



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Departamento de Microbiología y Genética

**TESIS DOCTORAL**

---

**Obtención, caracterización y evaluación del interés como vacunas  
recombinantes atenuadas de mutantes de *Brucella ovis* en genes  
relacionados con la membrana externa**

Memoria presentada por Rebeca Singh Sidhu Muñoz  
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca

Salamanca, 2017



La **Dra. Nieves Vizcaíno Santiso** Profesora Titular del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

**CERTIFICA:**

Que la Tesis titulada: **“Obtención, caracterización y evaluación del interés como vacunas recombinantes atenuadas de mutantes de *Brucella ovis* en genes relacionados con la membrana externa”**, presentada por Dña. Rebeca Singh Sidhu Muñoz para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca con Mención Internacional, ha sido realizada bajo su dirección, dentro del Programa de Doctorado en Microbiología y Genética Molecular (regulado por el RD99/2011), en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

En Salamanca, a 16 de diciembre de 2016.

Fdo.: Dra. Nieves Vizcaíno Santiso



Este trabajo de investigación ha sido financiado por los proyectos AGL2011-30453-C04-02 y AGL2014-58795-C4-4-R del Ministerio de Economía y Competitividad y por la beca del plan de Formación de Personal Investigador 2012 (FPI) BES-2012-057056 concedida a Rebeca Singh Sidhu Muñoz por el Ministerio de Economía y Competitividad.



## *Agradecimientos*

Este Apartado es una oda a la paciencia y el cariño de todas las personas que me acompañaron a lo largo de este camino. Teniendo en cuenta que, casi con total seguridad, este será el Apartado o página de este Trabajo que todo el mundo lea, o que lea con mayor interés, o a que, al menos, todo el mundo puede que lea... Además, entendiendo “mundo” no como el conjunto de todo lo existente, ni como el conjunto de todos los seres humanos, sino más bien, una parte determinada de la realidad o alguna de sus manifestaciones. Más bien, ese mundo relacionado con el ambiente en el que se mueve una persona; el de la vida y el trato social (ruego disculpas, el lenguaje científico se ha apoderado de esta página también). De acuerdo con lo anteriormente expuesto, tengo motivos más que de sobra para concentrar mis esfuerzos finales en dar las gracias.

El primer gracias y un te quiero van para mi madre, Esperanza, a la que debo todo lo que soy. Trabajadora incansable y madre coraje. Eres el espejo en el que me veo reflejada con orgullo. Gracias por quererme de manera incondicional y gracias por conformarte con lo que soy, sin imposiciones, ni reproches. Gracias por dejarme siempre la libertad de decidir, por darme la oportunidad de equivocarme y sobre todo, gracias por ayudarme siempre sin juzgarme. Gracias por tu infinita ternura y paciencia. Por tu apoyo incondicional. Gracias por esa **fuerza fotosintética** que me das y que siempre consigue levantarme esté donde esté y como esté. Gracias por siempre y para siempre. Mi mundo (entendiendo mundo como el conjunto de la sociedad humana, así como el de las ideas y valores) es mucho mejor gracias a ti. Gracias por demostrarme que los buenos no siempre pierden y que el amor en sus diferentes manifestaciones, es el motor que mueve el Mundo.

Cuando pensé por primera vez en realizar la Tesis Doctoral, lo hice movida por mi interés personal en seguir aprendiendo. Así pues, un gracias global a todas y cada una de las personas que me han dedicado su tiempo y esfuerzo en enseñarme. A todos los niveles. Sobre todo, gracias al que me ofreció su ayuda sin esperar nada a cambio, gracias al que me corrigió cuando me equivoqué (innumerables veces) y al que desconfió de mí, porque me ayudó a ver que debo mejorar y lo que es todavía algo mejor, me retó a demostrarme que, con esfuerzo, soy capaz de mejorar y que me queda un largo camino hasta conseguirlo en términos significativos.

El camino recorrido hasta el momento forma parte de la aventura más intensa de mi vida. He tenido la suerte de compartirlo con personas que me han inspirado para llegar hasta la meta de la manera más digna posible y eso que empecé con “faldas y a lo loco”. No había manera de hacer una electroforesis sin que el gel no se saliera del molde, de que no me faltaran unos mililitros de suero en un medio de cultivo, o conseguir concentrar, en lugar de diluir mi muestra de ADN... Y si sólo fuera eso... Me sentía Gurb aterrizando en un mundo lleno de incógnitas y a medida que me adentro más y más, tengo la sensación de que éstas se incrementan hasta límites infinitos.

