaccination of ewes by a single conjunctival administration of *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine. *Ann Rech Vet* 16, 351-356.
 - **Ferguson, G.P., Datta, A., Baumgartner, J., Roop, R.M., 2nd, Carlson, R.W., and Walker, G.C. 2004.** Similarity to peroxisomal-membrane protein family reveals that *Sinorhizobium* and *Brucella* BacA affect lipid-A fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5012-5017.
 - **Fernandes, D.M., and Baldwin, C.L. 1995.** Interleukin-10 downregulates protective immunity to *Brucella abortus*. *Infect Immun* 63, 1130-1133.
 - **Fernández-Lago, L., Monte, M., and Chordi, A. 1996.** Endogenous gamma interferon and interleukin-10 in *Brucella abortus* 2308 infection in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 15, 109-114.
 - **Fernández-Prada, C.M., Nikolich, M., Vemulapalli, R., Sriranganathan, N., Boyle, S.M., Schurig, G.G., Hadfield, T.L., and Hoover, D.L. 2001.** Deletion of *wboA* enhances activation of the lectin pathway of complement in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Infect Immun* 69, 4407-4416.
 - **Fernández-Prada, C.M., Zelazowska, E.B., Nikolich, M., Hadfield, T.L., Roop, R.M., 2nd,**

- Robertson, G.L., and Hoover, D.L. 2003.** Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O-Polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. *Infect Immun* 71, 2110-2119.
- **Ferrero, M.C., Fossati, C.A., and Baldi, P.C. 2009.** Smooth *Brucella* strains invade and replicate in human lung epithelial cells without inducing cell death. *Microbes Infect* 11, 476-483.
- **Ficapal, A., Alonso-Urmeneta, B., Velasco, J., Moriyón, I., and Blasco, J.M. 1995.** Diagnosis of *Brucella ovis* infection of rams with an ELISA using protein G as conjugate. *Vet Rec* 137, 145-147.
- **Ficht, T.A., Bearden, S.W., Sowa, B.A., and Adams, L.G. 1988.** A 36-kilodalton *Brucella abortus* cell envelope protein is encoded by repeated sequences closely linked in the genomic DNA. *Infect Immun* 56, 2036-2046.
- **Ficht, T.A., Bearden, S.W., Sowa, B.A., and Adams, L.G. 1989.** DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. *Infect Immun* 57, 3281-3291.
- **Ficht, T.A., Bearden, S.W., Sowa, B.A., and Marquis, H. 1990.** Genetic variation at the *omp2* porin locus of the brucellae: species-specific markers. *Mol Microbiol* 4, 1135-1142.
- **Ficht, T.A., Husseinen, H.S., Derr, J., and Bearden, S.W. 1996.** Species-specific sequences at the *omp2* locus of *Brucella* type strains. *Int J Syst Bacteriol* 46, 329-331.
- **Fontes, P., Álvarez-Martínez, M.T., Gross, A., Carnaud, C., Köhler, S., and Liutard, J.P. 2005.** Absence of evidence for the participation of the macrophage cellular prion protein in infection with *Brucella suis*. *Infect Immun* 73, 6229-6236.
- **Foreman, D.L., Vanderlinde, E.M., Bay, D.C., and Yost, C.K. 2010.** Characterization of a gene family of outer membrane proteins (*ropB*) in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae VF39SM and the role of the sensor kinase ChvG in their regulation. *J Bacteriol* 192, 975-983.
- **Forestier, C., Moreno, E., Pizarro-Cerdá, J., and Gorvel, J.P. 1999.** Lysosomal accumulation and recycling of lipopolysaccharide to the cell surface of murine macrophages, an *in vitro* and *in vivo* study. *J Immunol* 162, 6784-6791.
- **Forestier, C., Deleuil, F., Lapaque, N., Moreno, E., and Gorvel, J.P. 2000.** *Brucella abortus* lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. *J Immunol* 165, 5202-5210.
- **Foster, G., Jahans, K.L., Reid, R.J., and Ross, H.M. 1996.** Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals and an otter. *Vet Rec* 138, 583-586.
- **Foster, G., Osterman, B.S., Godfroid, J., Jacques, I., and Cloeckert, A. 2007.** *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 2688-2693.
- **Foulongne, V., Bourg, G., Cazevieuille, C., Michaux-Charachon, S., and O'Callaghan, D. 2000.** Identification of *Brucella suis* genes affecting intracellular survival in an *in vitro* human macrophage infection model by signature-tagged transposon mutagenesis. *Infect Immun* 68, 1297-1303.
- **Fraser, I., Hughes, D., and Gordon, S. 1993.** Divalent cation-independent macrophage adhesion inhibited by monoclonal antibody to murine scavenger receptor. *Nature* 364, 343-346.
- **Freer, E., Rojas, N., Weintraub, A., Lindberg, A.A., and Moreno, E. 1995.**

Heterogeneity of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Res Microbiol* 146, 569-578.

• **Freer, E., Moreno, E., Moriyón, I., Pizarro-Cerdá, J., Weintraub, A., and Gorvel, J.P. 1996.** *Brucella-Salmonella* lipopolysaccharide chimeras are less permeable to hydrophobic probes and more sensitive to cationic peptides and EDTA than are their native *Brucella* sp. counterparts. *J Bacteriol* 178, 5867-5876.

• **Fretrin, D., Fauconnier, A., Köhler, S., Halling, S., Léonard, S., Nijskens, C., Ferooz, J., Lestrade, P., Delrue, R.M., Danese, I., Vandenhoute, J., Tibor, A., DeBolle, X., and Letesson, J.J. 2005.** The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cell Microbiol* 7, 687-698.

• **Fuqua, C., Parsek, M.R., and Greenberg, E.P. 2001.** Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* 35, 439-468.

G

• **Galdiero, E., Romano Carratelli, C., Vitiello, M., Nuzzo, I., Del Vecchio, E., Bentivoglio, C., Perillo, G., and Galdiero, F. 2000.** HSP and apoptosis in leukocytes from infected or vaccinated animals by *Brucella abortus*. *New Microbiol* 23, 271.

• **Gallot-Lavallée, T., Zygmunt, M.S., Cloeckert, A., Bézard, G., and Dubray, G. 1995.** Growth phase-dependent variations in the outer membrane protein profile of *Brucella melitensis*. *Res Microbiol* 146, 227-236.

• **García-Carrillo, C. 1981.** Protection of rams against *Brucella ovis* infection by *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine. *Zentralbl Veterinarmed B* 28, 425-431.

• **García-Yoldi, D., Marín, C.M., and López-**

Goñi, I. 2005. Restriction site polymorphisms in the genes encoding new members of group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. *FEMS Microbiol Lett* 245, 79-84.

• **García-Yoldi, D., Marín, C.M., de Miguel, M.J., Muñoz, P.M., Vizmanos, J.L., and López-Goñi, I. 2006.** Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. *Clin Chem* 52, 779-781.

• **Garín-Bastuji, B., Bowden, R.A., Dubray, G., and Limet, J.N. 1990.** Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting analysis of smooth-lipopolysaccharide heterogeneity among *Brucella* biovars related to A and M specificities. *J Clin Microbiol* 28, 2169-2174.

• **Gatfield, J., and Pieters, J. 2000.** Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science* 288, 1647-1650.

• **Gay, P., Le Coq, D., Steinmetz, M., Berkelman, T., and Kado, C.I. 1985.** Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 164, 918-921.

• **Gee, J.M., Valderas, M.W., Kovach, M.E., Grippe, V.K., Robertson, G.T., Ng, W.L., Richardson, J.M., Winkler, M.E., and Roop, R.M., 2nd 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.

• **Glazebrook, J., Ichige, A., and Walker, G.C. 1993.** A *Rhizobium meliloti* homolog of the *Escherichia coli* peptide-antibiotic transport protein SbmA is essential for bacteroid development. *Genes Dev* 7, 1485-1497.

- **Godfroid, F., Taminiau, B., Danese, I., Denoel, P., Tibor, A., Weynants, V., Cloeckert, A., Godfroid, J., and Letesson, J.J. 1998.** Identification of the perosamine synthetase gene of *Brucella melitensis* 16M and involvement of lipopolysaccharide O side chain in *Brucella* survival in mice and in macrophages. *Infect Immun* 66, 5485-5493.
 - **Goldstein, J., Hoffman, T., Frasc, C., Lizzio, E.F., Beining, P.R., Hochstein, D., Lee, Y.L., Angus, R.D., and Golding, B. 1992.** Lipopolysaccharide (LPS) from *Brucella abortus* is less toxic than that from *Escherichia coli*, suggesting the possible use of *B. abortus* or LPS from *B. abortus* as a carrier in vaccines. *Infect Immun* 60, 1385-1389.
 - **Gomi, K., Kikuchi, T., Tokue, Y., Fujimura, S., Uehara, A., Takada, H., Watanabe, A., and Nukiwa, T. 2006.** Mouse and human cell activation by N-dodecanoyl-DL-homoserine lactone, a *Chromobacterium violaceum* autoinducer. *Infect Immun* 74, 7029-7031.
 - **González, D., Grilló, M.J., De Miguel, M.J., Ali, T., Arce-Gorvel, V., Delrue, R.M., Conde-Álvarez, R., Muñoz, P., López-Goñi, I., Iriarte, M., Marín, C.M., Weintraub, A., Widmalm, G., Zygmunt, M., Letesson, J.J., Gorvel, J.P., Blasco, J.M., and Moriyón, I. 2008.** Brucellosis vaccines: assessment of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export. *PLoS One* 3, e2760.
 - **Gordon, S. 2002.** Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111, 927-930.
 - **Gross, A., Terraza, A., Ouahrani-Bettache, S., Liautard, J.P., and Dornand, J. 2000.** *In vitro* *Brucella suis* infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells. *Infect Immun* 68, 342-351.
 - **Guidolin, L.S., Ciocchini, A.E., Iñon de Iannino, N., and Ugalde, R.A. 2009.** Functional mapping of *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan synthase: identification of the protein domain required for cyclization. *J Bacteriol* 191, 1230-1238.
 - **Guilloteau, L.A., Laroucau, K., Vizcaíno, N., Jacques, I., and Dubray, G. 1999.** Immunogenicity of recombinant *Escherichia coli* expressing the omp31 gene of *Brucella melitensis* in BALB/c mice. *Vaccine* 17, 353-361.
 - **Gupta, V.K., Rout, P.K., and Vihan, V.S. 2007.** Induction of immune response in mice with a DNA vaccine encoding outer membrane protein (omp31) of *Brucella melitensis* 16M. *Res Vet Sci* 82, 305-313.
 - **Guzmán-Verri, C., Chaves-Olarte, E., von Eichel-Streiber, C., López-Goñi, I., Thelestam, M., Arvidson, S., Gorvel, J.P., and Moreno, E. 2001.** GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in nonprofessional phagocytes: direct activation of Cdc42. *J Biol Chem* 276, 44435-44443.
 - **Guzmán-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, A., Parra, A., Cloeckert, A., Garin, J., Gorvel, J.P., Moriyón, I., Moreno, E., and López-Goñi, I. 2002.** The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12375-12380.
- H
- **Hallez, R., Bellefontaine, A.F., Letesson, J.J., and De Bolle, X. 2004.** Morphological and functional asymmetry in alpha-proteobacteria. *Trends Microbiol* 12, 361-365.
 - **Hallez, R., Mignolet, J., Van Mullem, V., Wery, M., Vandenhoute, J., Letesson, J.J.,**

- Jacobs-Wagner, C., and De Bolle, X. 2007.** The asymmetric distribution of the essential histidine kinase PdhS indicates a differentiation event in *Brucella abortus*. *EMBO J* 26, 1444-1455.
- **Hampton, R.Y., Golenbock, D.T., Penman, M., Krieger, M., and Raetz, C.R. 1991.** Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature* 352, 342-344.
 - **Hanahan, D. 1983.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
 - **Hartel, S., Diehl, H.A., and Ojeda, F. 1998.** Methyl-beta-cyclodextrins and liposomes as water-soluble carriers for cholesterol incorporation into membranes and its evaluation by a microenzymatic fluorescence assay and membrane fluidity-sensitive dyes. *Anal Biochem* 258, 277-284.
 - **Hastings, J.W., and Neilson, K.H. 1977.** Bacterial bioluminescence. *Annu Rev Microbiol* 31, 549-595.
 - **Hentschel, U., and Hacker, J. 2001.** Pathogenicity islands: the tip of the iceberg. *Microbes Infect* 3, 545-548.
 - **Herrero, M., de Lorenzo, V., and Timmis, K.N. 1990.** Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 172, 6557-6567.
 - **Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., and Pease, L.R. 1989.** Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51-59.
 - **Hoffmann, E.M., and Houle, J.J. 1983.** Failure of *Brucella abortus* lipopolysaccharide (LPS) to activate the alternative pathway of complement. *Vet Immunol Immunopathol* 5, 65-76.
 - **Hong, P.C., Tsolis, R.M., and Ficht, T.A. 2000.** Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. *Infect Immun* 68, 4102-4107.
 - **Höppner, C., Carle, A., Sivanesan, D., Hoepfner, S., and Baron, C. 2005.** The putative lytic transglycosylase VirB1 from *Brucella suis* interacts with the type IV secretion system core components VirB8, VirB9 and VirB11. *Microbiology* 151, 3469-3482.
 - **Hoyer, B.H., and McCullough, N.B. 1968a.** Homologies of deoxyribonucleic acids from *Brucella ovis*, canine abortion organisms, and other *Brucella* species. *J Bacteriol* 96, 1783-1790.
 - **Hoyer, B.H., and McCullough, N.B. 1968b.** Polynucleotide homologies of *Brucella* deoxyribonucleic acids. *J Bacteriol* 95, 444-448.
 - **Huang, L.Y., Aliberti, J., Leifer, C.A., Segal, D.M., Sher, A., Golenbock, D.T., and Golding, B. 2003.** Heat-killed *Brucella abortus* induces TNF and IL-12p40 by distinct MyD88-dependent pathways: TNF, unlike IL-12p40 secretion, is Toll-like receptor 2 dependent. *J Immunol* 171, 1441-1446.
 - **Huber, B., Scholz, H.C., Lucero, N., and Busse, H.J. 2009.** Development of a PCR assay for typing and subtyping of *Brucella* species. *Int J Med Microbiol* 299, 563-573.

I

- **Iñón de Iannino, N., Briones, G., Tolmasky, M., and Ugalde, R.A. 1998.** Molecular cloning and characterization of *cgs*, the *Brucella abortus* cyclic beta(1-2) glucan synthetase gene: genetic complementation of *Rhizobium meliloti ndvB* and *Agrobacterium tumefaciens chvB* mutants. *J Bacteriol* 180, 4392-4400.

• **Iñón de Iannino, N.I., Briones, G., Iannino, F., and Ugalde, R.A. 2000.** Osmotic regulation of cyclic 1,2-beta-glucan synthesis. *Microbiology* 146 (Pt 7), 1735-1742.

• **Iriarte, M., González, D., Delrue, R.M., Monreal, D., Conde, R., López-Goñi, I., Letesson, J.J. and Moriyón, I. 2004.** *Brucella* lipopolysaccharide: Structure, Biosíntesis and Genetics. In *Brucella* Molecular and Cellular Biology, p 159-191. Edited by I. López-Goñi and I. Moriyón. Horizon bioscience. Pamplona. Spain.

J

• **Jacques, I., Cloeckert, A., Limet, J.N., and Dubray, G. 1992.** Protection conferred on mice by combinations of monoclonal antibodies directed against outer-membrane proteins or smooth lipopolysaccharide of *Brucella*. *J Med Microbiol* 37, 100-103.

• **Jahans, K.L., Foster, G., and Broughton, E.S. 1997.** The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Vet Microbiol* 57, 373-382.

• **Jiang, X., and Baldwin, C.L. 1993.** Effects of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*. *Infect Immun* 61, 124-134.

• **Jiang, X., Léonard, B., Benson, R., and Baldwin, C.L. 1993.** Macrophage control of *Brucella abortus*: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide. *Cell Immunol* 151, 309-319.

• **Jiménez de Bagüés, M.P., Terraza, A., Gross, A., and Dornand, J. 2004.** Different responses of macrophages to smooth and rough *Brucella* spp.: relationship to virulence. *Infect Immun* 72, 2429-2433.

• **Jubier-Maurin, V., Boigegrain, R.A., Cloeckert, A., Gross, A., Álvarez-Martínez, M.T., Terraza, A., Liautard, J., Köhler, S.,**

Rouot, B., Dornand, J., and Liautard, J.P. 2001. Major outer membrane protein Omp25 of *Brucella suis* is involved in inhibition of tumor necrosis factor alpha production during infection of human macrophages. *Infect Immun* 69, 4823-4830.

K

• **Kahl-McDonagh, M.M., and Ficht, T.A. 2006.** Evaluation of protection afforded by *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* unmarked deletion mutants exhibiting different rates of clearance in BALB/c mice. *Infect Immun* 74, 4048-4057.

• **Kahl-McDonagh, M.M., Elzer, P.H., Hagius, S.D., Walker, J.V., Perry, Q.L., Seabury, C.M., den Hartigh, A.B., Tsolis, R.M., Adams, L.G., Davis, D.S., and Ficht, T.A. 2006.** Evaluation of novel *Brucella melitensis* unmarked deletion mutants for safety and efficacy in the goat model of brucellosis. *Vaccine* 24, 5169-5177.

• **Keid, L.B., Soares, R.M., Vasconcellos, S.A., Chiebao, D.P., Salgado, V.R., Megid, J., and Richtzenhain, L.J. 2007a.** A polymerase chain reaction for detection of *Brucella canis* in vaginal swabs of naturally infected bitches. *Theriogenology* 68, 1260-1270.

• **Keid, L.B., Soares, R.M., Vasconcellos, S.A., Chiebao, D.P., Megid, J., Salgado, V.R., and Richtzenhain, L.J. 2007b.** A polymerase chain reaction for the detection of *Brucella canis* in semen of naturally infected dogs. *Theriogenology* 67, 1203-1210.

• **Keid, L.B., Soares, R.M., Vasconcellos, S.A., Megid, J., Salgado, V.R., and Richtzenhain, L.J. 2009.** Comparison of agar gel immunodiffusion test, rapid slide agglutination test, microbiological culture and PCR for the diagnosis of canine brucellosis. *Res Vet Sci* 86, 22-26.

• **Keid, L.B., Soares, R.M., Vasconcellos, S.A.,**

- Salgado, V.R., Megid, J., and Richtzenhain, L.J. 2010.** Comparison of a PCR assay in whole blood and serum specimens for canine brucellosis diagnosis. *Vet Rec* 167, 96-99.
- **Kim, S., Watarai, M., Makino, S., and Shirahata, T. 2002.** Membrane sorting during swimming internalization of *Brucella* is required for phagosome trafficking decisions. *Microb Pathog* 33, 225-237.
 - **Kim, S., Watarai, M., Kondo, Y., Erdenebaatar, J., Makino, S., and Shirahata, T. 2003.** Isolation and characterization of mini-Tn5Km2 insertion mutants of *Brucella abortus* deficient in internalization and intracellular growth in HeLa cells. *Infect Immun* 71, 3020-3027.
 - **Kim, S., Watarai, M., Suzuki, H., Makino, S., Kodama, T., and Shirahata, T. 2004.** Lipid raft microdomains mediate class A scavenger receptor-dependent infection of *Brucella abortus*. *Microb Pathog* 37, 11-19.
 - **Kittelberger, R., Diack, D.S., Vizcaíno, N., Zygmunt, M.S., and Cloeckert, A. 1998.** Characterization of an immuno-dominant antigen in *Brucella ovis* and evaluation of its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Microbiol* 59, 213-227.
 - **Ko, J., and Splitter, G.A. 2003.** Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev* 16, 65-78.
 - **Kovach, M.E., Phillips, R.W., Elzer, P.H., Roop, R.M., 2nd, and Peterson, K.M. 1994.** pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* 16, 800-802.
 - **Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., 2nd, and Peterson, K.M. 1995.** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166, 175-176.
 - **Krieger, M., and Herz, J. 1994.** Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* 63, 601-637.
 - **Kusumawati, A., Cazevieuille, C., Porte, F., Bettache, S., Liautard, J.P., and Sri Widada, J. 2000.** Early events and implication of F-actin and annexin I associated structures in the phagocytic uptake of *Brucella suis* by the J-774A.1 murine cell line and human monocytes. *Microb Pathog* 28, 343-352.
- L**
- **Lacerda, T.L., Cardoso, P.G., Augusto de Almeida, L., Camargo, I.L., Afonso, D.A., Trant, C.C., Macedo, G.C., Campos, E., Cravero, S.L., Salcedo, S.P., Gorvel, J.P., and Oliveira, S.C. 2010.** Inactivation of formyltransferase (*wbkC*) gene generates a *Brucella abortus* rough strain that is attenuated in macrophages and in mice. *Vaccine* 28, 5627-5634.
 - **Laemmli, U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
 - **Lai, E.M., and Kado, C.I. 1998.** Processed VirB2 is the major subunit of the promiscuous pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 180, 2711-2717.
 - **Lamontagne, J., Butler, H., Chaves-Olarte, E., Hunter, J., Schirm, M., Paquet, C., Tian, M., Kearney, P., Hamaidi, L., Chelsky, D., Moriyón, I., Moreno, E., and Paramithiotis, E. 2007.** Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*. *J Proteome Res* 6, 1519-1529.