Gracias a la Dra. Nieves Vizcaíno por ofrecerme su tiempo y energía, gracias por la intensa dedicación desde el primer día, hasta el último de los minutos. Por compartir largas jornadas de trabajo codo a codo en “nuestro” minimundo, entre montañas de placas Petri, cafés de buena mañana, tubos de seroteca, los pendientes de cápsulas, tampones de electroforesis y cultivos celulares. Por ser un ejemplo de capacidad de trabajar varios frentes a la vez. Gracias sin duda, por abrirme la puerta de la Ciencia también en otros países. Por actuar de *la mère Brucella* cuando *la fille ovis* se embarcó a vivir experiencias trascendentales en el país galo. Experiencias vitales que fueron desde intentar descifrar las retahílas de números y letras de los monoclonales anti Omph con l'accent belge (guiño, guiño), los exquisitos menús que servían en la cantina del INRA mientras me perdía en una tinción de plata con LPS contaminado o en batallas por obtener fusiones *lacZ*. En general, por ayudarme en este viaje en montaña rusa con doble *loop* que han sido estos años. Siempre estaré eternamente agradecida por esto y por los muchísimos momentos vividos juntas. Merci.

Un Gracias indudable a LABORATERAPIA por hacer de mi vida de becaria solitaria un mar de bromas, cariño, lloreras por doquier, cancioncitas y buen comer. Gracias al equipo al equipo residente: Dra. Paula, Alexandra, Lorena Celador, Dra. Lorena Carro, Dra. Estherina, Marta, María, Álex, Pepe y Xavier, así como al equipo visitante capitaneado por el Dr. Pepín y acompañado del Dr. Primo, de la Dra. Pí, así como de algunos de los alumnos que han pasado por nuestros laboratorios y con los que también he tenido el placer de compartir buenos momentos. Recordaré con nostalgia la dieta del *tupper* como plato único. Aunque muchos son los que me han visto pegada interminablemente a la campana de flujo laminar, puedo asegurar

que he conseguido comer todos los días. He de reconocer que echaré de menos ese; “Rebe, ¿hoy toca comer?” y el mítico, “Pepiín...” y saber que es la hora de comer. En definitiva, gracias por ser especialmente atentos y pacientes en la etapa final, por ser un motivo de sonrisa diaria, por las sesiones de video montajes y la compañía ocasional en Congresos. Mi paso por el Departamental tiene un antes y un después gracias a vosotros. Empezamos casi a la vez y poco a poco vamos despegando. Os deseo toda la suerte en el camino a la cima. Por cierto, ¡Ánimo Marta, ya casi estás! Después de que las sucesivas tesis vean la luz, no os olvidéis que nos vemos en Puerto Rico.

Gracias a los Drs. Axel Cloeckert y Michel Zygmunt de la Unité Mixte de Recherche Infectiologie et Santé Publique del INRA de Nouzilly por acogerme durante mis dos estancias predoctorales. Merci pour l'accueil chaleureux, la formation sur les techniques de caractérisation des «souches» *Brucella*, pour m'accompagner dans un périple des bonnes moments, pour m'approcher à l'univers historique de la brucelose, ainsi que de partager les nouvelles tendances dans le domaine de la Bioinformatique et aussi l'acquisition de connaissances transversales au niveau de la résistance bactérienne aux antibiotiques. Merci pour m'apporter la richesse de l'échange scientifique et philosophique. Gracias también al Dr. Olivier Grepinet, merci pour la formation individualisée et attentive reçue, ainsi que d'être toujours disponible à mes questions. Je me sens chanceuse d'avoir eu l'opportunité d'apprendre et travailler avec vous. Un grand Merci!!

A los grupos de brucelosis del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Navarra, de la Unidad de Salud Animal del Instituto de Agrobiotecnología CSIC-UPNA del Gobierno de Navarra y de la Unidad de Sanidad Animal del CITA del Gobierno de Aragón por su colaboración en la realización de esta tesis doctoral.

A todo el personal del Edificio Departamental y Departamento de Microbiología y Genética por su necesaria labor profesional y la amabilidad con la que me han tratado. Gracias en especial a Toñi, Encarna, Puri, Laura e Inma.