- **Lapaque, N., Moriyón, I., Moreno, E., and Gorvel, J.P. 2005.** *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol* 8, 60-66.
- **Lapaque, N., Forquet, F., de Chastellier, C., Mishal, Z., Jolly, G., Moreno, E., Moriyon, I., Heuser, J.E., He, H.T., and Gorvel, J.P. 2006.** Characterization of *Brucella abortus* lipopolysaccharide macrodomains as mega rafts. *Cell Microbiol* 8, 197-206.
- **Lavigne, J.P., Patey, G., Sangari, F.J., Bourg, G., Ramuz, M., O'Callaghan, D., and Michaux-Charachon, S. 2005.** Identification of a new virulence factor, BvfA, in *Brucella suis*. *Infect Immun* 73, 5524-5529.
- **Léonard, S., Ferooz, J., Haine, V., Danese, I., Fretin, D., Tibor, A., de Walque, S., De Bolle, X., and Letesson, J.J. 2007.** FtcR is a new master regulator of the flagellar system of *Brucella melitensis* 16M with homologs in Rhizobiaceae. *J Bacteriol* 189, 131-141.
- **LeVier, K., Phillips, R.W., Grippe, V.K., Roop, R.M., 2nd, and Walker, G.C. 2000.** Similar requirements of a plant symbiont and a mammalian pathogen for prolonged intracellular survival. *Science* 287, 2492-2493.
- **LeVier, K., and Walker, G.C. 2001.** Genetic analysis of the *Sinorhizobium meliloti* BacA protein: differential effects of mutations on phenotypes. *J Bacteriol* 183, 6444-6453.
- **Li, S.C., Squires, C.L., and Squires, C. 1984.** Antitermination of *E. coli* rRNA transcription is caused by a control region segment containing lambda nut-like sequences. *Cell* 38, 851-860.
- **Li, L., Jia, Y., Hou, Q., Charles, T.C., Nester, E.W., and Pan, S.Q. 2002.** A global pH sensor: *Agrobacterium* sensor protein ChvG regulates acid-inducible genes on its two chromosomes and Ti plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12369-12374.
- **Lin, J., and Ficht, T.A. 1995.** Protein synthesis in *Brucella abortus* induced during macrophage infection. *Infect Immun* 63, 1409-1414.
- **Loisel-Meyer, S., Jiménez de Bagüés, M.P., Bassères, E., Dornand, J., Köhler, S., Liautard, J.P., and Jubier-Maurin, V. 2006.** Requirement of *norD* for *Brucella suis* virulence in a murine model of *in vitro* and *in vivo* infection. *Infect Immun* 74, 1973-1976.
- **López-Goñi, I., Guzmán-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, A., Moriyón, I., and Moreno, E. 2002.** Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS. *Vet Microbiol* 90, 329-339.
- **López-Goñi, I., García-Yoldi, D., Marín, C.M., de Miguel, M.J., Muñoz, P.M., Blasco, J.M., Jacques, I., Grayon, M., Cloeckert, A., Ferreira, A.C., Cardoso, R., Corrêa de Sá, M.I., Walravens, K., Albert, D., and Garin-Bastuji, B., 2008.** Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J Clin Microbiol* 46, 3484-3487.
- **Lucero, N.E., Maldonado, P.I., Kaufman, S., Escobar, G.I., Boeri, E., and Jacob, N.R. 2010.** *Brucella canis* causing infection in an HIV-infected patient. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10, 527-529.
- **Lynch, M., and Kuramitsu, H. 2000.** Expression and role of superoxide dismutases (SOD) in pathogenic bacteria. *Microbes Infect* 2, 1245-1255.

M

- **Manterola, L., Tejero-Garcés, A., Ficapal, A., Shopayeva, G., Blasco, J.M., Marín, C.M., and López-Goñi, I. 2003.** Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. *Vet Microbiol* 92, 65-

72.

- **Manterola, L., Moriyón, I., Moreno, E., Sola-Landa, A., Weiss, D.S., Koch, M.H., Howe, J., Brandenburg, K., and López-Goñi, I. 2005.** The lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR mutants contains lipid A modifications and has higher affinity for bactericidal cationic peptides. *J Bacteriol* 187, 5631-5639.
- **Manterola, L., Guzmán-Verri, C., Chaves-Olarte, E., Barquero-Calvo, E., de Miguel, M.J., Moriyón, I., Grilló, M.J., López-Goñi, I., and Moreno, E. 2007.** BvrR/BvrS-controlled outer membrane proteins Omp3a and Omp3b are not essential for *Brucella abortus* virulence. *Infect Immun* 75, 4867-4874.
- **Marín, C.M., Jiménez de Bagüés, M.P., Blasco, J.M., Gamazo, C., Moriyón, I., and Díaz, R. 1989.** Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. *Vet Rec* 125, 504-508.
- **Marín, C.M., Barberán, M., Jiménez de Bagüés, M.P., and Blasco, J.M. 1990.** Comparison of subcutaneous and conjunctival routes of Rev 1 vaccination for the prophylaxis of *Brucella ovis* infection in rams. *Res Vet Sci* 48, 209-215.
- **Marquis, H., and Ficht, T.A. 1993.** The *omp2* gene locus of *Brucella abortus* encodes two homologous outer membrane proteins with properties characteristic of bacterial porins. *Infect Immun* 61, 3785-3790.
- **Martínez de Tejada, G., Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E., and Moriyón, I. 1995.** The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infect Immun* 63, 3054-3061.
- **Martín-Martín, A.I., Sancho, P., Tejedor, C., Fernández-Lago, L., and Vizcaíno, N. 2010.** Differences in the outer membrane-related properties of the six classical *Brucella* species. *Vet J*. doi:10.1016/j.tvjl.2010.05.021.
- **Mayer-Scholl, A., Draeger, A., Göllner, C., Scholz, H.C., and Nöckler, K. 2010.** Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described *Brucella* species. *J Microbiol Methods* 80, 112-114.
- **McQuiston, J.R., Vemulapalli, R., Inzana, T.J., Schurig, G.G., Sriranganathan, N., Fritzing, D., Hadfield, T.L., Warren, R.A., Lindler, L.E., Snellings, N., Hoover, D., Halling, S.M., and Boyle, S.M. 1999.** Genetic characterization of a Tn5-disrupted glycosyltransferase gene homolog in *Brucella abortus* and its effect on lipopolysaccharide composition and virulence. *Infect Immun* 67, 3830-3835.
- **Meador, V.P., and Deyoe, B.L. 1989.** Intracellular localization of *Brucella abortus* in bovine placenta. *Vet Pathol* 26, 513-515.
- **Meikle, P.J., Perry, M.B., Cherwonogrodzky, J.W., and Bundle, D.R. 1989.** Fine structure of A and M antigens from *Brucella* biovars. *Infect Immun* 57, 2820-2828.
- **Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Jumas-Bilak, E., Guigue-Talet, P., Allardet-Servent, A., O'Callaghan, D., and Ramuz, M. 1997.** Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. *J Bacteriol* 179, 3244-3249.
- **Mignolet, J., Van der Henst, C., Nicolas, C., Deghelt, M., Dotreppe, D., Letesson, J.J., and De Bolle, X. 2010.** PdhS, an old-pole-localized histidine kinase, recruits the fumarase FumC in *Brucella abortus*. *J Bacteriol* 192, 3235-3239.
- **Miller, V.L., and Mekalanos, J.J. 1988.** A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in

Vibrio cholerae requires toxR. *J Bacteriol* 170, 2575-2583.

• **Miller, M.B., and Bassler, B.L. 2001.** Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55, 165-199.

• **Minnick, M.F., Sappington, K.N., Smitherman, L.S., Andersson, S.G., Karlberg, O., and Carroll, J.A. 2003.** Five-member gene family of *Bartonella quintana*. *Infect Immun* 71, 814-821.

• **Monreal, D., Grilló, M.J., González, D., Marín, C.M., De Miguel, M.J., López-Goñi, I., Blasco, J.M., Cloeckert, A., and Moriyón, I. 2003.** Characterization of *Brucella abortus* O-polysaccharide and core lipopolysaccharide mutants and demonstration that a complete core is required for rough vaccines to be efficient against *Brucella abortus* and *Brucella ovis* in the mouse model. *Infect Immun* 71, 3261-3271.

• **Montaraz, J.A., and Winter, A.J. 1986.** Comparison of living and nonliving vaccines for *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Infect Immun* 53, 245-251.

• **Moreno, E., Berman, D.T., and Boettcher, L.A. 1981.** Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infect Immun* 31, 362-370.

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

• **Moreno, E., and Moriyón, I. 2002.** *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1-3.

• **Moreno, E., Cloeckert, A., and Moriyón, I. 2002.** *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol* 90, 209-227.

• **Moriyón, I., and López-Goñi, I. 1998.** Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Int Microbiol* 1, 19-26.

• **Mossey, P., Hudacek, A., and Das, A. 2010.** *Agrobacterium tumefaciens* type IV secretion protein VirB3 is an inner membrane protein and requires VirB4, VirB7, and VirB8 for stabilization. *J Bacteriol* 192, 2830-2838.

• **Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. 1986.** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.

• **Myers, D.M., Jones, L.M., and Varela-Díaz, V.M. 1972.** Studies of antigens for complement fixation and gel diffusion tests in the diagnosis of infections caused by *Brucella ovis* and other *Brucella*. *Appl Microbiol* 23, 894-902.

• **Myers, D.M. 1973.** Field evaluation of the gel diffusion test for the diagnosis of ram epididymitis caused by *Brucella ovis*. *Appl Microbiol* 26, 855-857.

N

• **Naroeni, A., Jouy, N., Ouahrani-Bettache, S., Liautard, J.P., and Porte, F. 2001.** *Brucella suis*-impaired specific recognition of phagosomes by lysosomes due to phagosomal membrane modifications. *Infect Immun* 69, 486-493.

• **Naroeni, A., and Porte, F. 2002.** Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry and short-term survival of *Brucella suis* in murine macrophages. *Infect Immun* 70, 1640-1644.

• **Nicoletti, P. 1990.** Vaccination against *Brucella*. *Adv Biotechnol Processes* 13, 147-168.

• **Nielsen, K., and Yu, W.L. 2010.** Serological diagnosis of brucellosis. *Prilozi* 31, 65-89.

- **Nikaido, H. 2003.** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 593-656.

Ñ

O

- **O'Callaghan, D., Cazevieille, C., Allardet-Servent, A., Boschioli, M.L., Bourg, G., Foulongne, V., Frutos, P., Kulakov, Y., and Ramuz, M. 1999.** A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol Microbiol* 33, 1210-1220.
- **Odenbreit, S., Püls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W., and Haas, R. 2000.** Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 287, 1497-1500.
- **Ohtani, Y., Irie, T., Uekama, K., Fukunaga, K., and Pitha, J. 1989.** Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur J Biochem* 186, 17-22.
- **O.I.E. 2004.** Ovine epididymitis (*Brucella ovis*). In Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals Part 2, p 1-13. Edited by O.I.E.-W.O.F.A. Health.
- **Oliveira, S.C., and Splitter, G.A. 1995.** CD8+ type 1 CD44hi CD45 RBlo T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II-deficient mice. *Eur J Immunol* 25, 2551-2557.
- **Osterman, B., and Moriyón, I. 2006.** International Committee on Systematics of Prokaryotes, Subcommittee on the Taxonomy of *Brucella*. Minutes of the meeting, 17 September 2003, Pamplona, Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 1173-1175.

P

- **Paixão, T.A., Roux, C.M., den Hartigh, A.B., Sankaran-Walters, S., Dandekar, S., Santos, R.L., and Tsolis, R.M. 2009.** Establishment of systemic *Brucella melitensis* infection through the digestive tract requires urease, the type IV secretion system, and lipopolysaccharide O antigen. *Infect Immun* 77, 4197-4208.
- **Paolicchi, F. 2001.** Epididimitis de los carneros por *Brucella ovis*. In Documento del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, p 1-4. Spain.
- **Paquet, J.Y., Díaz, M.A., Genevrois, S., Grayon, M., Verger, J.M., de Bolle, X., Lakey, J.H., Letesson, J.J., and Cloeckaert, A. 2001.** Molecular, antigenic, and functional analyses of Omp2b porin size variants of *Brucella* spp. *J Bacteriol* 183, 4839-4847.
- **Parent, M.A., Goenka, R., Murphy, E., Levier, K., Carreiro, N., Golding, B., Ferguson, G., Roop, R.M., 2nd, Walker, G.C., and Baldwin, C.L. 2007.** *Brucella abortus* bacA mutant induces greater pro-inflammatory cytokines than the wild-type parent strain. *Microbes Infect* 9, 55-62.
- **Paschos, A., Patey, G., Sivanesan, D., Gao, C., Bayliss, R., Waksman, G., O'Callaghan, D., and Baron, C. 2006.** Dimerization and interactions of *Brucella suis* VirB8 with VirB4 and VirB10 are required for its biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7252-7257.
- **Paulsen, I.T., Seshadri, R., Nelson, K.E., Eisen, J.A., Heidelberg, J.F., Read, T.D., Dodson, R.J., Umayam, L., Brinkac, L.M., Beanan, M.J., Daugherty, S.C., Deboy, R.T., Durkin, A.S., Kolonay, J.F., Madupu, R., Nelson, W.C., Ayodeji, B., Kraul, M., Shetty, J., Malek, J., Van Aken, S.E., Riedmuller, S.,**

- Tettelin, H., Gill, S.R., White, O., Salzberg, S.L., Hoover, D.L., Lindler, L.E., Halling, S.M., Boyle, S.M., and Fraser, C.M. 2002.** The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13148-13153.
- **Pei, J., and Ficht, T.A. 2004.** *Brucella abortus* rough mutants are cytopathic for macrophages in culture. *Infect Immun* 72, 440-450.
 - **Pei, J., Turse, J.E., Wu, Q., and Ficht, T.A. 2006.** *Brucella abortus* rough mutants induce macrophage oncosis that requires bacterial protein synthesis and direct interaction with the macrophage. *Infect Immun* 74, 2667-2675.
 - **Pei, J., Turse, J.E., and Ficht, T.A. 2008a.** Evidence of *Brucella abortus* OPS dictating uptake and restricting NF-kappaB activation in murine macrophages. *Microbes Infect* 10, 582-590.
 - **Pei, J., Wu, Q., Kahl-McDonagh, M., and Ficht, T.A. 2008b.** Cytotoxicity in macrophages infected with rough *Brucella* mutants is type IV secretion system dependent. *Infect Immun* 76, 30-37.
 - **Peiser, L., and Gordon, S. 2001.** The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes Infect* 3, 149-159.
 - **Peiser, L., Mukhopadhyay, S., and Gordon, S. 2002a.** Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 14, 123-128.
 - **Peiser, L., De Winther, M.P., Makepeace, K., Hollinshead, M., Coull, P., Plested, J., Kodama, T., Moxon, E.R., and Gordon, S. 2002b.** The class A macrophage scavenger receptor is a major pattern recognition receptor for *Neisseria meningitidis* which is independent of lipopolysaccharide and not required for secretory responses. *Infect Immun* 70, 5346-5354.
 - **Peiser, L., Makepeace, K., Pluddemann, A., Savino, S., Wright, J.C., Pizza, M., Rappuoli, R., Moxon, E.R., and Gordon, S. 2006.** Identification of *Neisseria meningitidis* nonlipopolysaccharide ligands for class A macrophage scavenger receptor by using a novel assay. *Infect Immun* 74, 5191-5199.
 - **Pelkmans, L. 2005.** Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses. *Biochim Biophys Acta* 1746, 295-304.
 - **Pike, L.J. 2003.** Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res* 44, 655-667.
 - **Pizarro-Cerdá, J., Méresse, S., Parton, R.G., van der Goot, G., Sola-Landa, A., López-Goñi, I., Moreno, E., and Gorvel, J.P. 1998a.** *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun* 66, 5711-5724.
 - **Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E., Sanguedolce, V., Mege, J.L., and Gorvel, J.P. 1998b.** Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infect Immun* 66, 2387-2392.
 - **Pizarro-Cerdá, J., Desjardins, M., Moreno, E., Akira, S., and Gorvel, J.P. 1999.** Modulation of endocytosis in nuclear factor IL-6(-/-) macrophages is responsible for a high susceptibility to intracellular bacterial infection. *J Immunol* 162, 3519-3526.
 - **Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E., and Gorvel, J.P. 2000.** Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. *Microbes Infect* 2, 829-835.
 - **Platt, N., Suzuki, H., Kurihara, Y., Kodama, T., and Gordon, S. 1996.** Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro.

Proc Natl Acad Sci U S A 93, 12456-12460.

• **Polumuri, S.K., Toshchakov, V.Y., and Vogel, S.N. 2007.** Role of phosphatidylinositol-3 kinase in transcriptional regulation of TLR-induced IL-12 and IL-10 by Fc gamma receptor ligation in murine macrophages. *J Immunol* 179, 236-246.

• **Porte, F., Liutard, J.P., and Köhler, S. 1999.** Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect Immun* 67, 4041-4047.

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

• **Pugsley, A.P. 1993.** The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* 57, 50-108.

• **Puvanesarajah, V., Schell, F.M., Stacey, G., Douglas, C.J., and Nester, E.W. 1985.** Role for 2-linked-beta-D-glucan in the virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 164, 102-106.

Q

• **Qin, Q.M., Pei, J., Ancona, V., Shaw, B.D., Ficht, T.A., and de Figueiredo, P. 2008.** RNAi screen of endoplasmic reticulum-associated host factors reveals a role for IRE1alpha in supporting *Brucella* replication. *PLoS Pathog* 4, e1000110.

• **Quispe, R., Rivera, H., and Rosadio, R. 2002.** Cinética de la infección por *Brucella ovis* en carneros durante una época de empadre. *Rev Inv Vet* 13, 61-66.

R

• **Radhakrishnan, G.K., Yu, Q., Harms, J.S., and Splitter, G.A. 2009.** *Brucella* TIR Domain-containing Protein Mimics Properties of the Toll-like Receptor Adaptor Protein TIRAP. *J Biol Chem* 284, 9892-9898.

• **Rajashekara, G., Glasner, J.D., Glover, D.A., and Splitter, G.A. 2004.** Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. *J Bacteriol* 186, 5040-5051.

• **Rajashekara, G., Glover, D.A., Banai, M., O'Callaghan, D., and Splitter, G.A. 2006.** Attenuated bioluminescent *Brucella melitensis* mutants GR019 (*virB4*), GR024 (*galE*), and GR026 (BMEI1090-BMEI1091) confer protection in mice. *Infect Immun* 74, 2925-2936.

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

• **Rambow-Larsen, A.A., Rajashekara, G., Petersen, E., and Splitter, G. 2008.** Putative quorum-sensing regulator BlxR of *Brucella melitensis* regulates virulence factors including the type IV secretion system and flagella. *J Bacteriol* 190, 3274-3282.

• **Rambow-Larsen, A.A., Petersen, E.M., Gourley, C.R., and Splitter, G.A. 2009.** *Brucella* regulators: self-control in a hostile environment. *Trends Microbiol* 17, 371-377.

• **Rasool, O., Freer, E., Moreno, E., and Jarstrand, C. 1992.** Effect of *Brucella abortus* lipopolysaccharide on oxidative metabolism and lysozyme release by human neutrophils. *Infect Immun* 60, 1699-1702.

• **Ried, J.L., and Collmer, A. 1987.** An *nptI-sacB-sacR* cartridge for constructing directed, unmarked mutations in gram-negative bacteria by marker exchange- eviction mutagenesis. *Gene* 57,

239-246.

- **Riley, L.K., and Robertson, D.C. 1984.** Brucellacidal activity of human and bovine polymorphonuclear leukocyte granule extracts against smooth and rough strains of *Brucella abortus*. *Infect Immun* 46, 231-236.
 - **Rittig, M.G., Kaufmann, A., Robins, A., Shaw, B., Sprenger, H., Gemsa, D., Foulongne, V., Rouot, B., and Dornand, J. 2003.** Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of *Brucella* induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes. *J Leukoc Biol* 74, 1045-1055.
 - **Robertson, G.T., and Roop, R.M., Jr. 1999.** The *Brucella abortus* host factor I (HF-I) protein contributes to stress resistance during stationary phase and is a major determinant of virulence in mice. *Mol Microbiol* 34, 690-700.
 - **Roest, H.P., Bloemendaal, C.J., Wijffelman, C.A., and Lugtenberg, B.J. 1995a.** Isolation and characterization of *ropA* homologous genes from *Rhizobium leguminosarum* biovars *viciae* and *trifolii*. *J Bacteriol* 177, 4985-4991.
 - **Roest, H.P., Mulders, I.H., Wijffelman, C.A., and Lugtenberg, B.J. 1995b.** Isolation of *ropB*, a gene encoding a 22-kDa *Rhizobium leguminosarum* outer membrane protein. *Mol Plant Microbe Interact* 8, 576-583.
 - **Rojas, N., Freer, E., Weintraub, A., Ramírez, M., Lind, S., and Moreno, E. 1994.** Immunochemical identification of *Brucella abortus* lipopolysaccharide epitopes. *Clin Diagn Lab Immunol* 1, 206-213.
 - **Roop, R.M., 2nd, Robertson, G.T., Ferguson, G.P., Milford, L.E., Winkler, M.E., and Walker, G.C. 2002.** Seeking a niche: putative contributions of the *hfq* and *bacA* gene products to the successful adaptation of the brucellae to their intracellular home. *Vet Microbiol* 90, 349-363.
 - **Roop, R.M., 2nd, Bellaire, B.H., Valderas, M.W., and Cardelli, J.A. 2004.** Adaptation of the Brucellae to their intracellular niche. *Mol Microbiol* 52, 621-630.
 - **Roop, R.M., 2nd, Gaines, J.M., Anderson, E.S., Caswell, C.C., and Martin, D.W. 2009.** Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med Microbiol Immunol* 198, 221-238.
 - **Roset, M.S., Ciocchini, A.E., Ugalde, R.A., and Iñón de Iannino, N. 2004.** Molecular cloning and characterization of *cgt*, the *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan transporter gene, and its role in virulence. *Infect Immun* 72, 2263-2271.
 - **Roset, M.S., Ciocchini, A.E., Ugalde, R.A., and Iñón de Iannino, N. 2006.** The *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan virulence factor is substituted with O-ester-linked succinyl residues. *J Bacteriol* 188, 5003-5013.
 - **Rouot, B., Álvarez-Martínez, M.T., Marius, C., Menanteau, P., Guilloteau, L., Boigegrain, R.A., Zumbihl, R., O'Callaghan, D., Domke, N., and Baron, C. 2003.** Production of the type IV secretion system differs among *Brucella* species as revealed with VirB5- and VirB8-specific antisera. *Infect Immun* 71, 1075-1082.
- S**
- **Salcedo, S.P., Marchesini, M.I., Lelouard, H., Fugier, E., Jolly, G., Balor, S., Muller, A., Lapaque, N., Demaria, O., Alexopoulou, L., Comerci, D.J., Ugalde, R.A., Pierre, P., and Gorvel, J.P. 2008.** *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. *PLoS Pathog* 4, e21.
 - **Salhi, I., Boigegrain, R.A., Machold, J., Weise, C., Cloeckert, A., and Rouot, B. 2003.**

Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. *Infect Immun* 71, 4326-4332.

• **Samartino, L.E., and Enright, F.M. 1993.** Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 16, 95-101.

• **Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001.** Molecular cloning: a laboratory manual. (3rd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York.

• **Sánchez-Contreras, M., Bauer, W.D., Gao, M., Robinson, J.B., and Allan Downie, J. 2007.** Quorum-sensing regulation in rhizobia and its role in symbiotic interactions with legumes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 362, 1149-1163.

• **Sangari, F.J., Seoane, A., Rodríguez, M.C., Agüero, J., and García Lobo, J.M. 2007.** Characterization of the urease operon of *Brucella abortus* and assessment of its role in virulence of the bacterium. *Infect Immun* 75, 774-780.

• **Sangari, F.J., Cayón, A.M., Seoane, A., and García-Lobo, J.M. 2010.** *Brucella abortus ure2* region contains an acid-activated urea transporter and a nickel transport system. *BMC Microbiol* 10, 107.

• **Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.

• **Scholz, H.C., Hubalek, Z., Sedláček, I., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Melzer, F., Kämpfer, P., Neubauer, H., Cloeckaert, A., Maquart, M., Zygmunt, M.S., Whatmore, A.M., Falsen, E., Bahn, P., Göllner, C., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H.J., and Nöckler, K. 2008.** *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 375-382.