A mi compañera veterana de laboratorio la Dra. Pilar Sancho. Aunque nuestra coincidencia espacio/tiempo ha sido breve, la interacción ha sido realmente positiva. Gracias por tus consejos prácticos, los ánimos, los momentos de discusión y el apoyo mostrado. A Ricardo por su generosidad a la hora de ayudarme con las cuestiones informáticas. Gracias a la Dra. Carmen Tejedor por hacerme disfrutar, como a mi generación de boticarios, con los Análisis de Diagnóstico de Laboratorio I (“los de micro”). Por ser un estímulo inicial que despertó mi curiosidad por el mundo de la Microbiología y por la serenidad que transmite conversar con ella.

Al Dr. Pedro F. Mateos González, coordinador del Programa de Doctorado de Microbiología y Genética Molecular, por su disponibilidad absoluta en resolverme todas las dudas burocráticas, por intentar facilitar la vida de los estudiantes de Doctorado y por su enorme simpatía y cercanía en el trato.

Al Servicio de Experimentación Animal el cuidado y supervisión de los animales y al Servicio de Secuenciación de NUCLEUS de la Universidad de Salamanca la determinación de secuencias. Así mismo, agradezco al personal de la Unidad de Microscopía y Citometría del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca por su disposición y amabilidad a la hora de prestar sus servicios.

A la Dra. Laura Soler y el Dr. Ignacio Caballero por la fuerza que me hacen llegar desde el otro lado de los Pirineos. Al resto de Drs. Inrianos: Carla, Alba, Carmen, Jorge... Ha sido un enorme placer conocerlos. Sois todos el dream team de la Recherche Espagnole Abroad. Un auténtico orgullo contar con tal elenco de jóvenes científicos. Os echo de menos y os deseo toda la suerte del mundo. Prometo que nuestros caminos se cruzarán pronto.

Go raibh maith agat Rónan por el cariño, la eterna paciencia, la actitud positiva y por poner banda sonora a mis días. Gracias David por el diseño gráfico y estar ahí desde la infancia, hasta las entregas a última hora. A mi familia por comprender mis ausencias y apoyarme en la distancia durante estos años y a Víctor: compañero, este triunfo quiero compartirlo contigo.

Después de pasar por este proceso de mutagénesis, solo me queda un mensaje que transmitir: hoy me siento preparada. Hola Mundo. Allá voy.

*A mi madre*



# Índice

## RESUMEN

---

Resumen.....	I
--------------	---

## ABSTRACT

---

Abstract.....	II
---------------	----

## INTRODUCCIÓN

---

1. El género <i>Brucella</i> y la brucelosis.....	1
2. La membrana externa de <i>Brucella</i> .....	3
2.1. Fosfolípidos.....	4
2.2. Lipopolisacárido.....	4
2.3. Proteínas de la membrana externa (OMPs).....	6
2.3.1. Familia Omp25/Omp31.....	7
2.3.2. Lipoproteínas.....	10
2.4. Propiedades relacionadas con la membrana externa de <i>Brucella</i> .....	11
3. Aspectos más relevantes para este trabajo del proceso de infección y de los mecanismos de supervivencia de <i>Brucella</i> .....	12
3.1. Mecanismos de adhesión y transporte relacionados con este trabajo.....	13
3.1.1. Proteína de superficie SP41.....	14
3.1.2. Proteína BepC.....	15
3.2. Internalización, tráfico intracelular de <i>Brucella</i> y establecimiento del nicho replicativo.....	16
3.3. Supervivencia dentro de las células hospedadoras.....	18
4. Respuesta inmune inducida por <i>Brucella</i> .....	22
5. Modelo murino en el estudio de la brucelosis.....	27
6. <i>Brucella ovis</i> y epididimitis contagiosa del carnero.....	29
6.1. Características de la enfermedad.....	29
6.2. Diagnóstico.....	30
6.3. Control de la enfermedad.....	31

## OBJETIVOS

---

Objetivos.....	37
----------------	----

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

1. Microorganismos, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	41
1.1. Género <i>Brucella</i> .....	41
1.2. <i>Escherichia coli</i> .....	41
2. Técnicas generales de manipulación de ácidos nucleicos.....	42
2.1. Vectores de clonación.....	42
2.2. Digestiones enzimáticas y ligaciones.....	43
2.3. Oligonucleótidos y reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR).....	44
2.4. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).....	45
2.5. Electroforesis de ADN en gel de agarosa.....	46
2.6. Purificación de fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa.....	46
2.7. Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> .....	46
2.8. Secuenciación de ADN.....	46
2.9. Métodos de transformación de bacterias.....	47