• **Scholz, H.C., Nöckler, K., Göllner, C., Bahn, P., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Kämpfer, P., Cloeckaert, A., Maquart, M., Zygmunt, M.S., Whatmore, A.M., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H.J., and De, B.K. 2010.** *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 801-808.

• **Schulein, R., and Dehio, C. 2002.** The VirB/VirD4 type IV secretion system of *Bartonella* is essential for establishing intraerythrocytic infection. *Mol Microbiol* 46, 1053-1067.

• **Schurig, G.G., Roop, R.M., 2nd, Bagchi, T., Boyle, S., Buhrman, D., and Sriranganathan, N. (1991).** Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol* 28, 171-188.

• **Schurig, G.G., Sriranganathan, N., and Corbel, M.J. 2002.** Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol* 90, 479-496.

• **Segal, G., Purcell, M., and Shuman, H.A. 1998.** Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1669-1674.

• **Sengupta, D., Koblansky, A., Gaines, J., Brown, T., West, A.P., Zhang, D., Nishikawa, T., Park, S.G., Roop, R.M., 2nd, and Ghosh, S. 2010.** Subversion of innate immune responses by *Brucella* through the targeted degradation of the TLR signaling adapter, MAL. *J Immunol* 184, 956-964.

• **Shepard, C.C. 1959.** Nonacid-fast bacteria and HeLa cells: their uptake and subsequent intracellular growth. *J Bacteriol* 77, 701-714.

• **Shin, J.S., and Abraham, S.N. 2001a.** Caveolae as portals of entry for microbes. *Microbes Infect* 3, 755-761.

- **Shin, J.S., and Abraham, S.N. 2001b.** Co-option of endocytic functions of cellular caveolae by pathogens. *Immunology* 102, 2-7.
- **Shin, S., and Roy, C.R. 2008.** Host cell processes that influence the intracellular survival of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* 10, 1209-1220.
- **Sieira, R., Comerci, D.J., Sánchez, D.O., and Ugalde, R.A. 2000.** A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *J Bacteriol* 182, 4849-4855.
- **Sieira, R., Arocena, G.M., Bukata, L., Comerci, D.J., and Ugalde, R.A. 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, 217-224.
- **Simons, K., and Toomre, D. 2000.** Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31-39.
- **Skalsky, K., Yahav, D., Bishara, J., Pitlik, S., Leibovici, L., and Paul, M. 2008.** Treatment of human brucellosis: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 336, 701-704.
- **Sohn, A.H., Probert, W.S., Glaser, C.A., Gupta, N., Bollen, A.W., Wong, J.D., Grace, E.M., and McDonald, W.C. 2003.** Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerg Infect Dis* 9, 485-488.
- **Sola-Landa, A., Pizarro-Cerdá, J., Grilló, M.J., Moreno, E., Moriyón, I., Blasco, J.M., Gorvel, J.P., and López-Goñi, I. 1998.** A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol Microbiol* 29, 125-138.
- **Sowa, B.A., Kelly, K.A., Ficht, T.A., Frey, M., and Adams, L.G. 1991.** SDS-soluble and peptidoglycan-bound proteins in the outer membrane-peptidoglycan complex of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol* 27, 351-369.
- **Spera, J.M., Ugalde, J.E., Mucci, J., Comerci, D.J., and Ugalde, R.A. 2006.** A B lymphocyte mitogen is a *Brucella abortus* virulence factor required for persistent infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16514-16519.
- **Starr, T., Ng, T.W., Wehrly, T.D., Knodler, L.A., and Celli, J. 2008.** *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic* 9, 678-694.
- **Struyvé, M., Moons, M., and Tommassen, J. 1991.** Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J Mol Biol* 218, 141-148.
- **Studier, F.W., and Moffatt, B.A. 1986.** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-130.
- **Sun, Y.H., Rolán, H.G., den Hartigh, A.B., Sondervan, D., and Tsolis, R.M. 2005.** *Brucella abortus virB12* is expressed during infection but is not an essential component of the type IV secretion system. *Infect Immun* 73, 6048-6054.
- **Surendran, N., Hiltbold, E.M., Heid, B., Sriranganathan, N., Boyle, S.M., Zimmerman, K.L., Makris, M.R., and Witonsky, S.G. 2010.** Live *Brucella abortus* rough vaccine strain RB51 stimulates enhanced innate immune response *in vitro* compared to rough vaccine strain RB51SOD and virulent smooth strain 2308 in murine bone marrow-derived dendritic cells. *Vet Microbiol*. doi:10.1016/j.vetmic.2010.06.001.

• Swartz, T.E., Tseng, T.S., Frederickson, M.A., Paris, G., Comerci, D.J., Rajashekara, G., Kim, J.G., Mudgett, M.B., Splitter, G.A., Ugalde, R.A., Goldbaum, F.A., Briggs, W.R., and Bogomolni, R.A. 2007. Blue-light-activated histidine kinases: two-component sensors in bacteria. *Science* 317, 1090-1093.

T

• Takahashi, N., Morita, M., and Imanaka, T. 2007. [Adrenoleukodystrophy: structure and function of ALDP, and intracellular behavior of mutant ALDP with naturally occurring missense mutations]. *Yakugaku Zasshi* 127, 163-172.

• Taminiau, B., Daykin, M., Swift, S., Boschirolì, M.L., Tibor, A., Lestrade, P., De Bolle, X., O'Callaghan, D., Williams, P., and Letesson, J.J. 2002. Identification of a quorum-sensing signal molecule in the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Infect Immun* 70, 3004-3011.

• Tatum, F.M., Detilleux, P.G., Sacks, J.M., and Halling, S.M. 1992. Construction of Cu-Zn superoxide dismutase deletion mutants of *Brucella abortus*: analysis of survival *in vitro* in epithelial and phagocytic cells and *in vivo* in mice. *Infect Immun* 60, 2863-2869.

• Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. 1992. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24, 145-149.

• Triantafilou, M., Miyake, K., Golenbock, D.T., and Triantafilou, K. 2002. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J Cell Sci* 115, 2603-2611.

• Tsolis, R.M., Seshadri, R., Santos, R.L., Sangari, F.J., Lobo, J.M., de Jong, M.F., Ren, Q., Myers, G., Brinkac, L.M., Nelson, W.C.,

Deboy, R.T., Angiuoli, S., Khouri, H., Dimitrov, G., Robinson, J.R., Mulligan, S., Walker, R.L., Elzer, P.E., Hassan, K.A., and Paulsen, I.T. 2009. Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. *PLoS One* 4, e5519.

U

• Ugalde, J.E., Czibener, C., Feldman, M.F., and Ugalde, R.A. 2000. Identification and characterization of the *Brucella abortus* phosphoglucomutase gene: role of lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication. *Infect Immun* 68, 5716-5723.

• Uzureau, S., Godefroid, M., Deschamps, C., Lemaire, J., De Bolle, X., and Letesson, J.J. 2007. Mutations of the quorum sensing-dependent regulator VjbR lead to drastic surface modifications in *Brucella melitensis*. *J Bacteriol* 189, 6035-6047.

• Uzureau, S., Lemaire, J., Delaive, E., Dieu, M., Gaigneaux, A., Raes, M., De Bolle, X., and Letesson, J.J. 2010. Global analysis of quorum sensing targets in the intracellular pathogen *Brucella melitensis* 16 M. *J Proteome Res* 9, 3200-3217.

V

• Valderas, M.W., Alcantara, R.B., Baumgartner, J.E., Bellaire, B.H., Robertson, G.T., Ng, W.L., Richardson, J.M., Winkler, M.E., and Roop, R.M., 2nd 2005. Role of HdeA in acid resistance and virulence in *Brucella abortus* 2308. *Vet Microbiol* 107, 307-312.

• Van Haastert, P.J., and Devreotes, P.N. 2004. Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 626-634.

• Velasco, J., Bengoechea, J.A., Brandenburg, K., Lindner, B., Seydel, U.,

- González, D., Zähringer, U., Moreno, E., and Moriyón, I. 2000.** *Brucella abortus* and its closest phylogenetic relative, *Ochrobactrum* spp., differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance. *Infect Immun* 68, 3210-3218.
- **Vemulapalli, R., He, Y., Buccolo, L.S., Boyle, S.M., Sriranganathan, N., and Schurig, G.G. 2000.** Complementation of *Brucella abortus* RB51 with a functional *wboA* gene results in O-antigen synthesis and enhanced vaccine efficacy but no change in rough phenotype and attenuation. *Infect Immun* 68, 3927-3932.
 - **Verger, J.M., Grimont, F., Grimont, P.A., and Grayon, M. 1985.** *Brucella* a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int J Syst Bacteriol* 35, 292-295.
 - **Verger, J.M., Grimont, F., Grimont, P.A., and Grayon, M. 1987.** Taxonomy of the genus *Brucella*. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 138, 235-238.
 - **Verstrete, D.R., Creasy, M.T., Caveney, N.T., Baldwin, C.L., Blab, M.W., and Winter, A.J. 1982.** Outer membrane proteins of *Brucella abortus*: isolation and characterization. *Infect Immun* 35, 979-989.
 - **Viadas, C., Rodríguez, M.C., Sangari, F.J., Gorvel, J.P., García-Lobo, J.M., and López-Goñi, I. 2010.** Transcriptome analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS two-component regulatory system. *PLoS One* 5, e10216.
 - **Vieira, O.V., Botelho, R.J., Rameh, L., Brachmann, S.M., Matsuo, T., Davidson, H.W., Schreiber, A., Backer, J.M., Cantley, L.C., and Grinstein, S. 2001.** Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *J Cell Biol* 155, 19-25.
 - **Vigliocco, A.M., Silva Paulo, P.S., Mestre, J., Briones, G.C., Draghi, G., Tossi, M., and Nielsen, K. 1997.** Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of ovine antibody to *Brucella ovis*. *Vet Microbiol* 54, 357-368.
 - **Vizcaíno, N., Cloeckert, A., Zygmunt, M.S., and Dubray, G. 1996.** Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis omp31* gene coding for an immunogenic major outer membrane protein. *Infect Immun* 64, 3744-3751.
 - **Vizcaíno, N., Verger, J.M., Grayon, M., Zygmunt, M.S., and Cloeckert, A. 1997.** DNA polymorphism at the *omp-31 locus* of *Brucella* spp.: evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers. *Microbiology* 143 (Pt 9), 2913-2921.
 - **Vizcaíno, N., Cloeckert, A., Zygmunt, M.S., and Fernández-Lago, L. 1999.** Molecular characterization of a *Brucella* species large DNA fragment deleted in *Brucella abortus* strains: evidence for a *locus* involved in the synthesis of a polysaccharide. *Infect Immun* 67, 2700-2712.
 - **Vizcaíno, N., Cloeckert, A., Verger, J., Grayon, M., and Fernández-Lago, L. 2000.** DNA polymorphism in the genus *Brucella*. *Microbes Infect* 2, 1089-1100.
 - **Vizcaíno, N., Cloeckert, A., Zygmunt, M.S., and Fernández-Lago, L. 2001a.** Characterization of a *Brucella* species 25-kilobase DNA fragment deleted from *Brucella abortus* reveals a large gene cluster related to the synthesis of a polysaccharide. *Infect Immun* 69, 6738-6748.
 - **Vizcaíno, N., Kittelberger, R., Cloeckert, A., Marín, C.M., and Fernández-Lago, L. 2001b.** Minor nucleotide substitutions in the *omp31* gene of *Brucella ovis* result in antigenic differences in the major outer membrane protein that it encodes compared to those of the other *Brucella* species. *Infect Immun* 69, 7020-7028.

- **Vizcaíno, N., Caro-Hernández, P., Cloeckaert, A., and Fernández-Lago, L. 2004.** DNA polymorphism in the omp25/omp31 family of *Brucella* spp.: identification of a 1.7-kb inversion in *Brucella cetaceae* and of a 15.1-kb genomic island, absent from *Brucella ovis*, related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide. *Microbes Infect* 6, 821-834.
- W**
- **Wagner, M.A., Eschenbrenner, M., Horn, T.A., Kraycer, J.A., Mujer, C.V., Hagius, S., Elzer, P., and DelVecchio, V.G. 2002.** Global analysis of the *Brucella melitensis* proteome: Identification of proteins expressed in laboratory-grown culture. *Proteomics* 2, 1047-1060.
 - **Wang, Y., Chen, Z., Qiao, F., Ying, T., Yuan, J., Zhong, Z., Zhou, L., Du, X., Wang, Z., Zhao, J., et al. 2009.** Comparative proteomics analyses reveal the *virB* of *B. melitensis* affects expression of intracellular survival related proteins. *PLoS One* 4, e5368.
 - **Wang, Y., Chen, Z., Qiao, F., Zhong, Z., Xu, J., Wang, Z., Du, X., Qu, Q., Yuan, J., Jia, L., et al. 2010.** The type IV secretion system affects the expression of Omp25/Omp31 and the outer membrane properties of *Brucella melitensis*. *FEMS Microbiol Lett* 303, 92-100.
 - **Wanke, M.M. 2004.** Canine brucellosis. *Anim Reprod Sci* 82-83, 195-207.
 - **Ward, J.E., Akiyoshi, D.E., Regier, D., Datta, A., Gordon, M.P., and Nester, E.W. 1988.** Characterization of the *virB* operon from an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *J Biol Chem* 263, 5804-5814.
 - **Watarai, M., Derre, I., Kirby, J., Gowney, J.D., Dietrich, W.F., and Isberg, R.R. 2001.** *Legionella pneumophila* is internalized by a macropinocytotic uptake pathway controlled by the Dot/Icm system and the mouse Lgn1 locus. *J Exp Med* 194, 1081-1096.
 - **Watarai, M., Makino, S., Fujii, Y., Okamoto, K., and Shirahata, T. 2002a.** Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell Microbiol* 4, 341-355.
 - **Watarai, M., Makino, S., Michikawa, M., Yanagisawa, K., Murakami, S., and Shirahata, T. 2002b.** Macrophage plasma membrane cholesterol contributes to *Brucella abortus* infection of mice. *Infect Immun* 70, 4818-4825.
 - **Watarai, M., Makino, S., and Shirahata, T. 2002c.** An essential virulence protein of *Brucella abortus*, VirB4, requires an intact nucleoside-triphosphate-binding domain. *Microbiology* 148, 1439-1446.
 - **Watarai, M., Kim, S., Erdenebaatar, J., Makino, S., Horiuchi, M., Shirahata, T., Sakaguchi, S., and Katamine, S. 2003.** Cellular prion protein promotes *Brucella* infection into macrophages. *J Exp Med* 198, 5-17.
 - **Waters, C.M., and Bassler, B.L. 2005.** Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 319-346.
 - **Weber, S.S., Ragaz, C., and Hilbi, H. 2009.** Pathogen trafficking pathways and host phosphoinositide metabolism. *Mol Microbiol* 71, 1341-1352.
 - **Weeks, J.N., Galindo, C.L., Drake, K.L., Adams, G.L., Garner, H.R., and Ficht, T.A. 2010.** *Brucella melitensis* VjbR and C12-HSL regulons: contributions of the N-dodecanoyl homoserine lactone signaling molecule and LuxR homologue VjbR to gene expression. *BMC Microbiol* 10, 167.
 - **Weiss, A.A., Johnson, F.D., and Burns, D.L. 1993.** Molecular characterization of an operon

required for pertussis toxin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2970-2974.

• **Weynants, V., Gilson, D., Cloeckart, A., Tibor, A., Denoel, P.A., Godfroid, F., Limet, J.N., and Letesson, J.J. 1997.** Characterization of smooth lipopolysaccharides and O polysaccharides of *Brucella* species by competition binding assays with monoclonal antibodies. *Infect Immun* 65, 1939-1943.

• **Wilson, G.S., and Miles, A.A. 1932.** The serological differentiation of smooth strains of the *Brucella* group. *Brit J Exptl Pathol* 13, 1-13.

X

Y

• **Yuan, Q., Carle, A., Gao, C., Sivanesan, D., Aly, K.A., Höppner, C., Krall, L., Domke, N., and Baron, C. 2005.** Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems. *J Biol Chem* 280, 26349-26359.

Z

• **Zähringer, U., Knirel, Y.A., Lindner, B., Helbig, J.H., Sonesson, A., Marre, R., and Rietschel, E.T. 1995.** The lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 (strain Philadelphia 1): chemical structure and biological significance. *Prog Clin Biol Res* 392, 113-139.

• **Zähringer, U., Lindner, B., Knirel, Y.A., van den Akker, W.M., Hiestand, R., Heine, H., and Dehio, C. 2004.** Structure and biological activity of the short-chain lipopolysaccharide from *Bartonella henselae* ATCC 49882T. *J Biol Chem* 279, 21046-21054.

• **Zahrl, D., Wagner, M., Bischof, K., Bayer, M., Zavec, B., Beranek, A., Ruckenstein, C., Zarfel, G.E., and Koraimann, G. 2005.**

Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems. *Microbiology* 151, 3455-3467.

• **Zhan, Y., and Cheers, C. 1995.** Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection. *Infect Immun* 63, 1387-1390.

• **Zhan, Y., and Cheers, C. 1998.** Control of IL-12 and IFN-gamma production in response to live or dead bacteria by TNF and other factors. *J Immunol* 161, 1447-1453.

• **Zhong, Z., Wang, Y., Qiao, F., Wang, Z., Du, X., Xu, J., Zhao, J., Qu, Q., Dong, S., Sun, Y., Huang, L., Huang, K., and Chen, Z. 2009.** Cytotoxicity of *Brucella* smooth strains for macrophages is mediated by increased secretion of the type IV secretion system. *Microbiology* 155, 3392-3402.

• **Zygmunt, M.S., Hagius, S.D., Walker, J.V., and Elzer, P.H. 2006.** Identification of *Brucella melitensis* 16M genes required for bacterial survival in the caprine host. *Microbes Infect* 8, 2849-2854.

• **Zygmunt, M.S., Blasco, J.M., Letesson, J.J., Cloeckart, A., and Moriyón, I. 2009.** DNA polymorphism analysis of *Brucella* lipopolysaccharide genes reveals marked differences in O-polysaccharide biosynthetic genes between smooth and rough *Brucella* species and novel species-specific markers. *BMC Microbiol* 9, 92.

*Publicaciones derivadas
del trabajo de tesis*



Short communication

Importance of the Omp25/Omp31 family in the internalization and intracellular replication of virulent *B. ovis* in murine macrophages and HeLa cells

Ana I. Martín-Martín^a, Paola Caro-Hernández^a, Antonio Orduña^b,
Nieves Vizcaíno^a, Luis Fernández-Lago^{a,*}

^a Departamento de Microbiología y Genética, Edificio Departamental, Universidad de Salamanca,
Plaza Doctores de la Reina s/n, 37007 Salamanca, Spain

^b Microbiología/Unidad de Investigación, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Avda. Ramón y Cajal 3, 47005 Valladolid, Spain

Received 14 November 2007; accepted 22 February 2008
Available online 10 March 2008

Abstract

The role of the outer membrane proteins of the Omp25/Omp31 family in invasiveness and intracellular survival of virulent *B. ovis* in phagocytes was analyzed. The absence of Omp25d or Omp22 in *B. ovis* abolished its invasive capacity in HeLa cells and reduced it in J774.A1 cells. Additionally, in J774.A1 cells, the $\Delta omp25d$ mutant was unable to multiply, whereas the $\Delta omp22$ mutant was cleared at 24 h post-infection. These findings demonstrate that Omp25d and Omp22 are essential for the invasion and survival of *B. ovis* inside host cells, and justify the strong attenuation in virulence of the $\Delta omp25d$ and $\Delta omp22$ mutants.

© 2008 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: *Brucella ovis*; Omp25/Omp31 family; Invasiveness; Intracellular replication

1. Introduction

Microorganisms of the genus *Brucella* are intracellular parasites and are the etiological agents of brucellosis, an infectious disease affecting many mammalian species, including humans. *Brucella* strains are smooth or rough, depending on the presence or absence of O-polysaccharide chains in the lipopolysaccharide (LPS) molecule respectively. The O-chains mask other surface antigens such as outer membrane proteins (OMPs) [1], and they are necessary for the full virulence of smooth strains [2]. However, naturally rough *Brucella* species (*B. ovis* and *B. canis*) are virulent in their respective preferred hosts (rams and dogs, respectively) and in laboratory animals. In these rough strains, OMPs are surface-exposed [1] and could play an important role in virulence. The *Brucella* spp.

Omp25/Omp31 family is formed by seven homologous OMPs [3,4]. Recently [5], the inactivation in virulent *B. ovis* PA of the genes coding for the five OMPs of this family, anticipated to be located in its outer membrane [4], enabled it to be demonstrated that the absence of Omp25d or Omp22 proteins leads to a striking decrease in the virulence of *B. ovis* PA in mice [5]. In the present work, we analyze the role of the Omp25/Omp31 family in the invasive capacity and intracellular replication of *B. ovis* PA inside phagocytic cells.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

Virulent *B. ovis* PA and *B. abortus* 2308 strains were obtained from the INRA *Brucella* Culture Collection, Nouzilly (BCCN), France. Mutant strains were derived from parental *B. ovis* PA and were obtained previously by individually inactivating the genes coding for the Omp31, Omp25, Omp25c,

* Corresponding author. Tel.: +34 923 294 532; fax: +34 923 224 876.
E-mail address: lrlago@usal.es (L. Fernández-Lago).

Omp25d and Omp22 proteins [5]. *B. ovis* mutants were complemented in trans with the corresponding wild-type genes [5] but complemented mutants were not included in this study since, as discussed previously [5], the probability of a polar effect of the mutations on downstream genes is very low. Moreover, restoring OMPs levels identical to those found in the parental strain has proven often unsuccessful and was neither achieved in this case [5]. *B. ovis* and *B. abortus* 2308 strains were cultured at 37 °C in a 10% CO₂ atmosphere. They were grown in tryptic soy broth (TSB; Difco Laboratories, Detroit, MI) or on tryptic soy agar (TSA; Difco Laboratories), both supplemented with 0.3% yeast extract (YE; Difco Laboratories) and 5% horse serum (HS; GIBCO-BRL Life Technologies, Germany) (TSB-YE-HS and TSA-YE-HS). Kanamycin (50 µg/ml) was also added to the culture media used for the propagation of the *B. ovis* mutant strains.

2.2. Cell culture and infection of HeLa and J774.A1 cells

Monolayers of human epithelial HeLa cells (ATCC CCL-2) and macrophage-like J774.A1 cells (DSMZ ACC170) were cultured in 24-well plates (10⁵ cells per well) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% foetal bovine serum and 4 mM L-glutamine (complete medium), and were incubated at 37 °C for 4 h with a bacterial suspension (multiplicity of infection [MOI] = 200 and 400 colony-forming units (CFU) per cell for J774.A1 and HeLa cells, respectively). After three washes with the same medium, the infected cells were incubated in 1 ml of complete medium supplemented with 100 µg of gentamicin/ml for 1 h to kill the extracellular bacteria. Then, the monolayers were washed with complete medium to remove gentamicin and were cultured in the same medium without the antibiotic. At several intervals post-infection (p.i.), cells were washed three times with the same medium and lysed in 0.1% Triton X-100 for 5 min. The number of viable intracellular bacteria (CFU per well) was determined by plating serial 10-fold dilutions onto TSA-YE-HS. All these assays were performed in quadruplicate wells. Results were expressed as the mean ± SD (*n* = 4) of the log CFU/ml.

2.3. LDH assays to measure cytotoxicity

HeLa and J774.A1 cells were seeded in 24-well plates and infected as described above. The lactate dehydrogenase (LDH)

activities of the supernatants obtained at different times p.i. were measured using a CytoTox 96 non-radioactive cytotoxicity assay (Promega Corp., Madison, Wis.) according to the manufacturer's instructions. These assays were performed in quadruplicate wells. Culture supernatants obtained from non-infected cells were used as controls.

2.4. Statistical analyses

Statistical comparisons between means were performed using analysis of variance, and the levels of significance of the differences were determined with the post-hoc Fisher's protected least significant differences test.

3. Results

3.1. *B. ovis* PA is not cytotoxic for macrophages and HeLa cells

In order to check the cytotoxicity of *B. ovis* PA for cultures of HeLa and J774.A1 cells, the LDH activities of supernatants obtained at different times p.i., measured with a CytoTox 96 non-radioactive cytotoxicity assay, were investigated. Under our experimental conditions (MOI of 200 and 400, respectively) and 10% FCS, no significant differences were found in the LDH activities of supernatants obtained from HeLa or J774.A1 cells infected with the *B. ovis* PA or *B. abortus* 2308 strains (Table 1). Moreover, we only observed a weak increase in LDH activity in supernatants obtained from cells infected with *B. ovis* PA or *B. abortus* 2308 and in supernatants obtained from uninfected cells (Table 1). This indicates that *B. ovis* PA and *B. abortus* 2308 strains do not exert cytotoxic effects on cultured HeLa or J774.A1 cells.

3.2. Role of the proteins of the Omp25/Omp31 family in the invasive capacity of *B. ovis* PA

The invasive capacity of the *B. ovis* PA and *B. ovis* PA mutant strains was assayed in HeLa and J774.A1 cell cultures. Fig. 1A indicates that the Δ omp25d and Δ omp22 mutant strains were unable to penetrate HeLa cells, while the invasive capacity of the Δ omp31, Δ omp25 and Δ omp25c mutant strains was similar to that of the parental *B. ovis* PA strain. In contrast, when J774.A1 cells were used (Fig. 1B) a significant

Table 1
Evaluation of *B. ovis* PA and *B. abortus* 2308 cytotoxicity for cultured HeLa and J774.A1 cells

Infection	LDH release (OD at 490 nm) ^a					
	HeLa cells – hours post-infection			J774.A1 cells – hours post-infection		
	4	24	48	4	24	48
<i>B. ovis</i> PA	0.176 ± 0.01*	0.329 ± 0.08*	0.654 ± 0.01*	0.104 ± 0.03*	0.240 ± 0.01*	0.826 ± 0.07*
<i>B. abortus</i> 2308	0.153 ± 0.02	0.213 ± 0.03	0.788 ± 0.03	0.069 ± 0.00	0.237 ± 0.02	1.070 ± 0.05
Noninfected (NI)	0.172 ± 0.01	0.232 ± 0.03	0.596 ± 0.16	0.054 ± 0.04	0.097 ± 0.02	0.681 ± 0.08

^a The LDH released by the infected and noninfected cells was detected by a CytoTox 96 non-radioactive cytotoxicity assay. Values are means ± SD (*n* = 4). Abbreviations and Symbols: OD, optical density; *Not significant compared to *B. abortus* 2308 infection.

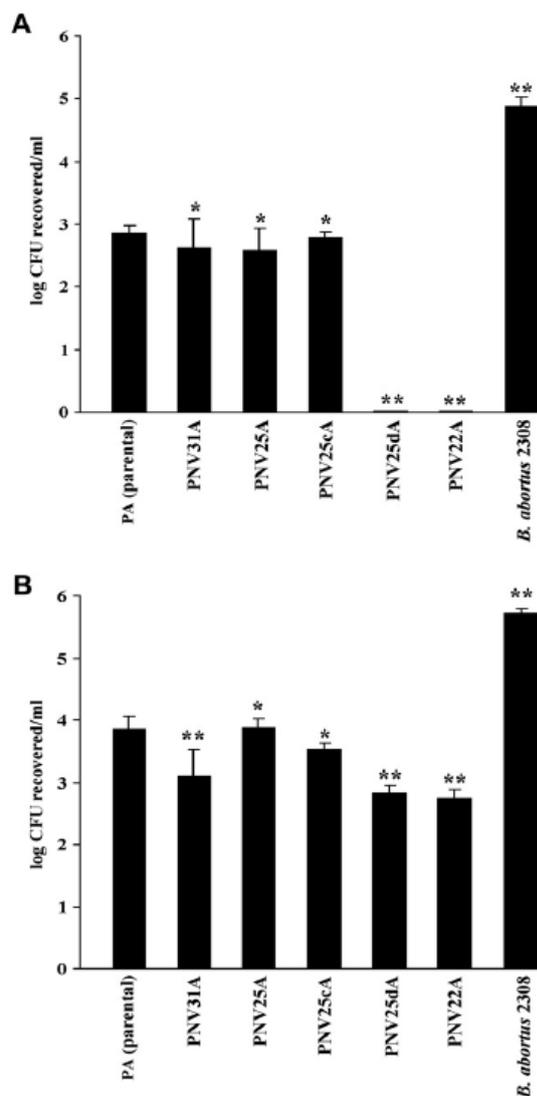


Fig. 1. Evaluation of the invasive capacity of parental *B. ovis* PA and of the mutant strains with the *omp31*, *omp25*, *omp25c*, *omp25d* and *omp22* genes inactivated in HeLa cells (A) and J774.A1 cells (B). Means \pm SD (error bars) ($n = 4$) are shown. Symbols: * p not significant as compared to parental strain (PA); ** $p < 0.0001$ when compared to the parental strain.

($p < 0.0001$) reduction in the profile of invasion was observed for the mutants $\Delta omp25d$ (91.53%), $\Delta omp22$ (92.61%) and $\Delta omp31$ (71.95%) with respect to the parental *B. ovis* PA strain. In contrast, no significant differences were found in the invasive capacity of the $\Delta omp25$ and $\Delta omp25c$ mutants as compared with the parental strain (Fig. 1B). These observations point to the importance of the Omp25d and Omp22 proteins in the internalization of *B. ovis* PA in both professional and non-professional phagocytes.

3.3. Role of the proteins of the Omp25/Omp31 family in the intracellular multiplication of *B. ovis* PA

The possible role of the proteins of the Omp25/Omp31 family in the capacity of *B. ovis* PA to replicate intracellularly in HeLa and J774.A1 cells was also investigated. In HeLa cells the $\Delta omp31$, $\Delta omp25$ and $\Delta omp25c$ mutant strains showed intracellular survival kinetics similar to that displayed by the parental strain (Fig. 2A), with the observation of an increase in recoverable bacteria at 48 h p.i. of 1.78, 0.61 and 1.35 log units, respectively. These results indicate that the absence of the Omp31, Omp25 and Omp25c proteins of the *B. ovis* PA OM did not affect the intracellular multiplication rate of the bacteria. In J774.A1 cells (Fig. 2B), the $\Delta omp31$, $\Delta omp25$ and $\Delta omp25c$ mutant strains multiplied actively, following kinetics similar to that displayed by the parental strain and showing an increase in recoverable bacteria at 72 h p.i. of 2.48, 2.27 and 2.45 log units, respectively. The absence of Omp25d from the OM of *B. ovis* PA did not significantly affect the viability of the bacteria. However, it did negatively affect their intracellular multiplication capacity, since no significant increase in the number of intracellular bacteria was observed at 72 h p.i. (Fig. 2B). In contrast, the absence of Omp22 from the OM of *B. ovis* PA dramatically reduced the intracellular multiplication capacity of the microorganism, which was completely cleared at 24 h p.i. (Fig. 2B).

4. Discussion

Rough mutants of *B. abortus* [6] and *B. melitensis* [7] are cytotoxic for the J774 murine macrophage cell line. The cytotoxicity is macrophage-specific and resembles oncosis and necrosis, but not apoptosis [6,8]. In contrast, our current study demonstrates that *B. ovis* PA, a natural rough strain, is not cytotoxic for cultured HeLa or J774.A1 cells (Table 1), and that the bacterium multiplies actively inside these cells (Fig. 2). These observations reveal that the rough character of *B. ovis* PA is not associated with the cytotoxicity of the bacteria for macrophages. Nevertheless, since the type-four secretion system (T4SS) is essential for macrophage cytotoxic cell death induced by rough mutants of *Brucella* spp. [9], the functionality of this secretion system in *B. ovis* PA and its possible involvement in the virulence of the microorganism should be further investigated.

The presence of the Omp25d and Omp22 proteins on the OM of *B. ovis* PA is necessary for the proper internalization of the bacterium, in the case of both professional and non-professional phagocytes (Fig. 1). It is possible that in HeLa cells the Omp25d and Omp22 proteins might be necessary for the zipper energy-dependent process through which *Brucellae* are internalized into epithelial cells and fibroblasts [10,11]. Additionally, the Omp25d, Omp22 and Omp31 proteins may also be involved in the raft-dependent and/or raft-independent mechanisms by means of which *B. ovis* PA can be internalized in macrophages [2,12–14]. However, together with these proteins the possible participation in this process of other cell components, such as cyclic beta-1,2-glucan, that interact

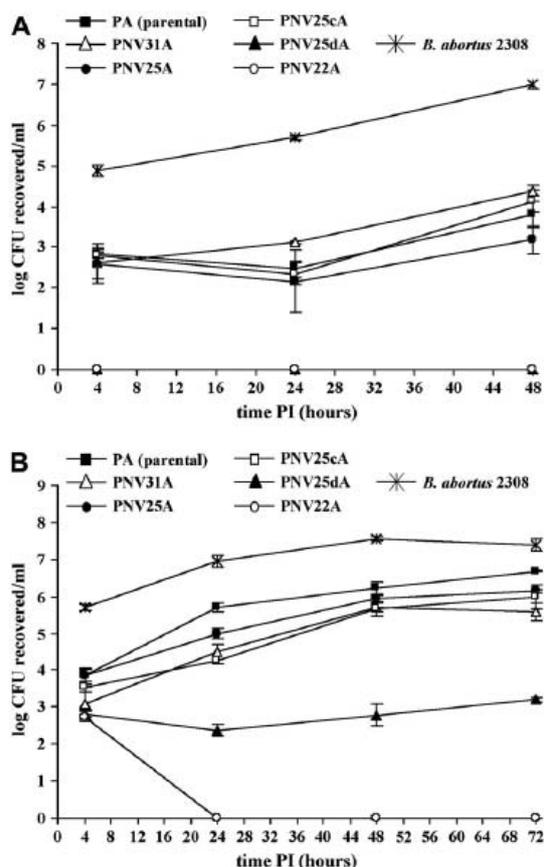


Fig. 2. Evaluation of the capacity of intracellular multiplication in HeLa (A) and J774.A1 cells (B) of parental *B. ovis* PA and the mutant strains with the *omp31*, *omp25*, *omp25c*, *omp25d* and *omp22* genes inactivated. Results are expressed as means \pm SD ($n = 4$) of the log CFU/ml.

with lipid rafts during the phagocytosis process and are required for the intracellular survival of *Brucella* cannot be ruled out [15,16]. Additionally, this significant decrease in the invasive capacity of the $\Delta omp25d$ and $\Delta omp22$ mutants determines an extracellular location of both mutants strains during the course of the infectious process. Under these conditions, these mutants strains are possibly more susceptible to the immune mechanisms of the infected host, which may account for the marked reduction in virulence observed for both in mice [5]. Investigations aimed at elucidating these aspects are currently under way at our laboratory.

The absence of the Omp25d protein in the OM of *B. ovis* PA did not significantly affect the viability of the bacterium inside phagocytes, although it did negatively affect its intracellular multiplication capacity (Fig. 2B). In contrast, the absence of Omp22 in the OM of *B. ovis* PA dramatically reduced the intracellular multiplication capacity of the microorganism, which was completely cleared after 24 h p.i. (Fig. 2B). Previous results obtained by us using a BALB/c

mouse infection model revealed that both mutants show a marked reduction in their virulence with respect to the parental strain [5]. Accordingly, the intracellular multiplication capacity is also a determinant factor in the virulence of *B. ovis* PA. Nevertheless, the $\Delta omp25d$ and $\Delta omp22$ mutant strains did not show significant deficits in the properties of the OM that would account, for example, for the greater increase in susceptibility to killing by oxygen-dependent bactericidal mechanisms, such as the hydrogen peroxide of phagocytes [5]. Thus, in the absence of O-chains, considered a key molecule for *Brucella* invasion and development by impairing or delaying phagosome–lysosome fusion and thus allowing the expression of genuine virulence genes involved in building a definitive replication niche [2], the Omp25d, and especially the Omp22, proteins may be required for the establishment of the replicative phagosome or “brucellosome” necessary for the proper intracellular multiplication of *B. ovis* PA [17–19].

The results reported here reveal the fundamental role of the Omp25d and Omp22 proteins in the invasive capacity and intracellular multiplication of *B. ovis* PA in both HeLa and J774.A1 cells making both proteins relevant in the virulence of the microorganism. Additionally, since both proteins are highly conserved in all *Brucella* species, with almost identical amino acid sequences, [4] future investigations will be necessary to check the possibility of a role for them in the virulence of other *Brucella* species.

Acknowledgements

This work was supported by project PI050091 from the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain. Ana I. Martín-Martín was financed by project PI050091.

References

- [1] R.A. Bowden, A. Cloeckaert, M.S. Zygmunt, S. Bernard, G. Dubray, Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry, *Infect. Immun.* 63 (1995) 3945–3952.
- [2] F. Porte, A. Naroeni, S. Ouahrani-Bettache, J.P. Liautard, Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome–lysosome fusion in murine macrophages, *Infect. Immun.* 71 (2003) 1481–1490.
- [3] I. Salhi, R.A. Boegegrain, J. Machold, C. Weise, A. Cloeckaert, B. Rouot, Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp., *Infect. Immun.* 71 (2003) 4326–4332.
- [4] N. Vizcaino, P. Caro-Hernandez, A. Cloeckaert, L. Fernández-Lago, DNA polymorphism in the *omp25/omp31* family of *Brucella* spp.: identification of a 1.7-kb inversion in *Brucella cetaceae* and of a 15.1-kb genomic island, absent from *Brucella ovis*, related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide, *Microbes Infect.* 6 (2004) 821–834.
- [5] P. Caro-Hernandez, L. Fernández-Lago, M.J. de Miguel, A.I. Martín-Martín, A. Cloeckaert, M.J. Grillo, N. Vizcaino, Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*, *Infect. Immun.* 75 (2007) 4050–4061.
- [6] J. Pei, T.A. Ficht, *Brucella abortus* rough mutants are cytopathic for macrophages in culture, *Infect. Immun.* 72 (2004) 440–450.
- [7] C.M. Fernandez-Prada, E.B. Zelazowska, M. Nikolich, T.L. Hadfield, R.M. Roop, G.L. Robertson, D.L. Hoover, Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O-Polysaccharide

- inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis, *Infect. Immun.* 71 (2003) 2110–2119.
- [8] J. Pei, J.E. Turse, Q. Wu, T.A. Ficht, *Brucella abortus* rough mutants induce macrophage oncosis that requires bacterial protein synthesis and direct interaction with the macrophage, *Infect. Immun.* 74 (2006) 2667–2675.
- [9] J. Pei, Q. Wu, M. Kahl-McDonagh, T.A. Ficht, Cytotoxicity in macrophage infected with rough *Brucella* is type IV secretion system-dependent, *Infect. Immun.* 76 (2008) 30–37.
- [10] P.G. Dettileux, B.L. Deyoe, N.F. Cheville, Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro, *Infect. Immun.* 58 (1990) 2320–2328.
- [11] P.G. Dettileux, B.L. Deyoe, N.F. Cheville, Effect of endocytic and metabolic inhibitors on the internalization and intracellular growth of *Brucella abortus* in Vero cells, *Am. J. Vet. Res.* 52 (1991) 1658–1664.
- [12] A. Naroeni, F. Porte, Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry and short-term survival of *Brucella suis* in murine macrophages, *Infect. Immun.* 70 (2002) 1640–1644.
- [13] M. Watarai, S. Makino, M. Michikawa, K. Yanagisawa, S. Murakami, T. Shirahata, Macrophage plasma membrane cholesterol contributes to *Brucella abortus* infection of mice, *Infect. Immun.* 70 (2002) 4818–4825.
- [14] S. Kim, M. Watarai, S. Makino, T. Shirahata, Membrane sorting during swimming internalization of *Brucella* is required for phagosome trafficking decisions, *Microb. Pathog.* 33 (2002) 225–237.
- [15] B. Arellano-Reynoso, N. Lapaque, S. Salcedo, G. Briones, A.E. Ciocchini, R. Ugalde, E. Moreno, I. Moriyon, J.P. Gorvel, Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival, *Nat. Immunol.* 6 (2005) 618–625.
- [16] G. Briones, I.M. delnon, A. Roset, Vigliocco, P.S. Paulo, R.A. Ugalde, *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells, *Infect. Immun.* 69 (2001) 4528–4535.
- [17] F. Porte, J.P. Liautard, S. Kohler, Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages, *Infect. Immun.* 67 (1999) 4041–4047.
- [18] J. Celli, C. de Chastellier, D.M. Franchini, J. Pizarro-Cerda, E. Moreno, J.P. Gorvel, *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum, *J. Exp. Med.* 198 (2003) 545–556.
- [19] S. Kohler, V. Foulongne, S. Ouahrani-Bettache, G. Bourg, J. Teyssier, M. Ramuz, J.P. Liautard, The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99 (2002) 15711–15716.



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

Analysis of the occurrence and distribution of the Omp25/Omp31 family of surface proteins in the six classical *Brucella* species

Ana I. Martín-Martín^a, Paola Caro-Hernández^a, Pilar Sancho^a, Carmen Tejedor^a, Axel Cloeckert^b, Luis Fernández-Lago^a, Nieves Vizcaíno^{a,*}

^a Departamento de Microbiología y Genética, Edificio Departamental, Universidad de Salamanca, Plaza Doctores de la Reina s/n, 37007 Salamanca, Spain

^b INRA, UR1282, Infectiologie Animale et Sante Publique, IASP, Nouzilly F-37380, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 September 2008

Received in revised form 1 December 2008

Accepted 2 December 2008

Keywords:

Brucella

Omp25/Omp31 family

Outer membrane protein

Vaccine

RNA

ABSTRACT

Members of the Omp25/Omp31 family of surface proteins were previously shown to participate in the virulence of some *Brucella* species and a different distribution of the seven proteins of this family among species could be related to the difference in pathogenicity and host preference they exhibit. Accordingly, in this work we have analyzed the expression of the genes coding for the Omp25/Omp31 family in the six classical *Brucella* species and a set of *B. ovis* mutant strains with each *omp* gene inactivated. Immunoblot of whole-cell lysates with antibodies raised against the purified recombinant outer membrane proteins (OMPs) did not show the simultaneous presence of the seven OMPs in any of the *Brucella* strains studied, but different Omp25/Omp31 profiles were detected, in our experimental conditions, between the *Brucella* strains representative of the six classical species. Transcripts for *omp31*, *omp25* and *omp25c* were, in general, the most abundant of the family and some hits were found in *B. ovis* for a posttranscriptional regulation mechanism and for a compensatory mechanism increasing the synthesis of a protein to compensate for the absence of another one. Finally, the potential interest of Omp25c and Omp31b as subcellular vaccines, considering their occurrence in the *Brucella* strains studied and their antigenic relatedness with other proteins of the family, is discussed.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Brucellosis, an infectious disease caused by bacteria of the genus *Brucella*, can affect many mammal species and is transmissible to humans, thus having an important socio-economic impact. The six classical *Brucella* species (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* and *B. neotomae*) (Osterman and Moriyón, 2006) infect terrestrial mammals with a marked host preference and *B. ceti*, *B. pinnipedialis* and *B. microti* have recently been validly published to include *Brucella* strains preferentially infecting cetaceans, seals and

common voles, respectively (Foster et al., 2007; Scholz et al., 2008).

The *Brucella* species show high DNA–DNA relatedness (Verger et al., 1985) but display differences in pathogenicity and host preference which might be related, at least in part, with differences in the composition of the outer membrane (OM), structure involved in the interaction of gram-negative bacteria with the surrounding environment. The *Brucella* Omp25/Omp31 family is constituted by seven homologous OM proteins (OMPs) (Salhi et al., 2003; Vizcaíno et al., 2004) some of which are involved in virulence (Caro-Hernández et al., 2007; Edmonds et al., 2002; Martín-Martín et al., 2008) and whose encoding genes exhibit DNA polymorphism among the brucellae (Vizcaíno et al., 2004). Omp31 and Omp25 are major OMPs with a well-studied distribution in *Brucella* (Cloeckert

* Corresponding author. Tel.: +34 923 29 45 32; fax: +34 923 22 48 76.
E-mail address: vizcaino@usal.es (N. Vizcaíno).

et al., 2002) but regarding the other members of the family, although they have been detected in at least one *Brucella* species (Al Dahouk et al., 2008; Cloeckaert et al., 2002; Connolly et al., 2006; Eschenbrenner et al., 2006; Guzmán-Verri et al., 2002; Salhi et al., 2003; Wagner et al., 2002), little is known about their occurrence among the brucellae.

Accordingly, the aim of this work was to analyze the expression of the genes coding for the seven members of the Omp25/Omp31 family in the six classical *Brucella* species.

2. Materials and methods

2.1. Plasmids and bacterial strains

Plasmids (Table 1) were propagated in *Escherichia coli* JM109 or BL21(DE3) cultured in Luria-Bertani medium supplemented with ampicillin (Amp).

For construction of pNV31b-com (containing *omp31b* of *B. abortus* 544 under the control of the *lacZ* promoter),

omp31b was PCR-amplified with primers 31b-F2 and 31b-R2 (Table 2) and cloned into pGEM-T Easy in the same direction to *lacZ*. The *SpeI*-*SacI* insert was finally cloned into *SpeI*/*SacII*-digested pBBR1MCS-4 (Kovach et al., 1995).

Brucella strains (Table 1) – propagated in tryptic soy agar supplemented with 0.3% yeast extract and 5% horse serum (Caro-Hernández et al., 2007) – were incubated at 37 °C (44 h for *B. melitensis* Rev.1 and *B. ovis* and 20 h for the other strains, in order to reach a growth level starting to be clearly visible and similar for all the strains) and a 10% CO₂ atmosphere was used for *B. ovis* and *B. abortus*. Culture medium for *B. ovis* PA-derived strains was supplemented with Amp, kanamycin (Kan) or both depending on their antibiotic resistance pattern (Table 1).