2.9.1. Transformación de <i>E. coli</i>	47
2.9.2. Transformación de <i>B. ovis</i>	47
3. Estudio de la fuerza de la región promotora del gen <i>bepC</i> de <i>B. ovis</i>	48
3.1. Obtención de cepas recombinantes de <i>E. coli</i> portadoras de plásmidos con la región promotora del gen <i>bepC</i> fusionada al gen <i>lacZ</i>	48
3.2. Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa de fusiones <i>lacZ</i>	49
4. Obtención de mutantes de <i>B. ovis</i> PA por inactivación de los genes de interés por PCR de solapamiento	49
4.1. Obtención de mutantes simples	49
4.1.1. Inactivación de genes por PCR de solapamiento	49
4.1.2. Construcción de plásmidos portadores de los genes inactivados	50
4.1.3. Sustitución de los genes silvestres por los inactivados en <i>B. ovis</i> PA	50
4.2. Obtención de mutantes múltiples	51
5. Caracterización genotípica de las cepas obtenidas	51
6. Análisis del crecimiento	55
7. Estudio de las propiedades de la membrana externa	55
7.1. Autoaglutinación en medio líquido	55
7.2. Sensibilidad a polimixina B y desoxicolato sódico	55
7.3. Sensibilidad a peróxido de hidrógeno	55
7.4. Sensibilidad a suero humano no inmune	56
7.5. Sensibilidad a otros compuestos tóxicos	56
8. Estudio de la topología de la superficie bacteriana	56
9. Estudio del comportamiento en líneas celulares de cepas mutantes de <i>B. ovis</i> PA	58
9.1. Medios y condiciones de cultivo	58
9.2. Macrófagos J774.A1	58
9.3. Células epiteliales HeLa	59
9.4. Microscopía de fluorescencia	59
10. Estudios <i>in vivo</i> en modelo murino	59
10.1. Procedimientos generales de experimentación animal	59
10.2. Análisis de la virulencia	60
10.3. Evaluación de la utilidad de los mutantes $\Delta omp31\Delta cgs$ , $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$ y $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ de <i>B. ovis</i> PA como vacunas vivas atenuadas	60
10.3.1. Persistencia	60
10.3.2. Evolución de los anticuerpos IgG frente a <i>B. ovis</i> PA en suero	
10.3.3. Detección de citocinas producidas por esplenocitos murinos en una segunda estimulación <i>in vivo</i> con <i>B. ovis</i> PA	61
10.3.4. Protección frente a una infección experimental por <i>B. ovis</i>	62
11. Métodos estadísticos	62

## **RESULTADOS**

---

1. Construcción, caracterización y evaluación de la virulencia de los mutantes $\Delta bepC$ y $\Delta ugpB$ de <i>B. ovis</i> PA	65
1.1. Obtención de los mutantes $\Delta bepC$ y $\Delta ugpB$	65
1.2. Estudio de las propiedades de la membrana externa de los mutantes $\Delta bepC$ y $\Delta ugpB$	67
1.2.1. Capacidad de autoaglutinación	67
1.2.2. Evaluación de la sensibilidad a compuestos antimicrobianos	68
1.2.3. Topología de la superficie de los mutantes $\Delta bepC$ y $\Delta ugpB$	68
1.3. Ensayos de virulencia en modelos celulares de infección de los mutantes $\Delta bepC$ y $\Delta ugpB$	70
1.4. Evaluación de la virulencia de los mutantes $\Delta bepC$ y $\Delta ugpB$ en modelo murino	71
1.5. Análisis de la transcripción de los genes <i>bepC</i> y <i>ugpB</i> en <i>B. ovis</i> PA	71