Recombinant plasmid pNV31b-com (see above) was introduced in *B. ovis* PA by electroporation, as previously reported (Vizcaíno et al., 2004), to obtain *B. ovis* PNV31b-com. The other genetically-modified *B. ovis* strains were

Table 1
Brucella strains and plasmids used in this work.

<i>Brucella</i> strain or plasmid	Origin ^a	Relevant characteristics
<i>Brucella</i> strains		
<i>B. melitensis</i>		
Rev 1	BCCN V4a	Smooth vaccine
B115	BCCN R19	Rough strain
<i>B. abortus</i>		
544 ^b	BCCN R4	Smooth strain
2308	BCCN R10	Smooth strain
B19	BCCN V1	Smooth vaccine
RB51	BCCN V5	Rough vaccine
45/20	BCCN V2	Rough strain
<i>B. suis</i> 1330 ^b	BCCN R12	Smooth strain
<i>B. canis</i> RM6/66 ^b	BCCN R18	Rough strain
<i>B. neotomae</i> 5K33 ^b	BCCN R16	Smooth strain
<i>B. ovis</i>		
PA (parental)	BCCN 76-250	Virulent parental rough strain for mutants listed below
PNV31A	Caro-Hernández et al. (2007)	<i>omp31</i> inactivated. Kan ^r
PNV31A-com	Caro-Hernández et al. (2007)	Complemented PNV31A ^c
PNV25A	Caro-Hernández et al. (2007)	<i>omp25</i> inactivated. Kan ^r
PNV25A-com	Caro-Hernández et al. (2007)	Complemented PNV25A ^c
PNV25cA	Caro-Hernández et al. (2007)	<i>omp25c</i> inactivated. Kan ^r
PNV25cA-com	Caro-Hernández et al. (2007)	Complemented PNV25cA ^c
PNV25dA	Caro-Hernández et al. (2007)	<i>omp25d</i> inactivated. Kan ^r
PNV25dA-com	Caro-Hernández et al. (2007)	Complemented PNV25dA ^c
PNV22A	Caro-Hernández et al. (2007)	<i>omp22</i> inactivated. Kan ^r
PNV22A-com	Caro-Hernández et al. (2007)	Complemented PNV22A ^c
PNV31b-com	This work	PA complemented with <i>omp31b</i> from <i>B. abortus</i> . Amp ^r
PNV998-10	Vizcaíno et al. (2004)	PA complemented with pNV998-10 (plasmid with <i>omp25b</i> in a 15 kb DNA fragment of <i>B. melitensis</i> 16M absent in <i>B. ovis</i>). Kan ^r
Plasmids		
pGEM-T Easy	Promega	PCR-cloning vector. Amp ^r
pUC19	Fermentas	Cloning vector. Amp ^r
pBBR1MCS-4	Kovach et al. (1995)	Cloning vector replicating in <i>Brucella</i> . Amp ^r
pTrcHis A and B	Invitrogen	Cloning vectors for protein synthesis and purification. Amp ^r
pNV31b-com	This work	<i>omp31b</i> of <i>B. abortus</i> 544 cloned in pBBR1MCS-4
pNV31b304	This work	Mature ^d <i>omp31b</i> in pTrcHis B
pNV25b305	This work	Mature ^d <i>omp25b</i> in pTrcHis A
pNV25c306	This work	Mature ^d <i>omp25c</i> in pTrcHis A
pNV25d303	This work	Mature ^d <i>omp25d</i> in pTrcHis A
pNV22303	This work	Mature ^d <i>omp22</i> in pTrcHis A

^a BCCN: *Brucella* Culture Collection, Nouzilly, France.

^b Reference strains.

^c Mutant strains complemented with the corresponding wild-type *omp* gene cloned into pBBR1MCS-4 (Kan and Amp resistant).

^d Gene region corresponding to the mature OMP without the signal peptide.

Please cite this article in press as: Martín-Martín, A.I., et al., Analysis of the occurrence and distribution of the Omp25/Omp31 family of surface proteins in the six classical *Brucella* species. Vet. Microbiol. (2009), doi:10.1016/j.vetmic.2008.12.003

Table 2
DNA primers used in this work.

Primer name	Nucleotide sequence ^a	Target gene (size in bp) ^b
Construction of pNV31b-com		
31b-F2	GTG ACA GAC ATT GGA GCC	<i>omp31b</i> (1036)
31b-R2	CTC CAG CAA GCC ATT CGC	<i>omp31b</i>
Construction of plasmids for the purification of the recombinant <i>Brucella</i> spp. OMPs		
31bMAT-BgIII	<u>AGA TCT</u> GCC GAC ATC ATC GTT GCT	<i>omp31b</i> (925)
31bR2-SfuI	<u>TTC GAA</u> CTC CAG CAA GCC ATT CGC	<i>omp31b</i>
25bcMAT-BamHI	<u>GGA TCC</u> GCT GAC GCC GTC ATT GAA	<i>omp25b</i> (742) and <i>omp25c</i> (703)
25bR-SfuI	<u>TTC GAA</u> CGC CAT CGC ATT CCG TTG	<i>omp25b</i>
25cR-SfuI	<u>TTC GAA</u> TAT TGG GTG AGG ATT GAC	<i>omp25c</i>
25dMAT-BamHI	<u>GGA TCC</u> GCG GAT GCC ATT GTT GCG	<i>omp25d</i> (749)
25dR-SfuI	<u>TTC GAA</u> CTG AAG GGT AAA TGC GGC	<i>omp25d</i>
22MAT-F	GCC GAC ATG ATG GGA AGG	<i>omp22</i> (710)
22R	GTT TGA ATC CCG GCT GTT	<i>omp22</i>
RT-PCR		
31RT-F	GAC GTG GTT GTT TCT GA	<i>omp31</i> (563)
31RT-R	GTG TAG AGG TAT TCC GA	<i>omp31</i>
31bRT-F	TCC GTC GCA ATG TTG TT	<i>omp31b</i> (633)
31bMRT-F	GTT CAG GCC GGT TAT AA	<i>omp31b</i> (408)
31bRT-R	GTC GGT GTA GAG GTA TT	<i>omp31b</i>
25RT-F	GTC TCT CGT AAT CGT CT	<i>omp25</i> (504)
25RT-R	ATG TTG TCC GTC AGC TT	<i>omp25</i>
25bRT-F	TCG CTT CTT CTT GCA TC	<i>omp25b</i> (677)
25bRT-R	AAT CCG ATG TCG TGT GT	<i>omp25b</i>
25cRT-F	TTC TTT TTG CAT CGA CCG	<i>omp25c</i> (607)
25cRT-R	TCG TCG AAG CCG TAA TCC	<i>omp25c</i>
25dRT-F	AAT CTA CTT GGC GCT TC	<i>omp25d</i> (595)
25dRT-R	TGC CGT AAT CCG TGT AGC	<i>omp25d</i>
22RT-F	TCA AGC GTT CTA TCA CC	<i>omp22</i> (588)
22RT-R	TGT TAC GCT GTT CGA TG	<i>omp22</i>
IF1-F	ATG GCG AAA GAA GAA GTC CT	<i>IF-1</i> (214)
IF1-R	TGA AGC GGT AGG TGA TGC GG	<i>IF-1</i>

^a Restriction enzymes specific sites in DNA primers are underlined.

^b Identification numbers of the genes in the *B. suis* 1330 published genome sequence (GenBank accession numbers AE014291 and AE014292 for chromosome I and II, respectively) are: BRA0423 (*omp31*), BR1622 (*omp31b*), BR0701 (*omp25*), BR0971 (*omp25b*), BR0119 (*omp25c*), BR0118 (*omp25d*), BR1284 (*omp22*) and BR0249 (*IF-1*). The size of the PCR-amplified fragments (according to the *B. suis* 1330 genome sequence) is given in the corresponding forward primer line.

previously described (Caro-Hernández et al., 2007; Vizcaíno et al., 2004).

2.2. Primers and nucleic acid techniques

Primers (Table 2) (Roche, Mannheim, Germany) were chosen according to the published *Brucella* genome sequences. PCR and DNA sequencing were previously detailed (Caro-Hernández et al., 2007).

RNA was extracted (from 1 ml of an aqueous bacterial suspension concentrated to obtain an O.D._{600 nm} of 13) following a RNeasy midi kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) modified protocol (Bellaire et al., 2003) and quantified spectrophotometrically.

RNA (1 µg) was treated with RQ1 DNase (Promega) and subjected to cDNA synthesis with the transcriptor first strand cDNA synthesis kit (Roche) using the provided random hexamers as primers for reverse transcriptase (RT). The subsequent PCR reactions were performed using 1 µl of cDNA as template and the specific primers for each target *omp* gene (Table 2). Products amplified by RT-PCR were visualized after electrophoresis in 0.8% agarose gels. Absence of DNA contamination in RNA samples was confirmed with identical reactions but omitting the reverse transcriptase (no amplification products were

detected with these reactions). A control RT-PCR reaction with the *IF-1* gene – constitutively expressed in *Brucella* (Eskra et al., 2001) – was also settled.

2.3. Production of anti-OMP immune sera

First, the region corresponding to each mature protein of the Omp25/Omp31 family was PCR-amplified, using the pair of primers described in Table 2, from a *Brucella* strain bearing a functional gene (Vizcaíno et al., 2004): *B. ovis* PA (*omp25c*, *omp25d* and *omp22*), *B. melitensis* 16M (*omp25b*) or *B. abortus* 544 (*omp31b*). The primers – except those used for *omp22* – were designed to introduce a 5'-terminal *Bgl*II or *Bam*HI site and a 3'-terminal *Sfu*I site in the amplified gene. The amplicons were ligated into pGEM-T Easy, cleaved with the corresponding restriction enzymes (*Bgl*II/*Sfu*I or *Bam*HI/*Sfu*I) and inserted into pTrcHisB or pTrcHisA (Table 1). For *omp22* higher levels of the recombinant protein were obtained following another cloning strategy. The gene *omp22* of *B. ovis* PA was amplified with primers 22MAT-F and 22R, cloned into pGEM-T Easy in the same orientation to *lacZ*, then into *Sph*I/*Sal*I-digested pUC19 and finally, into *Bam*HI/*Hind*III-digested pTrcHisA.

The resulting plasmids (Table 1) – showing the expected nucleotide sequence – were introduced by

Please cite this article in press as: Martín-Martín, A.I., et al., Analysis of the occurrence and distribution of the Omp25/Omp31 family of surface proteins in the six classical *Brucella* species. Vet. Microbiol. (2009), doi:10.1016/j.vetmic.2008.12.003

transformation into *E. coli* JM109 and BL21(DE3) where the expression of each recombinant gene was induced for 6 h with IPTG (Guilloteau et al., 1999) to evaluate, by SDS-PAGE and Commassie blue staining, the level of synthesis of each recombinant protein. Strain BL21(DE3) provided better results than JM109 except for *omp25b*.

The recombinant fusion proteins (having a 5'-histidine tag) were purified (from *E. coli* cells incubated for 6 h in the presence of IPTG) with the ProBond Purification System (Invitrogen) under denaturing conditions. The protein fractions – dialyzed against deionised water – were analyzed by Coomassie blue staining following SDS-PAGE and quantified with the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, California, USA).

Female New Zealand albino rabbits were inoculated subcutaneously – three times at weekly intervals – with 50 µg of sonicated purified protein in Freund's complete (first immunization) or incomplete (second and third immunization) adjuvant. Seven days after the last injection, blood was taken by heart puncture to obtain the serum.

2.4. Immunological techniques

Rabbit sera (1/50 dilution) and monoclonal antibodies (MAbs) A59/05F01/C09 (C09) – specific for the *Brucella* spp. Omp25 protein – and A59/10F09/G10 (G10) and A01/08H06/G02 (G02) – reacting in Western blot with the *B. melitensis* and *B. ovis* Omp31 protein, respectively – were used (Cloeckert et al., 1990; Vizcaíno et al., 2001). SDS-PAGE and Western blot with whole-cell lysates (bacterial suspensions concentrated to an O.D._{600 nm} of 20, diluted 1/2 in Laemmli sample buffer and boiled for 10 min) or purified recombinant proteins were previously described (Vizcaíno et al., 2001). The low range SDS-PAGE standard

(Bio-Rad) was used to determine, as instructed by the manufacturer, the molecular mass of the proteins of the Omp25/Omp31 family. The proteins transferred to the nitrocellulose membrane following SDS-PAGE were stained with Ponceau S (Sigma, St. Louis, MO, USA) to verify the accuracy of transfer and the total protein charge (which was similar for all the whole-cell lysates of the different *Brucella* strains). Goat anti-rabbit and anti-mouse IgG-peroxidase conjugates (Sigma) were used and the blots were never stripped and reprobed. When the nitrocellulose membrane was cut into strips for independent development, their realignment (to reproduce the original nitrocellulose membrane) was performed before analyzing the results.

For adsorption of the anti-Omp22 serum, purified Omp22 was submitted to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose. The intense Omp22 band on the membrane was cut, saturated with skim milk and incubated overnight with the serum diluted 1/200 (Vizcaíno et al., 2001). Binding of antibodies to Omp22 was checked as for Western blot. The procedure was repeated until complete removal of the anti-Omp22 antibodies. Unadsorbed control serum was incubated with saturated nitrocellulose under the same conditions. Other anti-OMP sera were similarly adsorbed with the corresponding OMP.

3. Results

3.1. Transcription of the genes coding for the Omp25/Omp31 family in the genus *Brucella*

Transcription of *omp25b* in *B. ovis* PA (lacking *omp25b* (Vizcaíno et al., 2004)) was not detected by RT-PCR while transcripts for the other genes of the family were clearly evidenced (Fig. 1). The *B. ovis* PA genetically-modified

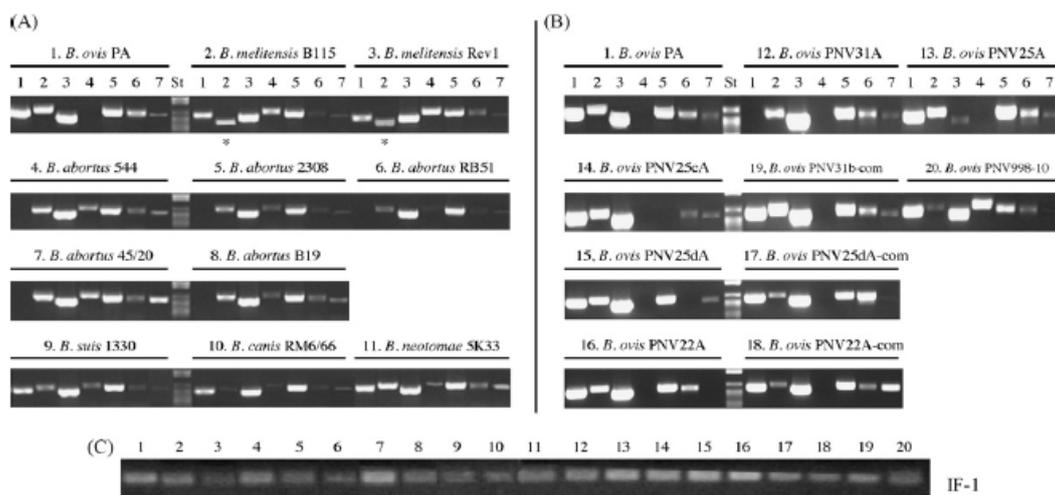


Fig. 1. RT-PCR for *omp31* (lane 1), *omp31b* (lane 2), *omp25* (lane 3), *omp25b* (lane 4), *omp25c* (lane 5), *omp25d* (lane 6) and *omp22* (lane 7) in different *Brucella* species (A) and in the *B. ovis* mutants with these genes impaired (B). RT-PCR of *omp31b* in lane 2 was performed with primers 31bRT-F and 31bRT-R except in *B. melitensis* strains (*) where transcripts were only detected with the pair of primers 31bMRT-F/31bRT-R. St, DNA molecular size marker VI (Roche). Control reactions with constitutively expressed *IF-1* (Eskra et al., 2001) are shown in panel C, where lane numbers correspond to strain numbers in panels A and B. Control RT-PCR reactions without RT gave no amplification product.

Please cite this article in press as: Martín-Martín, A.I., et al., Analysis of the occurrence and distribution of the Omp25/Omp31 family of surface proteins in the six classical *Brucella* species. Vet. Microbiol. (2009), doi:10.1016/j.vetmic.2008.12.003

strains (Fig. 1B) gave the expected RT-PCR pattern when compared to the parental strain: (i) absence of transcript for the corresponding inactivated *omp* gene, with the exception of the unexpected *omp25* faint band in the $\Delta omp25$ mutant (although these transcripts should not have a ribosome binding site and the synthesis of Omp25 was not detected in the $\Delta omp25$ mutant by reactivity with monoclonal or polyclonal antibodies [Fig. 3 and data not shown]), (ii) over-transcription after *in trans* complementation of the mutant with the wild-type gene – only tested for strains PNV25dA-com and PNV22A-com (complemented $\Delta omp25d$ and $\Delta omp22$ mutants, respectively), (iii) over-transcription of *omp31b* in strain PNV31b-com (parental strain complemented with undefective *omp31b* from *B. abortus*), and (iv) detection of *omp25b* transcripts in strain PNV998-10 (parental strain complemented with a DNA fragment containing *omp25b*).

Regarding the other *Brucella* species (Fig. 1A), the *omp31*-specific RT-PCR reaction (lane 1) was positive in all the strains except in *B. abortus* strains (lacking *omp31* (Vizcaíno et al., 1999, 1997)). Transcripts for *omp31b* (lane 2) were detected in all the strains, although in *B. melitensis* strains – having a DNA deletion affecting the 5' end of *omp31b* (García-Yoldi et al., 2005; Vizcaíno et al., 2004) – amplification was exclusively obtained with the pair of primers 31BRT-R/31BMRT-F. Transcripts for *omp25* and *omp25b* (lanes 3 and 4) were evidenced in all the *Brucella* strains tested (except *omp25b* in *B. ovis* as described above). An intense DNA band revealed the presence of *omp25c* transcripts (lane 5) in all the strains, while the RT-PCR reactions for *omp25d* and *omp22* gave less-intense bands (lanes 6 and 7).

3.2. Immunological detection of the Omp25/Omp31 family proteins in the genus *Brucella*

3.2.1. Omp31 and Omp31b

Occurrence of Omp31 in the genus *Brucella* has been previously studied (Caro-Hernández et al., 2007; Vizcaíno et al., 1997) and was included in this study as a reference for detection of Omp31b.

The characteristic multiple band pattern for *B. ovis* Omp31 (Caro-Hernández et al., 2007; Vizcaíno et al., 2001) in Western blot (with two major bands of 28.8 and

30.2 kDa) was revealed with the anti-Omp31 MAb G02 in all the *B. ovis* PA strains (representative profile in Fig. 2, lane 2), except the $\Delta omp31$ mutant (not shown, Caro-Hernández et al., 2007). The other *Brucella* strains, except those belonging to the species *B. abortus* (lacking *omp31* (Vizcaíno et al., 1999, 1997)), reacted with the anti-Omp31 MAb G10 (Fig. 2).

With the anti-Omp31b polyclonal antibodies (Fig. 2), all the *B. ovis* PA-derived strains, except the $\Delta omp31$ mutant (lane 5), revealed the same band pattern developed by the anti-Omp31 MAb (lanes 1–9). Accordingly and since the absence of Omp31b is expected in *B. ovis* considering DNA data (Vizcaíno et al., 2004), it is inferred that the reactivity of the anti-Omp31b serum with *B. ovis* is due to a cross-serological reaction with Omp31 and not to a specific reaction with Omp31b. Additionally, *B. ovis*-PNV31b-com (parental strain complemented *in trans* with undefective *omp31b* from *B. abortus*) displays an additional multiple band profile with a higher molecular mass (starting at about 31 kDa) (lane 3), which should correspond to over-synthesized Omp31b.

Regarding the reactivity of the other *Brucella* species with the anti-Omp31b serum (Fig. 2), *B. abortus* strains – lacking Omp31 (Vizcaíno et al., 1999, 1997) and not reacting with the anti-Omp31 MAb (see representative results in lane 21) – revealed a smeared protein band of about 31 kDa (lanes 20 and 22–26), also detected in *B. neotomae* and *B. suis* (lanes 16 and 18), probably corresponding to Omp31b. Cross-reactivity of the anti-Omp31b serum with Omp31 was also observed with the two latter strains since this serum also developed the protein band revealed with MAb G10 (lanes 16–19), as it also did with *B. melitensis* and *B. canis* (lanes 12–15). However, as expected according to the nucleotide sequence of *omp31b* in *B. melitensis* and *B. canis* (Vizcaíno et al., 2004), Omp31b was not detected in these strains.

3.2.2. Omp25 and Omp25b

Detection by immunoblotting of Omp25 in the genus *Brucella* has been previously performed (Caro-Hernández et al., 2007; Cloeckart et al., 1996) and was included in this study as a reference for the identification of the other homologous proteins. As expected (Caro-Hernández et al., 2007; Cloeckart et al., 1996), detection of Omp25 with

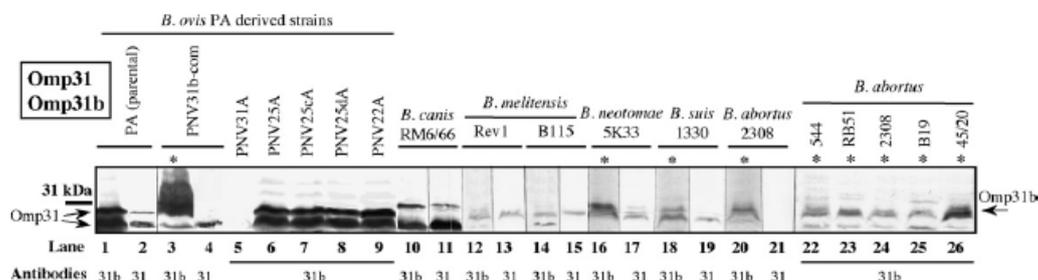


Fig. 2. Western blot with whole-cell extracts of different *Brucella* strains and anti-Omp31 MABs or polyclonal antibodies obtained against recombinant Omp31b (31b). MAB G02 was used for *B. ovis* strains while MAB G10 was used for the other *Brucella* species. Positions of Omp31 and Omp31b are marked with arrows and strains where Omp31b seems to be detected are identified with an asterisk. The anti-Omp31b serum was used at dilution 1/500 with *B. ovis* PNV31b-com (lane 3) instead of dilution 1/50 as employed for the other strains. A line on the left shows the position of the closest protein of the molecular mass standard.

Please cite this article in press as: Martín-Martín, A.I., et al., Analysis of the occurrence and distribution of the Omp25/Omp31 family of surface proteins in the six classical *Brucella* species. Vet. Microbiol. (2009), doi:10.1016/j.vetmic.2008.12.003

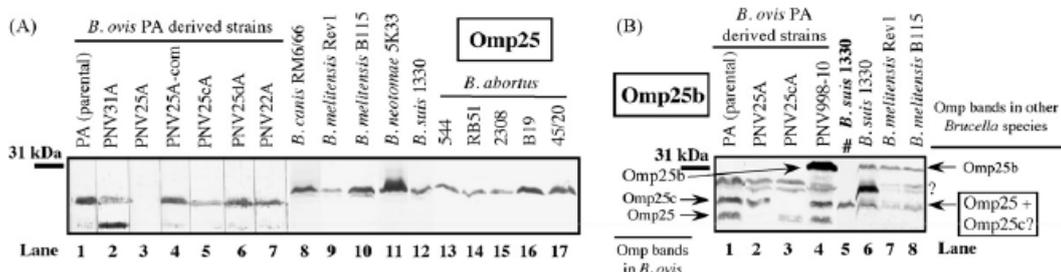


Fig. 3. Western blot with whole-cell extracts of different *Brucella* strains and anti-Omp25 MAb C09 (A) or polyclonal antibodies obtained against recombinant Omp25b (B). Strains not represented in panel B did not reveal the Omp25b band with the anti-Omp25b antiserum. Positions of Omp25, Omp25b (confirmed by adsorption of the serum with purified Omp25b as described in Section 2.4) and Omp25c are marked with arrows in panel B. Symbols: #, lane developed with the anti-Omp25 MAb C09; ?, doubtful or non-identified protein bands. A line on the left shows the position of the closest protein of the molecular mass standard.

MAb C09 only failed with the Δ omp25 mutant of *B. ovis* PA (Fig. 3A). In *B. ovis*, two bands corresponding to Omp25 were detected: the major band exhibiting an apparent molecular mass (25.9 kDa) lower than that of Omp25 of the other *Brucella* species (27.5 kDa) and the minor band (more intense in strain PNV31A) of 22.3 kDa.

Omp25b was not detected in *B. ovis* (lacking *omp25b* due to a DNA deletion (Vizcaíno et al., 2004)) except in strain PNV998-10 (Fig. 3B, lanes 1–4) (complemented *in trans* with the deleted DNA (Vizcaíno et al., 2004)) where Omp25b appeared as a protein band of 32.1 kDa (Fig. 3B, lane 4) also developed with the anti-Omp25c serum (not shown). Regarding the other species, the Omp25b band –

disappearing after adsorption of the anti-Omp25b serum with purified recombinant Omp25b (not shown) – was only detected in *B. suis* and *B. melitensis* (Fig. 3B, lanes 6–8, and data not shown). A couple of bands located under Omp25b, revealed with the anti-Omp25b serum in several *Brucella* strains (Fig. 3B), could not be associated to any member of the Omp25/Omp31 family.

The anti-Omp25b serum (Fig. 3B) cross-reacted with Omp25 and Omp25c, according to its reactivity with parental *B. ovis* PA and with the Δ omp25 and Δ omp25c mutant strains (lanes 1–3), the reactivity of the anti-Omp25 MAb C09 (lane 5 and data not shown) and the results obtained with the anti-Omp25c serum (Fig. 4A).

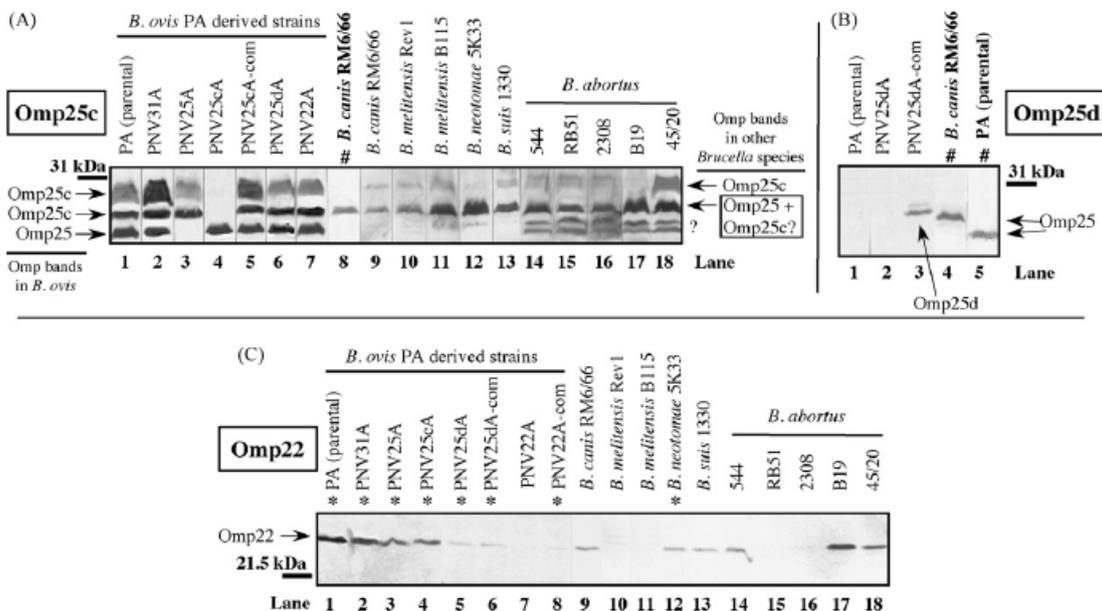


Fig. 4. Western blot with whole-cell extracts of different *Brucella* strains and polyclonal antibodies obtained against recombinant Omp25c (A), Omp25d (B) or Omp22 (C). Strains not represented in panel B did not react with the anti-Omp25d antiserum. Positions of the proteins of the Omp25/Omp31 family are marked with arrows. Symbols: #, lane developed with anti-Omp25 MAb C09; ?, doubtful or non-identified protein bands; *, strains where the presence of Omp22 was confirmed. The anti-Omp22 serum was used at dilution 1/10 with *B. ovis* PNV22A-com instead of dilution 1/50 as employed for the other strains (the 1/10 dilution gave with the parental strain and the Δ omp22 mutant the same results shown in panel C, lanes 1 and 7, respectively). A line shows in each panel the position of the closest protein of the molecular mass standard.

Please cite this article in press as: Martín-Martín, A.I., et al., Analysis of the occurrence and distribution of the Omp25/Omp31 family of surface proteins in the six classical *Brucella* species. Vet. Microbiol. (2009), doi:10.1016/j.vetmic.2008.12.003

3.2.3. *Omp25c*, *Omp25d* and *Omp22*

The anti-*Omp25c* serum (Fig. 4A) developed two intense bands of 27.5 and 29.5–30.5 kDa in *B. ovis* (except in the $\Delta omp25c$ mutant), the smeared upper band being more intensely marked in strains PNV31A and PNV25cA-com (lanes 1–7). This serum also cross-reacted with the *B. ovis* *Omp25* protein, since it reacted with a protein developed with all the *B. ovis* strains except with the $\Delta omp25$ mutant (lanes 1–7). A smeared protein band of 29.5–30.5 kDa and a protein of 27.5 kDa were also detected in the other *Brucella* species but since *Omp25* has in these species the same apparent molecular mass than the lower *Omp25c* band (see representative reactivity of *B. canis* with MAb C09 in lane 8) it is difficult to elucidate whether the 27.5 kDa band is constituted by *Omp25* or by both *Omp25* and *Omp25c*. Two additional bands of lower molecular mass and unknown nature were also revealed in *B. abortus* strains (lanes 14–18).

Contrarily, *Omp25d* was only detected in *B. ovis* PNV25dA-com (Fig. 4B and data not shown) – strain where *omp25d* is over-transcribed in comparison with the parental strain (Fig. 1B) – as a protein of approximately 27.9 kDa whose reactivity with the anti-*Omp25d* serum disappeared after adsorption of the serum with purified *Omp25d* (not shown).

The *Omp22* protein band – disappearing after adsorption of the anti-*Omp22* serum with recombinant *Omp22* (not shown) – was detected in all the *B. ovis* strains except in the $\Delta omp22$ mutant (Fig. 4C, lanes 1–8). However, *Omp22* in the complemented $\Delta omp22$ mutant (*B. ovis* PNV22A-com) was only detected, as a very faint band, with a more concentrated specific antiserum (1/10 dilution). Surprisingly, low levels of *Omp22* were evidenced in the *B. ovis* PA $\Delta omp25d$ mutant and its corresponding complemented strain (lanes 5 and 6). A protein band showing a molecular mass similar to *Omp22* was observed in *B. canis*, *B. neotomae* and in *B. abortus* strains 544, B19 and 45/20. However, adsorption of the anti-*Omp22* serum with purified *Omp22* only removed its reactivity with *B. neotomae*.

4. Discussion

Expression in *Brucella* spp. of the seven genes coding for the OMPs of the *Omp25/Omp31* family was evaluated in this work by RT-PCR and immunological detection of each protein with specific antibodies. In spite of the fact that direct detection of the proteins has not been performed, this study provides for the first time evidences for the synthesis of *Omp31b* in *B. neotomae*, of *Omp25c* in *B. ovis*, *B. canis* and *B. neotomae* and of *Omp22* in *B. ovis* and *B. neotomae*.

The simultaneous presence of the seven members of the family, which according to DNA data would only be feasible in *B. suis* and *B. neotomae* (Vizcaíno et al., 2004), was evidenced in none of the strains analyzed, although the limitation of the immunological detection must be considered. In the experimental conditions used, the smooth or rough phenotype does not seem to influence the OM composition regarding the *Omp25/Omp31* family (see similar profiles of *B. abortus* 2308 and its derivative

rough mutant *B. abortus* RB51) but a different distribution of the surface proteins of the *Omp25/Omp31* family was observed between the *Brucella* species (Figs. 2–4), which could contribute to the divergence in pathogenicity and host preference they exhibit. An apparent increase of *Omp25c* was observed in the $\Delta omp31$ mutant of *B. ovis* PA, when compared to the parental strain and to the other mutants derived from the same strain (Fig. 4A), which could be related to a compensatory mechanism necessary to restore the balance of the OM after removal of major *Omp31*. A compensatory mechanism has been reported for the orthologous Hbp family of *Bartonella quintana* and for the *Omp25/Omp31* family in *B. suis* 1330 (Minnick et al., 2003; Salhi et al., 2003), and a tight balance of its members was revealed essential for the stability of the OM in *B. ovis* PA (Caro-Hernández et al., 2007).

Several results described in this work agree with previous DNA polymorphism observations suggesting the absence of some members of the *Omp25/Omp31* family in several species (Vizcaíno et al., 2004) and justify why some proteins were not detected even in cases where specific transcripts were evidenced. Thus, defects in or deletion of the encoding genes (Cloeckert et al., 1996; Vizcaíno et al., 2004, 1999, 1997) explain the unsuccessful detection of *Omp31* in *B. abortus*, of *Omp31b* in *B. melitensis*, *B. canis* and *B. ovis*, of *Omp25b* in *B. abortus*, *B. canis* and *B. ovis* and the lower molecular mass exhibited by *Omp25* in *B. ovis* (Figs. 2–4 and data not shown).

The highly conserved sequence of *omp25c* in the genus (Vizcaíno et al., 2004) and the abundance of its specific transcripts (Fig. 1) justify the detection of *Omp25c* in all the strains analyzed (Fig. 4A). Moreover, *Omp25c* seems to be in *B. ovis* one of the most abundant of the family in the conditions of our experiments (Figs. 2–4). On the contrary and in agreement with studies failing in the detection of *Omp25d* in *B. melitensis*, *B. abortus* or *B. suis* by N-terminal microsequencing or mass spectrometry (Connolly et al., 2006; Eschenbrenner et al., 2006; Guzmán-Verri et al., 2002; Lamontagne et al., 2007; Salhi et al., 2003; Wagner et al., 2002), *Omp25d* was not detected in any of the wild-type *Brucella* strains. Accordingly, it is probable that the protein co-migrating with *Omp25* in *B. suis* and suggested to be *Omp25d* by Salhi et al. (2003) does not actually correspond to *Omp25d* but to the lower molecular mass band of *Omp25c* – that in *B. suis* would co-migrate with *Omp25* (Fig. 4A). The detection of this *Omp25c* band was possible in *B. ovis* (Fig. 4A) because the apparent molecular mass of *Omp25* in *B. ovis* is lower than in the other brucellae (Figs. 3A and 4A) (Cloeckert et al., 1996). A posttranscriptional control mechanism – related to either the translation or the protein turnover rates – could be on the basis of the lack of detection of *Omp25d* in *Brucella* spp., since *omp25d* is highly conserved in the genus, does not show sequence defects, has a clear ribosome binding site (Vizcaíno et al., 2004), and is transcribed in all the strains analyzed (Fig. 1). Such mechanism could also explain why, in spite of the clear detection of *Omp22* in *B. ovis* PA (Fig. 4C), a marked over-transcription of *omp22* in strain PNV22A-com ($\Delta omp22$ mutant complemented with wild-type *omp22*) (Fig. 1B) leads to almost undetectable levels of *Omp22* in our conditions (Fig. 4C).

Omp22 was only detected in *B. ovis* and *B. neotomae* while in other *Brucella* strains a protein band of the same molecular mass could not be assigned to Omp22 after adsorption of the anti-Omp22 serum with purified Omp22 (Fig. 4C). However, the presence of Omp22 in *B. canis* RM6/66, *B. suis* 1330 and *B. abortus* strains 544, B19 and 45/20 cannot be completely excluded since the protein/s of molecular mass similar to Omp22 and reacting with the anti-Omp22 serum would prevent the accurate identification of Omp22. Omp22 was not detected in *B. abortus* 2308 (Fig. 4C, lane 16), in contrast to previous works evidencing Omp22 in this strain after mass spectrometry studies with OM fragments or cell envelop extracts (Connolly et al., 2006; Guzmán-Verri et al., 2002). These differences might be related, in addition to the detection techniques, to the different culture conditions or the fact that we have used whole-cell extracts.

The attenuation in virulence demonstrated for *B. ovis*-PNV25dA (Caro-Hernández et al., 2007) and its defects in invasiveness and intracellular multiplication in professional and non-professional phagocytes (Martín-Martín et al., 2008) would support the synthesis of Omp25d in *B. ovis* PA. However, as described for other homologous genes in other bacteria (Motaleb et al., 2004), this *B. ovis* Δ omp25d mutant synthesizes lower amounts of Omp22 (Fig. 4C) despite transcription of *omp22* seems similar to that of the parental strain (Fig. 1). Since the Δ omp22 mutant is avirulent and unable to survive inside phagocytes while these defects are less prominent in the Δ omp25d mutant (Caro-Hernández et al., 2007; Martín-Martín et al., 2008), it seems probable that the alterations in the latter mutant be due – at least in part – to the decrease in Omp22. Normal levels of Omp22 were not recovered after complementation of the Δ omp25d and Δ omp22 mutants with the corresponding wild-type genes (Fig. 4C), which also justify why complementation of both strains did not restore the virulence of the parental strain (Caro-Hernández et al., 2007).

Close antigenic relatedness between Omp31 and Omp31b – justified by their 67% of sequence identity (Salhi et al., 2003) and responsible for the strong reactivity of the anti-Omp31b serum with *B. ovis* lysates (Fig. 2) – were evidenced. Since Omp31 protects against rough *B. ovis* and smooth *B. melitensis* infections (Cassataro et al., 2005; Estein et al., 2003), the potential of Omp31b as subcellular vaccine would merit to be evaluated in protecting not only against infection by *Brucella* species synthesizing Omp31b but also against *Brucella* species not having Omp31b but synthesizing the antigenically-related Omp31 protein (Vizcaíno et al., 2004 and Fig. 1). Similarly, the serological cross-reactivity of Omp25c with Omp25 and Omp25b and the fact that it was detected in all the investigated *Brucella* strains (Figs. 1 and 4A) are also points encouraging its evaluation as subcellular vaccine. A recent report (Al Dahouk et al., 2008) showing that the concentrations of Omp31, Omp31b, Omp25b and Omp25c in *B. suis* (ORFs BRA0423, BR1622, BR0971 and BR0119, respectively) increase inside murine macrophages – when compared to those detected in bacteria growing in culture medium – provides additional data reinforcing this evaluation.

This study gives new insights into the characterization of the members of the Omp25/Omp31 family of surface proteins, providing a more detailed map about their distribution in the *Brucella* species and new information supporting the evaluation of some of them as subcellular vaccines against brucellosis.

Acknowledgments

This work was financed by projects SA113A06 (Junta de Castilla y León) and PI050091 (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo), the latter also supporting AIMM.

References

- Al Dahouk, S., Jubier-Maurin, V., Scholz, H.C., Tomaso, H., Karges, W., Neubauer, H., Köhler, S., 2008. Quantitative analysis of the intramacrophagic *Brucella suis* proteome reveals metabolic adaptation to late stage of cellular infection. *Proteomics* 8, 3862–3870.
- Bellaire, B.H., Elzer, P.H., Hagius, S., Walker, J., Baldwin, C.L., Roop 2nd, R.M., 2003. Genetic organization and iron-responsive regulation of the *Brucella abortus* 2,3-dihydroxybenzoic acid biosynthesis operon, a cluster of genes required for wild-type virulence in pregnant cattle. *Infect. Immun.* 71, 1794–1803.
- Caro-Hernández, P., Fernández-Lago, L., de Miguel, M.J., Martín-Martín, A.I., Cloeckaert, A., Grilló, M.J., Vizcaíno, N., 2007. Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*. *Infect. Immun.* 75, 4050–4061.
- Cassataro, J., Estein, S.M., Pasquevich, K.A., Velikovskiy, C.A., de la Barrera, S., Bowden, R., Fossati, C.A., Giambartolomei, G.H., 2005. Vaccination with the recombinant *Brucella* outer membrane protein 31 or a derived 27-amino-acid synthetic peptide elicits a CD4+ T helper 1 response that protects against *Brucella melitensis* infection. *Infect. Immun.* 73, 8079–8088.
- Cloeckaert, A., de Wergifosse, P., Dubray, G., Limet, J.N., 1990. Identification of seven surface-exposed *Brucella* outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: immunogold labeling for electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect. Immun.* 58, 3980–3987.
- Cloeckaert, A., Verger, J.M., Grayon, M., Zygmunt, M.S., Grépinet, O., 1996. Nucleotide sequence and expression of the gene encoding the major 25-kDa outer membrane protein of *Brucella ovis*: evidence for antigenic shift, compared with other *Brucella* species, due to a deletion in the gene. *Infect. Immun.* 64, 2047–2055.
- Cloeckaert, A., Vizcaíno, N., Paquet, J.Y., Bowden, R.A., Elzer, P.H., 2002. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Vet. Microbiol.* 90, 229–247.
- Connolly, J.P., Comerci, D., Alefantis, T.G., Walz, A., Quan, M., Chafin, R., Grewal, P., Mujer, C.V., Ugalde, R.A., DelVecchio, V.G., 2006. Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development. *Proteomics* 6, 3767–3780.
- Edmonds, M.D., Cloeckaert, A., Elzer, P.H., 2002. *Brucella* species lacking the major outer membrane protein Omp25 are attenuated in mice and protect against *Brucella melitensis* and *Brucella ovis*. *Vet. Microbiol.* 88, 205–221.
- Eschenbrenner, M., Horn, T.A., Wagner, M.A., Mujer, C.V., Miller-Scandle, T.L., DelVecchio, V.G., 2006. Comparative proteome analysis of laboratory grown *Brucella abortus* 2308 and *Brucella melitensis* 16M. *J. Proteome Res.* 5, 1731–1740.
- Eskra, L., Canavessi, A., Carey, M., Splitter, G., 2001. *Brucella abortus* genes identified following constitutive growth and macrophage infection. *Infect. Immun.* 69, 7736–7742.
- Estein, S.M., Cassataro, J., Vizcaíno, N., Zygmunt, M.S., Cloeckaert, A., Bowden, R.A., 2003. The recombinant Omp31 from *Brucella melitensis* alone or associated with rough lipopolysaccharide induces protection against *Brucella ovis* infection in BALB/c mice. *Microbes Infect.* 5, 85–93.
- Foster, G., Osterman, B.S., Godfroid, J., Jacques, I., Cloeckaert, A., 2007. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2688–2693.
- García-Yoldi, D., Marín, C.M., López-Gofí, I., 2005. Restriction site polymorphisms in the genes encoding new members of group 3 outer

Please cite this article in press as: Martín-Martín, A.I., et al., Analysis of the occurrence and distribution of the Omp25/Omp31 family of surface proteins in the six classical *Brucella* species. *Vet. Microbiol.* (2009), doi:10.1016/j.vetmic.2008.12.003

- membrane protein family of *Brucella* spp. FEMS Microbiol. Lett. 245, 79–84.
- Guilloteau, L.A., Laroucau, K., Vizcaíno, N., Jacques, I., Dubray, G., 1999. Immunogenicity of recombinant *Escherichia coli* expressing the *omp31* gene of *Brucella melitensis* in BALB/c mice. Vaccine 17, 353–361.
- Guzmán-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, A., Parra, A., Cloeckaert, A., Garin, J., Gorvel, J.P., Moriyón, I., Moreno, E., López-Goñi, I., 2002. The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the *Rhizobiaceae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 12375–12380.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop 2nd, R.M., Peterson, K.M., 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene 166, 175–176.
- Lamontagne, J., Butler, H., Chaves-Olarte, E., Hunter, J., Schirm, M., Paquet, C., Tian, M., Kearney, P., Hamaidi, L., Chelsky, D., Moriyón, I., Moreno, E., Paramithiotis, E., 2007. Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*. J. Proteome Res. 6, 1519–1529.
- Martín-Martín, A.I., Caro-Hernández, P., Orduña, A., Vizcaíno, N., Fernández-Lago, L., 2008. Importance of the Omp25/Omp31 family in the internalization and intracellular replication of virulent *B. ovis* in murine macrophages and HeLa cells. Microbes Infect. 10, 706–710.
- Minnick, M.F., Sappington, K.N., Smitherman, L.S., Andersson, S.G., Karlberg, O., Carroll, J.A., 2003. Five-member gene family of *Bartonella quintana*. Infect. Immun. 71, 814–821.
- Motaleb, M.A., Sal, M.S., Charon, N.W., 2004. The decrease in FlaA observed in a *flaB* mutant of *Borrelia burgdorferi* occurs posttranscriptionally. J. Bacteriol. 186, 3703–3711.
- Osterman, B., Moriyón, I., 2006. International Committee on Systematics of Prokaryotes; Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*: minutes of the meeting, 17 September 2003, Pamplona, Spain. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56, 1173–1175.
- Salhi, I., Boigegrain, R.A., Machold, J., Weise, C., Cloeckaert, A., Rouot, B., 2003. Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. Infect. Immun. 71, 4326–4332.
- Scholz, H.C., Hubalek, Z., Sedláček, I., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Melzer, F., Kämpfer, P., Neubauer, H., Cloeckaert, A., Maquart, M., Zygmunt, M.S., Whatmore, A.M., Falsen, E., Bahn, P., Göllner, C., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H.-J., Nöckler, K., 2008. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58, 375–382.
- Verger, J.M., Grimont, F., Grimont, P.A., Grayon, M., 1985. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic-acid hybridization. Int. J. Syst. Bacteriol. 35, 292–295.
- Vizcaíno, N., Caro-Hernández, P., Cloeckaert, A., Fernández-Lago, L., 2004. DNA polymorphism in the *omp25/omp31* family of *Brucella* spp.: identification of a 1.7-kb inversion in *Brucella cetaceae* and of a 15.1-kb genomic island, absent from *Brucella ovis*, related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide. Microbes Infect. 6, 821–834.
- Vizcaíno, N., Cloeckaert, A., Zygmunt, M.S., Fernández-Lago, L., 1999. Molecular characterization of a *Brucella* species large DNA fragment deleted in *Brucella abortus* strains: evidence for a locus involved in the synthesis of a polysaccharide. Infect. Immun. 67, 2700–2712.
- Vizcaíno, N., Kittelberger, R., Cloeckaert, A., Marín, C.M., Fernández-Lago, L., 2001. Minor nucleotide substitutions in the *omp31* gene of *Brucella ovis* result in antigenic differences in the major outer membrane protein that it encodes compared to those of the other *Brucella* species. Infect. Immun. 69, 7020–7028.
- Vizcaíno, N., Verger, J.M., Grayon, M., Zygmunt, M.S., Cloeckaert, A., 1997. DNA polymorphism at the *omp-31* locus of *Brucella* spp.: evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers. Microbiology 143, 2913–2921.
- Wagner, M.A., Eschenbrenner, M., Horn, T.A., Kraycer, J.A., Mujer, C.V., Hagius, S., Elzer, P., DelVecchio, V.G., 2002. Global analysis of the *Brucella melitensis* proteome: identification of proteins expressed in laboratory-grown culture. Proteomics 2, 1047–1060.