1.6. Análisis de la fuerza de la región promotora del gen <i>bepC</i> de <i>B. ovis</i> .....	72
2. Construcción y evaluación preliminar de un panel de mutantes múltiples de <i>B. ovis</i> PA en genes relacionados con la membrana externa .....	74
2.1. Obtención del panel de mutantes .....	75
2.2. Evaluación preliminar de la virulencia en modelo murino .....	79
2.3. Caracterización topológica de la superficie celular mediante ELISA indirecto con anticuerpos monoclonales .....	81
3. Estudio de las propiedades de la membrana externa y de la virulencia en modelos celulares y en ratón de los mutantes seleccionados tras la caracterización preliminar .....	85
3.1. Propiedades de la membrana externa .....	85
3.1.1. Capacidad de autoaglutinación .....	86
3.1.2. Sensibilidad a polimixina B, desoxicolato de sodio y peróxido de hidrógeno .....	87
3.1.3. Sensibilidad a suero no inmune .....	88
3.2. Ensayos de virulencia en modelos celulares de infección .....	89
3.2.1. Comportamiento en macrófagos J774.A1 .....	90
3.2.2. Comportamiento en células epiteliales HeLa .....	93
3.3. Evaluación en modelo murino de los mutantes atenuados $\Delta omp31\Delta cgs$ , $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ y $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$ en la dosis vacunal .....	98
4. Análisis en modelo murino del interés como vacuna del mutante atenuado más relevante .....	101
4.1. Respuesta inmune inducida por el mutante $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ .....	101
4.1.1. Análisis de las subclases de IgG frente a <i>B. ovis</i> PA .....	101
4.1.2. Análisis de la producción de citocinas tras un segundo estímulo <i>in vitro</i> con <i>B. ovis</i> PA .....	102
4.2. Evaluación de la protección conferida por el mutante $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ frente a la infección experimental por <i>B. ovis</i> PA .....	104

## **DISCUSIÓN**

---

1. Construcción, caracterización y evaluación de la virulencia de los mutantes $\Delta bepC$ y $\Delta ugpB$ de <i>B. ovis</i> PA .....	107
1.1. El gen <i>bepC</i> .....	107
1.2. El gen <i>ugpB</i> .....	110
2. Construcción y evaluación preliminar de un panel de mutantes múltiples de <i>B. ovis</i> PA en genes relacionados con la membrana externa .....	111
2.1. Los genes de las lipoproteínas Omp10 y Omp19 y de las proteínas mayoritarias Omp25 y Omp31 en la estabilidad de la ME de <i>B. ovis</i> .....	111
2.2. Selección de mutantes múltiples de interés .....	113
3. Estudio de las propiedades de la membrana externa y de la virulencia en modelos celulares y en ratón de los mutantes seleccionados tras la caracterización preliminar .....	114
3.1. Propiedades de la membrana externa .....	114
3.2. Ensayos de virulencia en modelos celulares de infección .....	115
3.3. Evaluación en modelo murino de los mutantes atenuados $\Delta omp31\Delta cgs$ , $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ y $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$ en la dosis vacunal .....	117
3.4. Respuesta inmune humoral inducida por los mutantes $\Delta omp31\Delta cgs$ , $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ y $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$ .....	119
4. Análisis en modelo murino del interés como vacuna del mutante atenuado más relevante .....	120
4.1. Respuesta inmune inducida por el mutante $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ .....	121
4.2. Evaluación de la protección conferida por el mutante $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ frente a la infección experimental por <i>B. ovis</i> PA .....	123

**CONCLUSIONES**

---

Conclusiones ..... 127

**CONCLUSIONS**

---

Conclusions ..... 131

**BIBLIOGRAFÍA**

---

Bibliografía ..... 135

**APÉNDICE**

---

I. Abreviaturas utilizadas ..... I

# **Resumen**



*Brucella ovis* produce una enfermedad infecciosa en el carnero caracterizada por la presencia de epididimitis y descenso de la fertilidad, causando elevadas pérdidas económicas en el sector ganadero y para la que no existe una vacuna específica disponible. *B. melitensis* Rev1, empleada en la prevención de la brucelosis causada por *B. melitensis* en ganado ovino y caprino, es la vacuna viva atenuada considerada más eficaz frente a la infección heteróloga por *B. ovis* en ganado ovino. Sin embargo, la vacunación de los animales con *B. melitensis* Rev1, que posee un lipopolisacárido liso (S-LPS), induce la producción de una respuesta de anticuerpos frente a las cadenas O del S-LPS que es indistinguible de los generados por la infección activa ya que son los detectados mayoritariamente en las pruebas de diagnóstico serológico de las infecciones ocasionadas por cepas lisas de *Brucella*. Debido a esta interferencia en el diagnóstico serológico, se prohíbe el uso de *B. melitensis* Rev1 en países o regiones consideradas libres de infecciones por *B. melitensis*. En base a estos aspectos, el desarrollo de vacunas específicas frente a *B. ovis*, como alternativa a *B. melitensis* Rev1 y que permitan la diferenciación serológica entre animales vacunados e infectados (DIVA) presenta gran interés. Considerando que, por su mayor eficacia, las vacunas empleadas frente a otras especies de *Brucella* son vacunas vivas atenuadas homólogas, es muy probable que una vacuna atenuada homóloga sea también el mejor candidato para la prevención de infecciones por *B. ovis*.