Microbes and Infection 12 (2010) 246–251

www.elsevier.com/locate/micinf

Short communication

Cholesterol, ganglioside GM₁ and class A scavenger receptor contribute to infection by *Brucella ovis* and *Brucella canis* in murine macrophages

Ana I. Martín-Martín, Nieves Vizcaíno, Luis Fernández-Lago*

Departamento de Microbiología y Genética, Edificio Departamental, Universidad de Salamanca, Plaza Doctores de la Reina s/n, 37007 Salamanca, Spain

Received 5 October 2009; accepted 21 December 2009

Available online 18 January 2010

Abstract

The establishment of infection by *Brucella ovis* and *Brucella canis* in J774.A1 macrophages was found to be dependent upon cholesterol and ganglioside GM₁, two components of lipid rafts. This process also required a class A scavenger receptor of macrophages, and was not inhibited by smooth and rough lipopolysaccharides from *Brucella* spp. In response to infection, both bacteria induced a weak degree of macrophage activation. These results demonstrate that *B. ovis* and *B. canis* use cell surface receptors common to smooth *Brucella* spp. for macrophage infection, thus limiting macrophage activation and favouring intracellular multiplication and/or the survival of both bacteria.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: *Brucella ovis*; *Brucella canis*; Uptake; Infection; Macrophages; Lipid rafts; Class A scavenger receptor; Cytokines

1. Introduction

Microorganisms of the genus *Brucella* are the etiological agents of brucellosis, an infectious disease that affect many mammalian species. Engineered rough mutants, devoid of O-polysaccharide (O-PS) chains in the lipopolysaccharide (LPS) molecule, show a strong reduction in their virulence in animals or in cultured macrophages as compared with parental *Brucella* strains [1–4], and on the basis to these results O-PS has been implicated in the bacterial virulence of smooth pathogenic *Brucella* spp. [1,3,5,6]. However, naturally rough *Brucella* species (*Brucella ovis* and *Brucella canis*) are virulent in their respective preferred hosts (rams and dogs, respectively), and they induce long-lasting infections, with high levels of splenic colonization in laboratory animals [7] and in cultured macrophages [8]. Regarding virulence, the *B. ovis* outer membrane proteins (OMPs) Omp25d and Omp22 have been shown to be involved in the invasive capacity and intracellular multiplication of *B. ovis* in both HeLa and J774.A1 cells [8].

Brucella spp. are facultative intracellular bacteria that can survive and replicate within a membrane-bound compartment inside professional [8,9] and non-professional [8,10] phagocytic cells. Virulent smooth *Brucella* spp. internalize into macrophages via lipid rafts [11–13] by using the class A scavenger receptor (SR-A), which is associated with lipid rafts [13]. The uptake of smooth *Brucella* by this route is dependent upon phosphoinositide 3-kinase (PI3K) activity [6,14,15] and does not induce macrophage activation [6]. This route of entry involves an endocytic pathway, which avoids fusion with lysosomes [5,11,12], and this inhibition of fusion is possibly restricted by the structure of the phagosomal membrane [16]. However, this uptake route is only associated with the smooth phenotype, because engineered rough mutants do not need cholesterol-rich rafts [5] and PI3K activities [6,15] to penetrate macrophages, and they induce a strong degree of macrophage activation in response to infection [2,6,17]. Additionally, rough *Brucella* mutants are rapidly destroyed, either as a result of macrophage activation or due to their premature release resulting from cell death [18,19]. In light of this, it has been proposed that O-PS chains might be a major factor governing the early behaviour of bacteria inside macrophages [5]. In the present work, we analyzed the uptake and short-term survival processes of *B. ovis* and *B. canis* in

* Corresponding author. Tel.: +34 923 294 532; fax: +34 923 224 876.
E-mail address: lrlago@usal.es (L. Fernández-Lago).

murine macrophages, focusing our attention on determining the role played by lipid rafts, SR-A and PI-3 kinase activities in these processes and in macrophage activation.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

The *Brucella* strains used in this work were the naturally virulent rough strains *B. ovis* PA and *B. canis* RM6/66, the smooth virulent strain *Brucella abortus* 2308, and the genetically stable rough mutant of this strain, *B. abortus* RB51. All these *Brucella* species were obtained from the *Brucella* Culture Collection, Nouzilly (BCCN), France. Bacteria were grown at 37 °C in a 10% CO₂ atmosphere (except for *B. canis*) in tryptic soy agar (TSA; Difco Laboratories) supplemented with 0.3% yeast extract (YE; Difco Laboratories) and 5% heat-inactivated horse serum (HS; GIBCO-BRL Life Technologies, Germany) (TSA-YE-HS).

2.2. Cell culture and gentamicin protection assays

Murine macrophage-like J774.A1 cells (DSMZ ACC170) were cultured at 10⁵ cells/well in 24-well plates in complete Dulbecco's modified Eagle's medium (with 10% foetal bovine serum and 4 mM L-glutamine) (complete DMEM), at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO₂. After 24 h of incubation, the infection of macrophages with different *Brucella* strains was performed at a multiplicity of infection (MOI) of 200 colony-forming units (CFU) per cell for 1 h at 37 °C. Then, the infected cells were washed with DMEM and incubated for an additional hour in fresh complete medium supplemented with 100 µg/mL of gentamicin (Sigma, St. Louis, MO, USA) to kill extracellular bacteria. To analyze the number of viable intracellular bacteria, after three washes in DMEM to remove the antibiotic, the J774.A1 macrophages were lysed with 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 min and serial 10-fold dilutions of the lysates were plated onto TSA-YE-HS plates for the determination of CFU/well.

2.3. Macrophage treatments

Monolayers of J774.A1 cells were cultured in 24-well plates and preincubated for 45 min at 37 °C in complete medium containing increasing concentrations (see Fig. 1) of β-methyl cyclodextrin (Sigma, St. Louis, MO, USA), filipin (Sigma, St. Louis, MO, USA) and cholera toxin B subunit (Invitrogen, Inc.). J774.A1 cells were also treated for 35 min at 37 °C with 300 µg/mL of purified LPS obtained from *B. abortus* 2308, *Brucella melitensis* 16 M and the rough *B. abortus* 9.49 mutant strain [20]. The same concentrations of LPS from *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma, St. Louis, MO, USA), polyinosinic acid and polycytidylic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA) were employed as controls. Macrophages were also treated with 100 nM of wortmannin (Sigma, St. Louis, MO, USA) for 1 h prior to and during bacterial infection. After the treatments, macrophages were washed once with complete DMEM and then infected with the *Brucella* strains. Bacterial uptake was determined using the gentamicin protection

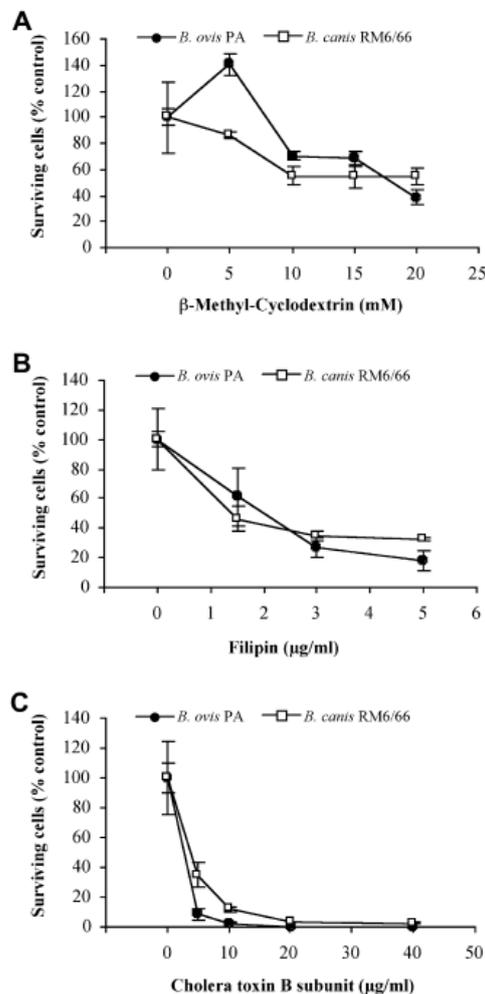


Fig. 1. Effect of β-methyl cyclodextrin (A), filipin (B) and cholera toxin B subunit (C) on murine macrophage infection by *B. ovis* PA and *B. canis* RM6/66. J774.A1 cells were cultured in 24-well plates and pretreated with each drug at the indicated concentrations. After treatment, macrophages were infected with *B. ovis* PA and *B. canis* RM6/66 at an MOI of 200 CFU/cell and the number of viable intracellular bacteria was determined using the gentamicin protection assay. For each condition, the control of bacterial uptake (100% value of surviving cells) was obtained in infected and untreated macrophages. Experiments were performed in duplicate and the values shown represent the means ± standard deviations of two independent experiments with similar results.

assay. None of these treatments exerted cytotoxic effects on cultured J774.A1 cells. All these assays were performed in quadruplicate wells and the results shown are representative of at least two independent experiments with similar results.

2.4. Determination of cytokine levels

J774.A1 macrophages were cultured in 24-well plates and infected with *B. ovis* PA, *B. canis* RM6/66, *B. abortus* 2308

and *B. abortus* RB51 at an MOI of 200 CFU/cell for 4 h. Cell culture supernatants were collected at 0, 24 and 48 h post-infection (p.i.) and the levels of Tumour Necrosis Factor alpha (TNF α) and Interleukin-12 p-40 (IL12) were determined using commercial sandwich enzyme-linked immunosorbent assays, Mouse TNF α BD OptEIA ELISA Set II and Mouse IL12 p-40 BD OptEIA ELISA Set (BD Biosciences Pharmingen), following the manufacture's instructions. All assays were performed in quadruplicate wells and repeated twice, with similar results.

2.5. LDH assays to measure cytotoxicity

To ensure the viability of J774.A1 cells, lactate dehydrogenase released into cell culture supernatants was detected using the CytoTox 96 non-radioactive cytotoxicity assay (Promega Corp., Madison, Wis.), following the manufacturer's instructions. These assays were performed in triplicate wells, using aliquots of culture supernatants obtained from non-infected or untreated macrophages as controls.

2.6. Statistical analyses

Statistical significance was determined using Fisher's Protected Least Significant Differences (PLSD) test. A *P* value <0.01 was considered significant.

3. Results

3.1. Macrophage infection by rough *B. ovis* and *B. canis* is associated with lipid rafts

Entry of *B. suis* and *B. abortus* into murine macrophages is associated with lipid rafts [5,6,11–13]. In contrast, engineered rough mutants do not enter by this route, and phagosomes containing rough mutants rapidly fuse with lysosomes [5,6]. To investigate whether lipid raft-associated components were associated with entry into and infection of murine macrophages by *B. ovis* and *B. canis*, J774.A1 cells were treated with cholesterol-scavenging (β -methyl cyclodextrin) or -binding (filipin) drugs and with a GM₁ ganglioside-binding compound (cholera toxin B subunit). After macrophage pretreatment with increasing concentrations of β -methyl cyclodextrin (Fig. 1A), filipin (Fig. 1B) and cholera toxin B subunit (Fig. 1C), the number of CFU was strongly reduced 1 h after infection. These results suggest that the internalization or short-term survival of *B. ovis* and *B. canis* in murine macrophages would be dependent on lipid rafts.

3.2. SR-A is associated with macrophage infection by rough *B. ovis* and *B. canis*

B. abortus internalizes into macrophages by using SR-A as a receptor, which is associated with lipid rafts during bacterial penetration [13]. To determine the role of SR-A in macrophage infection by *B. ovis* and *B. canis*, the uptake of both bacteria was evaluated in J774.A1 macrophages pretreated

with several SR-A ligands, and the levels of phagocytosis were determined at 1 h after infection. Purified LPS obtained from smooth and rough *Brucella* spp. and *E. coli* was not seen to exert any significant effect on the uptake of *B. ovis* and *B. canis* into macrophages (Fig. 2A and B). In contrast, the number of viable bacteria was strongly reduced for both strains by polyinosinic acid, a known SR-A ligand, whereas a control reagent, polycytidylic acid, which does not show affinity for the SR-A receptor, had no effect (Fig. 2A and B). These results suggest that SR-A is a potential receptor for the uptake of *B. ovis* and *B. canis* into murine macrophages and that this interaction is not affected, at least under our experimental conditions, by purified smooth and rough *Brucella* LPS.

3.3. Macrophage infection by rough *B. ovis* and *B. canis* in macrophages is not dependent on PI3-K activity

B. abortus and *B. melitensis* entry and intracellular replication in host cells is dependent on PI3-K activity [6,14,15], although PI3-K appears to play a limited role in the uptake of engineered rough *Brucella* mutants into murine macrophages [6,15]. To determine the roles of PI3-K in the uptake of natural rough *B. ovis* and *B. canis*, J774.A1 macrophages were treated with 100 nM of wortmannin, a PI3-K inhibitor, 1 h before and during *Brucella* infection. Wortmannin treatment had no effect on *B. ovis* and *B. canis*, whereas the number of viable *B. abortus* 2308 was strongly reduced (Fig. 2C). These results demonstrate that unlike the case of the smooth *Brucella* strain, PI3-K activity is not required for the uptake of naturally rough *B. ovis* and *B. canis* by macrophages.

3.4. Macrophages are not activated by *B. ovis* and *B. canis* infection

As described previously [6,17] murine macrophages are strongly activated by engineered rough *B. abortus* mutants but not after infection by smooth *B. abortus* strains. In order to determine the ability of *B. ovis* and *B. canis* to activate murine macrophages in response to infection, the production of TNF α and IL-12 in J774.A1 macrophages infected with *B. ovis* and *B. canis* was investigated, using smooth *B. abortus* 2308 and rough *B. abortus* RB51 as controls. The results demonstrated that only rough *B. abortus* RB51 stimulated high levels of TNF α and IL12 after macrophage infection (Fig. 3). In contrast, low levels of both cytokines were detected in response to *B. ovis*, *B. canis* and *B. abortus* 2308 infection (Fig. 3). These results indicated that macrophages were consistently activated only as result of infection by *B. abortus* RB51.

4. Discussion

In this study, we show that *B. ovis* and *B. canis* infection in J774.A1 macrophages is associated with cholesterol and ganglioside GM₁ molecules, which are associated with lipid rafts [6]. Thus, the absence of O chains in the LPS from *B. ovis* and *B. canis* does not affect either the infection of murine

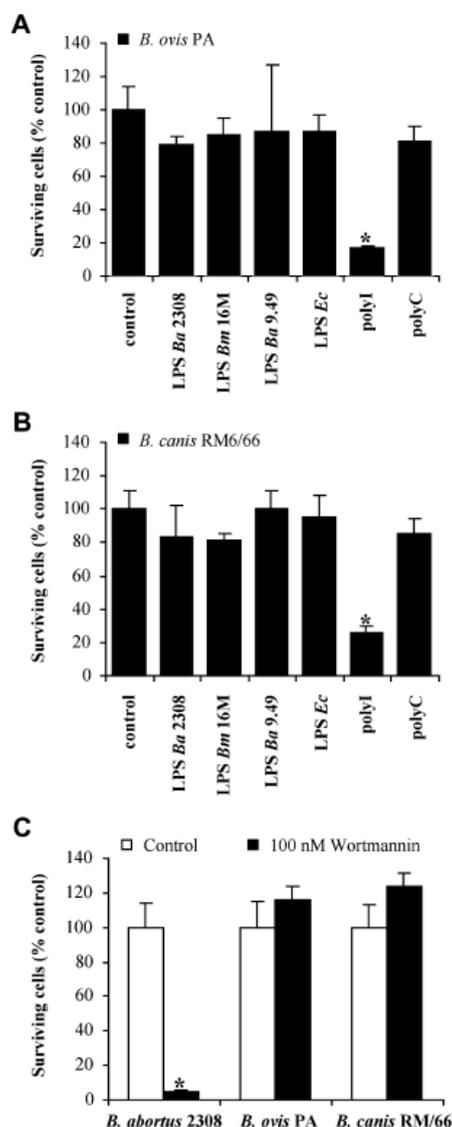


Fig. 2. Effect of SR-A ligands (A and B) and wortmannin (C) in *B. ovis* PA and *B. canis* RM6/66 infection in J774.A1 cells. Murine macrophages were incubated with 300 µg/mL of purified LPS from *B. abortus* 2308 (LPS *Ba* 2308), *B. melitensis* 16 M (LPS *Bm* 16 M), rough *B. abortus* 9,49 (LPS *Ba* 9,49) mutant strain and *E. coli* O111:B4 (LPS *Ec*), 300 µg/mL of polyinosinic acid (polyI) and polycytidylic acid (polyC) and 100 nM of wortmannin. After treatment, macrophages were infected with *Brucella* strains at an MOI of 200 CFU/cell. The gentamicin protection assay was performed to determine the number of surviving bacteria at 2 h p.i.. As a control, a 100% value was obtained in untreated infected J774.A1 cells. Values shown represent means ± standard deviations of two different experiments. Statistically significant differences relative to the untreated control are indicated with an asterisk (* $P < 0.0001$).

macrophages via lipid rafts by both bacteria or their virulence. These observations contrast with those reported previously with the use of engineered rough mutant strains, obtained from

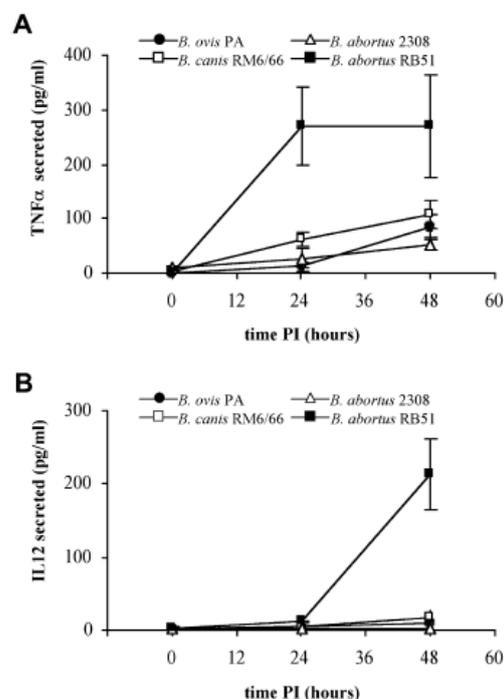


Fig. 3. Effect of *B. ovis* PA and *B. canis* RM6/66 infection on macrophage activation. J774.A1 cells were infected with *B. ovis* PA, *B. canis* RM6/66, *B. abortus* 2308 and *B. abortus* RB51 at an MOI of 200 CFU/cell for 4 h. At 0, 24, and 48 h p.i., cell supernatants were collected and TNF α (A) and IL12 (B) levels were determined by sandwich ELISA. Values shown represent the specific cytokine production by infected macrophages (spontaneous cytokine release by non-infected cells has been subtracted) and are expressed as means ± standard deviation of quadruplicate determinations.

smooth virulent *Brucella* spp., which have limited virulence [1,3,4,21]. Additionally, these *Brucella* rough mutants do not enter host cells by using lipid rafts [5,6] and are either destroyed as a result of macrophage activation or released prematurely as consequence of cell death [6,18,19]. This different behaviour could possibly be attributed to the particular characteristics of the engineered rough *Brucella* mutants used in those experiments. Thus, it has been reported that in these rough mutants the surface of the *Brucella* outer membrane, once devoid of O-PS, becomes simultaneously highly hydrophobic and negatively charged. Such a surface should both allow and bring about multiple non-specific interactions with eukaryotic membranes that should override any specific binding and loss of the ability to select the port of entry, which could contribute to attenuation [22]. However, the virulence of *B. ovis* and *B. canis* in their preferred host (rams and dogs, respectively) and in animal and cellular models [7,8] supports the hypothesis that entry by means of cholesterol-rich lipid rafts enables *Brucella* spp. to limit early fusion with the endosome-lysosome pathway, enabling the bacteria to activate their specific virulence genes involved in building a definitive replication niche [5].

In the present work, we employed the gentamicin protection assay [5,6,8,11–13] to evaluate the effect of different drug treatments on macrophage infection by *B. ovis* and *B. canis* strains. However, the observed decrease in the number of viable intracellular bacteria detected after the period of infection may be due to a reduction in the rate of penetration of *B. ovis* and *B. canis* into macrophages [8,13] and/or the possible killing of bacteria by different bactericidal mechanisms of the murine macrophages at 2 h p.i. Investigations aimed at elucidating this aspect are currently under way at our laboratory.

B. abortus internalizes into macrophages by using SR-A as a receptor [13]. This uptake is inhibited by smooth and rough LPS extracted from *B. abortus*, suggesting that lipid A may be a candidate molecule for SR-A recognition [13]. Our data show that the uptake of naturally rough *B. ovis* and *B. canis* into J774.A1 macrophages is also dependent on the SR-A receptor. However, the internalization and short-term survival of both bacteria were not inhibited by LPS extracted from smooth and rough *Brucella* spp. or by LPS obtained from *E. coli*. Although soluble lipid A and lipid_{IV} A have been reported to be ligands for SR-A, our results suggest that other ligands for SR-A may exist on the *B. ovis* and *B. canis* surface. Consistent with this notion, it has been established that LPS is not a ligand for SR-A on the surface of *Neisseria meningitidis* [23] and proteins expressed in intact organisms are essential ligands for SR-A recognition [24]. Interestingly, we have recently shown that the OMPs Omp25d and Omp22 are essential for the virulence of *B. ovis* in mice [7] and that both proteins are also necessary for the internalization and intracellular replication *B. ovis* in murine macrophages and HeLa cells [8]. Consequently, for the time being it is not possible to rule out the idea that both proteins, presumably located on the outer membrane of *B. ovis*, may be potential ligands for SR-A. Investigations aimed at elucidating these aspects are currently under way at our laboratory.

PI3-K has been reported to be involved in phagocytosis and phagosome trafficking and maturation [25]. The uptake of *B. abortus* and *B. melitensis* into HeLa, S2 and J774.A1 cells is sensitive to the PI-3 kinase inhibitor wortmannin, pointing to the role played by PI3-K in the entry of smooth *Brucella* strains into cells [6,14,15]. In contrast, our results demonstrate that natural rough *B. ovis* and *B. canis*, as is the case of engineered *B. abortus* and *B. melitensis* rough mutants [6,15], enter J774.A1 cells in a PI3-K-independent manner. These results suggest that PI3-K would play differential roles in mediating the entry of smooth and rough *Brucella* strains into J774.A1 cells.

Previous studies have demonstrated that the LPS O side chain of pathogenic *Brucella* has a dramatic impact on macrophage activation [17]. Thus, engineered rough *Brucella* mutants induce a higher amount of cytokines and chemokines than smooth *Brucella* strains [2,17]. In contrast, our results demonstrate that *B. ovis* and *B. canis* induce a weak activation of macrophages, since low levels of TNF α and IL-12 were observed in response to macrophage infection. Accordingly, the rough nature of these bacteria does not govern the level of

macrophage activation. However, the different internalization routes used by smooth *B. abortus* and rough *B. ovis* and *B. canis*, by using lipid rafts, with respect to engineered rough *Brucella* mutants, which do not enter host cells by using lipid rafts [5], could partly account for the differences observed in the level of macrophage activation in response to infection. Future investigations will be necessary to fully elucidate this aspect.

Acknowledgements

We are grateful to Prof. Ignacio Moriyón for providing purified LPS preparations from *Brucella* spp.. This work was supported by project PI050091 from the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain, and project AGL2008-04514-C03-02/GAN from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain. Ana I. Martín-Martín was financed by project PI050091.

References

- [1] F. Godfroid, B. Taminiau, I. Danese, P. Denoel, A. Tibor, V. Weynants, A. Cloeckaert, J. Godfroid, J.J. Letesson, Identification of the perosamine synthetase gene of *Brucella melitensis* 16M and involvement of lipopolysaccharide O side chain in *Brucella* survival in mice and in macrophages. *Infect. Immun.* 66 (1998) 5485–5493.
- [2] M.G. Rittig, A. Kaufmann, A. Robins, B. Shaw, H. Sprenger, D. Gemsa, V. Foulongne, B. Rouot, J. Dornand, Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of *Brucella* induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 74 (2003) 1045–1055.
- [3] J.E. Ugalde, C. Czebener, M.F. Feldman, R.A. Ugalde, Identification and characterization of the *Brucella abortus* phosphoglucomutase gene: role of lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication. *Infect. Immun.* 68 (2000) 5716–5723.
- [4] V. Foulongne, G. Bourg, C. Cazevieuille, S. Michaux-Charachon, D. O'Callaghan, Identification of *Brucella suis* genes affecting intracellular survival in an in vitro human macrophage infection model by signature-tagged transposon mutagenesis. *Infect. Immun.* 68 (2000) 1297–1303.
- [5] F. Porte, A. Naroeni, S. Ouahrani-Bettache, J.P. Liautard, Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect. Immun.* 71 (2003) 1481–1490.
- [6] J. Pei, J.E. Turse, T.A. Ficht, Evidence of *Brucella abortus* OPS dictating uptake and restricting NF- κ B activation in murine macrophages. *Microbes. Infect.* 10 (2008) 582–590.
- [7] P. Caro-Hernández, L. Fernández-Lago, M.J. de Miguel, A.I. Martín-Martín, A. Cloeckaert, M.J. Grilló, N. Vizcaíno, Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*. *Infect. Immun.* 75 (2007) 4050–4061.
- [8] A.I. Martín-Martín, P. Caro-Hernández, A. Orduña, N. Vizcaíno, L. Fernández-Lago, Importance of the Omp25/Omp31 family in the internalization and intracellular replication of virulent *B. ovis* in murine macrophages and HeLa cells. *Microbes. Infect.* 10 (2008) 706–710.
- [9] J.P. Liautard, A. Gross, J. Dornand, S. Köhler, Interactions between professional phagocytes and *Brucella* spp. *Microbiologia* 12 (1996) 197–206.
- [10] J. Pizarro-Cerdá, S. Méresse, R.G. Parton, G.G. van der, A. Sola-Landa, I. López-Goñi, E. Moreno, J.P. Gorvel, *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect. Immun.* 66 (1998) 5711–5724.
- [11] A. Naroeni, F. Porte, Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry and short-term survival of *Brucella suis* in murine macrophages. *Infect. Immun.* 70 (2002) 1640–1644.

- [12] M. Watarai, S. Makino, Y. Fujii, K. Okamoto, T. Shirahata, Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell Microbiol.* 4 (2002) 341–355.
- [13] S. Kim, M. Watarai, H. Suzuki, S. Makino, T. Kodama, T. Shirahata, Lipid raft microdomains mediate class A scavenger receptor-dependent infection of *Brucella abortus*. *Microb. Pathog.* 37 (2004) 11–19.
- [14] C. Guzmán-Verri, E. Chaves-Olarte, C. Eichel-Streiber, I. López-Goñi, M. Thelestam, S. Arvidson, J.P. Gorvel, E. Moreno, GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in non-professional phagocytes: direct activation of Cdc42. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 44435–44443.
- [15] Q.M. Qin, J. Pei, V. Ancona, B.D. Shaw, T.A. Ficht, P. de Figueiredo, RNAi screen of endoplasmic reticulum-associated host factors reveals a role for IRE1alpha in supporting *Brucella* replication. *PLoS Pathog.* 4 (2008) e1000110.
- [16] A. Naroeni, N. Jouy, S. Ouahrani-Bettache, J.P. Liautard, F. Porte, *Brucella suis*-impaired specific recognition of phagosomes by lysosomes due to phagosomal membrane modifications. *Infect. Immun.* 69 (2001) 486–493.
- [17] M.P. Jiménez de Bagüés, A. Terraza, A. Gross, J. Dornand, Different responses of macrophages to smooth and rough *Brucella* spp.: relationship to virulence. *Infect. Immun.* 72 (2004) 2429–2433.
- [18] C.M. Fernández-Prada, E.B. Zelazowska, M. Nikolich, T.L. Hadfield, R. M. Roop, G.L. Robertson, D.L. Hoover, Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O-Polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. *Infect. Immun.* 71 (2003) 2110–2119.
- [19] J. Pei, T.A. Ficht, *Brucella abortus* rough mutants are cytopathic for macrophages in culture. *Infect. Immun.* 72 (2004) 440–450.
- [20] J. Velasco, J.A. Bengoechea, K. Brandenburg, B. Lindner, U. Seydel, D. González, U. Zähringer, E. Moreno, I. Moriyón, *Brucella abortus* and its closest phylogenetic relative, *Ochrobactrum* spp., differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance. *Infect. Immun.* 68 (2000) 3210–3218.
- [21] D. Monreal, M.J. Grilló, D. González, C.M. Marín, M.J. de Miguel, I. López-Goñi, J.M. Blasco, A. Cloeckert, I. Moriyón, Characterization of *Brucella abortus* O-polysaccharide and core lipopolysaccharide mutants and demonstration that a complete core is required for rough vaccines to be efficient against *Brucella abortus* and *Brucella ovis* in the mouse model. *Infect. Immun.* 71 (2003) 3261–3271.
- [22] D. González, M.J. Grilló, M.J. de Miguel, T. Ali, V. Arce-Gorvel, R.M. Delrue, R. Conde-Álvarez, P. Muñoz, I. López-Goñi, M. Iriarte, C.M. Marín, A. Weintraub, G. Widmalm, M. Zygmunt, J.J. Letesson, J.P. Gorvel, J.M. Blasco, I. Moriyón, Brucellosis vaccines: assessment of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export. *PLoS One* 3 (2008) e2760.
- [23] L. Peiser, M.P. De Winther, K. Makepeace, M. Hollinshead, P. Coull, J. Plested, T. Kodama, E.R. Moxon, S. Gordon, The class A macrophage scavenger receptor is a major pattern recognition receptor for *Neisseria meningitidis* which is independent of lipopolysaccharide and not required for secretory responses. *Infect. Immun.* 70 (2002) 5346–5354.
- [24] L. Peiser, K. Makepeace, A. Plüddemann, S. Savino, J.C. Wright, M. Pizza, R. Rappuoli, E.R. Moxon, S. Gordon, Identification of *Neisseria meningitidis* nonlipopolysaccharide ligands for class A macrophage scavenger receptor by using a novel assay. *Infect. Immun.* 74 (2006) 5191–5199.
- [25] S.S. Weber, C. Ragaz, H. Hilbi, Pathogen trafficking pathways and host phosphoinositide metabolism. *Mol. Microbiol.* 71 (2009) 1341–1352.

Apéndices

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AcM	Anticuerpos monoclonales
AcP	Anticuerpos policlonales
A-HSL	Acil-homoserina-lactona
Amp^r	Ampicilina resistente
BAB	Agar base sangre Nº 2 ("Blood Agar Base Nº 2")
BAB-S	BAB-suero de ternera
BCV	Vacuola que transporta <i>Brucella</i> ("Brucella-containing vacuole").
C12-HSL	N-dodecanoil-homoserina-lactona
CβG	β -(1,2) glucano cíclico
DMEM	Medio basal de Eagle modificado por Dulbecco ("Dulbecco's Modified Eagle Medium")
D.O.	Densidad óptica
ELISA	Ensayo inmunoenzimático ("Enzyme-linked immunosorbent assay")
HS	Suero de caballo ("Horse serum")
IL12	Interleucina 12
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
Kan^r	Kanamicina resistente
LB	Medio Luria Bertani
LDH	Lactato deshidrogenasa
log	Logaritmo
LPS	Lipopolisacárido
MOI	Multiplicidad de infección ("Multiplicity of Infection")
p/v	Peso/volumen
PAGE-SDS	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio ("SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis")
PBS	Tampón fosfato salino ("Phosphate Buffer Saline")
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ("Polymerase Chain Reaction")
p.i.	Post-infección
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa ("Phosphoinositide 3-kinase")
PME	Proteína de membrana externa
R-LPS	Lipopolisacárido en fase rugosa ("Rough-LPS")
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio ("Sodium Dodecyl Sulfate")
SFB	Suero Bovino Fetal ("Fetal Bovine Serum")
S-LPS	Lipopolisacárido en fase lisa ("Smooth-LPS")
SR-A	Receptor "Scavenger" de Clase A
T4SS	Sistema de Secreción de Tipo V ("Type IV Secretion System")
TBS	Tampón tris salino ("Tris Buffered Saline")
TNFα	Factor de Necrosis Tumoral alfa ("Tumor Necrosis Factor alpha")
TSA	Agar tripticaseína de soja ("Trypticasein Soy Agar")
TSB	Caldo Triptona de soja ("Tryptone Soy Broth")
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
v/v	Volumen/volumen
VLCFA	Ácido graso de cadena muy larga ("Very long chain fatty acid")
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
YE	Extracto de levadura ("Yeast extract")

ÍNDICE DE TABLAS		
Tabla I.	Cepas de <i>Brucella</i> utilizadas en este estudio	41
Tabla II.	Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en el presente trabajo	42
Tabla III.	Cebadores utilizados en la clonación de los genes de la familia <i>omp25/omp31</i> para la purificación de PMEs recombinantes	48
Tabla IV.	Cebadores destinados a la construcción de plásmidos que portan genes inactivados pertenecientes a la familia <i>omp25/omp31</i>	48
Tabla V.	Cebadores utilizados en la obtención de cepas mutantes de <i>B. ovis</i> PA en genes implicados en la virulencia de estirpes lisas de <i>Brucella</i>	49
Tabla VI.	Cebadores usados en la construcción de los plásmidos empleados para la complementación de las cepas mutantes $\Delta vjbR$, Δcgs y $\Delta virB2$ de <i>B. ovis</i> PA obtenidas en este estudio	50
Tabla VII.	Relación de plásmidos obtenidos con el fin de purificar PMEs recombinantes pertenecientes a la familia Omp25/Omp31	50
Tabla VIII.	Listado de plásmidos construidos con la finalidad de inactivar los genes <i>omp25d</i> y <i>omp22</i> de <i>B. canis</i> RM6/66, <i>B. abortus</i> 2308 y <i>B. neotomae</i> 5K33	51
Tabla IX.	Plásmidos construidos para la obtención de cepas mutantes de <i>B. ovis</i> PA en el operón <i>virB</i> y en los genes <i>vjbR</i> , <i>cgs</i> , <i>bacA</i> y <i>virB2</i>	51
Tabla X.	Listado de plásmidos generados para la complementación de las cepas mutantes $\Delta vjbR$, Δcgs y $\Delta virB2$ de <i>B. ovis</i> PA obtenidas en el presente trabajo	52
Tabla XI.	Condiciones de electroporación utilizadas	53
Tabla XII.	Anticuerpos monoclonales empleados en Western Blot en el presente trabajo	60
Tabla XIII.	Identificación de los genes <i>omp25/omp31</i> empleados en la obtención de anticuerpos policlonales	60
Tabla XIV.	Cepas modificadas genéticamente en los genes <i>omp25d</i> y <i>omp22</i> obtenidas en el presente trabajo	71
Tabla XV.	Relación de cepas modificadas genéticamente generadas en la obtención de cepas mutantes de <i>B. ovis</i> PA en genes implicados en la virulencia de estirpes lisas de <i>Brucella</i>	82
Tabla XVI.	Estudio de la citotoxicidad (determinada como el % de muerte celular) producida en cultivos de células HeLa y macrófagos J774.A1 como consecuencia de una infección por <i>B. ovis</i> PA, <i>B. canis</i> RM6/66, <i>B. abortus</i> 2308 y <i>B. abortus</i> RB51	96
Tabla XVII.	Sensibilidad a la exposición a polimixina B, desoxicolato de sodio, suero no inmune humano y peróxido de hidrógeno de las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ de <i>B. canis</i> RM6/66, <i>B. abortus</i> 2308 y <i>B. neotomae</i> 5K33	114
Tabla XVIII.	Caracterización fenotípica clásica de la colección de cepas mutantes y revertientes silvestres de <i>B. ovis</i> PA en genes implicados en la virulencia de estirpes lisas de <i>Brucella</i>	123
Tabla XIX.	Recuentos de UFC/ml de cada una de las cepas mutantes y revertientes silvestres de <i>B. ovis</i> PA en una suspensión de D.O. _{600 nm} de 0,2 en PBS	124
Tabla XX.	Recuento de las UFC/ml y valor de la D.O. _{600 nm} a distintos tiempos de incubación de cultivos en medio líquido de la colección de cepas mutantes y revertientes de <i>B. ovis</i> PA generada en este estudio	125

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema estructural simplificado del lipopolisacárido en fase lisa de <i>Brucella</i> spp.	4
Figura 2.	Principales citoquinas secretadas en respuesta a una infección por <i>Brucella</i> spp. y su papel en el control del proceso infeccioso	11
Figura 3.	Ruta endocítica intracelular seguida por especies lisas de <i>Brucella</i> en el macrófago	14
Figura 4.	Modelo estructural hipotético del Sistema de Secreción de Tipo IV (T4SS) de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	26
Figura 5.	Regulación de la expresión génica del operón <i>virB</i> en el género <i>Brucella</i>	28
Figura 6.	Representación gráfica de los vectores de clonación empleados en el presente trabajo	45
Figura 7.	Construcción del plásmido pCVDKan-D	46
Figura 8.	Representación gráfica de los vectores pBBR1MCS4, pTrcHisA y pTrcHisB empleados en el presente trabajo	47
Figura 9^a.	Pasos seguidos en la construcción de los plásmidos recombinantes utilizados para la purificación de las PMEs de la familia Omp25/Omp31	62
Figura 9B.	Estrategia seguida para la construcción del plásmido pNV22303 utilizado en la purificación de la PME Omp22 de <i>B. ovis</i> PA	63
Figura 10.	Estrategias utilizadas para la construcción de los plásmidos pAM25d03 y pAM2204 que portan, respectivamente, los genes <i>omp25d</i> y <i>omp22</i> de <i>B. abortus</i> 2308 delecionados	68
Figura 11.	Representación esquemática de las posibles formas de la sustitución por recombinación homóloga del gen silvestre de interés por una copia del gen inactivado	70
Figura 12.	Construcción del plásmido recombinante pNVvirPA05 utilizado para la obtención de una cepa mutante polar de <i>B. ovis</i> PA en el operón <i>virB</i>	73
Figura 13.	Descripción esquemática de la denominada PCR "de solapamiento"	75
Figura 14.	Representación gráfica de la estrategia seguida para la construcción del plásmido recombinante pNVvjbR03, portador del gen $\Delta vj b R$	77
Figura 15.	Representación esquemática de los pasos seguidos en la construcción del plásmido recombinante pNVcgs03, portador del gen Δcgs inactivado mediante PCR "de solapamiento"	
Figura 16.	Esquema de la estrategia usada en la construcción del plásmido recombinante pNVbacA03, portador del gen $\Delta bacA$	79
Figura 17.	Construcción del plásmido recombinante pNVvirB204, portador del gen <i>virB2</i> delecionado	80
Figura 18.	Nivel de activación de macrófagos murinos J774.A1 durante el transcurso de una infección causada por especies naturalmente rugosas de <i>Brucella</i>	97
Figura 19.	Análisis de la capacidad de proliferación de <i>B. ovis</i> PA y <i>B. canis</i> RM6/66 en células fagocíticas profesionales	98
Figura 20.	Efecto de la β -metil-ciclodextrina, de la filipina y de la subunidad B de la toxina colérica en la internalización de <i>B. ovis</i> PA y <i>B. canis</i> RM6/66 en macrófagos murinos	100
Figura 21.	Papel del receptor SR-A en la entrada y supervivencia intracelular de <i>B. ovis</i> PA, <i>B. canis</i> RM6/66 y <i>B. abortus</i> 2308 en células J774.A1	101
Figura 22.	Actividad de las enzimas PI3Ks de Clase I en la internalización de <i>B. abortus</i> 2308, <i>B. ovis</i> PA y <i>B. canis</i> RM6/66 en macrófagos murinos	102
Figura 23.	Cinética de la infección esplénica de la cepa <i>B. ovis</i> PA y de cepas mutantes en los genes <i>omp31</i> , <i>omp25</i> , <i>omp25c</i> , <i>omp25d</i> y <i>omp22</i> de <i>B. ovis</i> PA	103
Figura 24.	Análisis de la internalización y multiplicación intracelular de cepas mutantes de <i>B. ovis</i> PA en los genes de la familia <i>omp25/omp31</i> en cultivos celulares	104
Figura 25.	Análisis de la síntesis de las proteínas recombinantes Omp31b, Omp25b, Omp25c, Omp25d y Omp22 en las cepas de <i>E. coli</i> JM109 y BL21 y evaluación de su posterior purificación	105

Figura 26.	Análisis de la expresión de los genes omp31 y omp31b en <i>Brucella</i> spp.	107
Figura 27.	Estudio por Western Blot de la expresión de los genes <i>omp25</i> y <i>omp25b</i> en <i>Brucella</i> spp.	108
Figura 28.	Detección inmunológica por Western Blot de las PMEs Omp25c y Omp25d en diferentes especies de <i>Brucella</i>	109
Figura 29.	Análisis de la expresión del gen <i>omp22</i> en cepas de las seis especies clásicas de <i>Brucella</i> spp. mediante la detección por Western Blot de la proteína que codifica	110
Figura 30.	Verificación genotípica de las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ de <i>B. canis</i> RM6/66, <i>B. abortus</i> 2308 y <i>B. neotomae</i> 5K33 obtenidas en el presente trabajo	112
Figura 31.	Estudio de la cinética de multiplicación intracelular de las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ de <i>B. canis</i> RM6/66, <i>B. abortus</i> 2308 y <i>B. neotomae</i> 5K33 en cultivos de células HeLa y macrófagos murinos	
Figura 32.	Cinética de colonización esplénica de las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ de <i>B. canis</i> RM6/66, <i>B. abortus</i> 2308 y <i>B. neotomae</i> 5K33 obtenidas en el presente trabajo	117
Figura 33.	Caracterización genotípica de <i>B. ovis</i> -PNVvirPA05-M (<i>Bo.ΔvirB(p)</i> -M)	119
Figura 34.	Verificación genotípica de <i>B. ovis</i> -PNVvjbR03-M (<i>Bo.ΔvjbR</i> -M) y de <i>B. ovis</i> -PNVcgs03-M (<i>Bo.Δcgs</i> -M)	120
Figura 35.	Verificación genotípica de <i>B. ovis</i> -PNVbacA03-M (<i>Bo.ΔbacA</i> -M) y de <i>B. ovis</i> -PNVvirB204-M (<i>Bo.ΔvirB2</i> -M)	121
Figura 36.	Análisis del crecimiento en medio líquido de las cepas mutantes y revertientes silvestres de <i>B. ovis</i> PA obtenidas en el presente trabajo	125
Figura 37.	Autoaglutinación en medio líquido de las cepas mutantes <i>Bo.ΔvjbR</i> -M y <i>Bo.Δcgs</i> -M	127
Figura 38.	Sensibilidad a la exposición a polimixina B, desoxicolato de sodio, pH ácido y peróxido de hidrógeno de las cepas mutantes y revertientes silvestres de <i>B. ovis</i> PA obtenidas en el presenta trabajo	129
Figura 39.	Análisis por Western Blot de la expresión de las PMEs Omp31, Omp25, Omp25c y Omp22 en las cepas mutantes y revertientes silvestres obtenidas en <i>B. ovis</i> PA	130
Figura 40.	Análisis de la virulencia en ratones BALB/c de las cepas mutantes de <i>B. ovis</i> PA obtenidas en presente trabajo	132
Figura 41.	Análisis de la cinética de multiplicación intracelular de las cepas mutantes <i>Bo.ΔvirB(p)</i> -M, <i>Bo.ΔvjbR</i> -M, <i>Bo.Δcgs</i> -M, <i>Bo.ΔbacA</i> -M y <i>Bo.ΔvirB2</i> -M en macrófagos murinos	134
Figura 42.	Estudio de la cinética de multiplicación intracelular de las cepas <i>Bo.ΔvjbR</i> -COM, <i>Bo.Δcgs</i> -COM y <i>Bo.ΔvirB2</i> -COM en cultivos de macrófagos murinos	135