Para el desarrollo de este tipo de vacunas, un aspecto fundamental es el estudio de los factores de virulencia de *B. ovis* que hasta el momento han sido poco analizados. *B. ovis* posee un lipopolisacárido rugoso caracterizado por la ausencia de cadenas O (R-LPS) y carece de potencial zoonótico. La ausencia de S-LPS en *B. ovis* supone un primer rasgo diferencial con las especies zoonóticas más relevantes del género ya que las cadenas O son esenciales para la virulencia de estas últimas, mientras que *B. ovis* es virulenta tanto en su hospedador preferente como en modelos animales. En este trabajo se ha estudiado el papel de los genes *bepC* y *ugpB* en la fisiología y virulencia de la cepa *B. ovis* PA. Ambos genes se han relacionado con mecanismos extracelulares de virulencia en *B. suis* 1330, particularmente con resistencia a sales biliares y adhesión bacteriana, respectivamente. En este trabajo se ha comprobado que la inactivación de los genes *bepC* y *ugpB* no afecta a la virulencia de *B. ovis* PA en modelo murino, y que éstos no se relacionan con la supervivencia bacteriana en el interior de macrófagos y células epiteliales o con propiedades de la membrana externa (ME). Estas evidencias ponen de manifiesto diferencias entre la especie naturalmente rugosa *B. ovis* y la especie lisa *B. suis*.

En este trabajo se ha obtenido un amplio panel de mutantes múltiples de *B. ovis* PA, combinando genes relacionados con la ME, elemento clave en la virulencia de *Brucella*. Dentro de las proteínas expuestas en la superficie celular de *Brucella* se encuentran, de manera minoritaria, las lipoproteínas Omp10 y Omp19, junto con las proteínas mayoritarias Omp25 y Omp31. Si bien su implicación en la virulencia de las distintas especies de este género no está claramente delimitada, se considera que estos elementos contribuyen de forma relevante al mantenimiento de la integridad de la ME. Tras numerosos intentos, no fue posible la obtención de mutantes dobles en los genes *omp25* y *omp31*, y en los genes *omp10* y *omp19* de *B. ovis* PA. Estos resultados sugieren que la ausencia simultánea de las proteínas Omp25 y Omp31, y de las lipoproteínas Omp10 y Omp19 podría provocar graves defectos en la ME que impiden la supervivencia de *B. ovis* PA. Así mismo, en el análisis de la topología de la envuelta celular se observó que la ausencia de los genes *omp31* y *omp19* provoca alteraciones en el perfil de reactividad de anticuerpos monoclonales que afectan al menos a las proteínas Omp25 y BP26, respectivamente. También se observaron importantes defectos en la penetración en células epiteliales HeLa del mutante doble en los genes *omp25* y *omp25c* que codifican proteínas mayoritarias en la ME de *B. ovis*, aunque estos genes no están implicados individual, ni conjuntamente en la virulencia de esta cepa en modelo murino.

La combinación de mutaciones en genes relacionados con la ME condujo a la obtención de mutantes atenuados en modelo murino, entre los que se seleccionaron los candidatos  $\Delta omp31\Delta cgs$ ,  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$ , los cuales están marcados con la ausencia del gen de la proteína Omp31 que es un antígeno inmunodominante en la infección por *B. ovis* y que presenta interés para la diferenciación diagnóstica serológica entre la cepas vacunales y las cepas virulentas. En todas ellas se observaron importantes alteraciones en las propiedades de la ME y en la supervivencia en el interior de macrófagos J774A.1 y células epiteliales HeLa que podrían explicar, al menos en parte, su atenuación. El mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  presentó un adecuado perfil de persistencia e indujo una respuesta inmune protectora incluso superior a la vacuna heteróloga de referencia *B. melitensis* Rev1. Considerando la protección conferida en modelo murino, junto con el interés del marcaje diferencial de la cepa vacunal, la vacuna homóloga *B. ovis*  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  facilitaría, por un lado, la diferenciación serológica de las infecciones causadas por cepas lisas de *Brucella* y, por otro, aportaría una ventaja adicional en las campañas de control y erradicación de la infección por *B. ovis* debido a la ausencia de Omp31. En base a lo expuesto anteriormente, el mutante atenuado  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  de *B. ovis* PA constituye un interesante candidato a evaluar en carneros como vacuna homóloga específica frente a la epididimitis contagiosa ocasionada por *B. ovis*.

# **Abstract**



*Brucella ovis*, for which a specific vaccine is not available, produces an infectious disease in rams characterized by epididymitis and a drop in fertility, which in turn causes important economic losses in the livestock sector. *B. melitensis* Rev1, employed in the prevention of ovine and caprine brucellosis, is the live attenuated vaccine considered most efficient against the heterologous infection of *B. ovis* in ovine livestock. However, vaccination of animals with *B. melitensis* Rev1, which possess a smooth lipopolysaccharide (S-LPS), induces the production of an antibody response against the O chains of the S-LPS which is indistinguishable from that generated by the active infection as the serological diagnostic tests of the infections caused by smooth strains of *Brucella* mainly detect these antibodies. Given this interference in the serological diagnosis, the use of the *B. melitensis* Rev1 is banned in countries or regions considered free from *B. melitensis* infections. Based on these aspects, the development of specific vaccines against *B. ovis*, as alternative to *B. melitensis* Rev1, that allows the serological differentiation between vaccinated and infected animals (DIVA) is of great interest. Considering that, because of their greater efficiency, the vaccines employed against other species of *Brucella* are homologous live attenuated vaccines, it is very probable that a live attenuated homologous vaccine is also the best candidate for the prevention of *B. ovis* infections.

For the development of this type of vaccine, a fundamental issue is the study of the virulence factors of *B. ovis*, which so far have been studied very little. *B. ovis* possesses a rough lipopolysaccharide characterised by the absence of O chains (R-LPS) and lacks zoonotic potential. The absence of S-LPS in *B. ovis* is a first differential feature with the more relevant zoonotic species of the genus, given that the O chains are essential for the virulence in the former, while *B. ovis* is virulent in its preferred host and in animal models. In this work, the role of the genes *bepC* and *ugpB* in the physiology and virulence of the strain *B. ovis* PA was studied. Both genes have been connected with extracellular virulence mechanisms in *B. suis* 1330, particularly with biliary salts and bacterial adhesion, respectively. In this work, it has been demonstrated that the inactivation of the genes *bepC* and *ugpB* does not affect the virulence of *B. ovis* PA in the mouse model, and that they are not related to the bacterial survival within macrophages and epithelial cells, nor to properties of the outer membrane (OM). This results evidence new differences between naturally rough *B. ovis* and smooth *B. suis*.

In this work, a broad panel of mutants of *B. ovis* PA was obtained, combining genes related with the OM, a key element in the virulence of *B. ovis*. The lipoproteins Omp10 and Omp19, together with the major proteins Omp25 and Omp31 are exposed on the surface of *Brucella*. Although their involvement in the virulence of the different species of this genus is not clearly defined, these elements are considered to contribute in a relevant manner to maintain the integrity of the OM. After numerous attempts, it was not possible to obtain double mutants in the genes *omp25* and *omp31*, nor in the genes *omp10* and *omp19* of *B. ovis* PA. These results suggest that the simultaneous absence of the proteins Omp25 and Omp31, and that of the lipoproteins Omp10 and Omp19, could cause serious defects in the OM that hamper the survival of *B. ovis* PA. Additionally, in the topological analysis of the cellular envelope it was observed that the absence of the genes *omp31* and *omp19* provoked alterations in the reactivity pattern with monoclonal antibodies, which affect at least the proteins Omp25 and BP26, respectively. Important defects in the penetration in HeLa epithelial cells of the double mutant in *omp25* and *omp25c* genes, which encode major proteins of the OM of *B. ovis*, were observed, although those genes are not involved either individually or together in the virulence of this strain in the mouse model.

The combination of these mutations in genes related with the OM lead to the generation of attenuated mutants in the mouse model, among which the candidates  $\Delta omp31\Delta cgs$ ,  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  and  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  were selected. These mutants are marked by the absence of the gene for the protein Omp31, which is an immunodominant antigen in the infection by *B. ovis* and that may be useful in the serological diagnostic differentiation between the vaccine strains and the virulent strains. In all of these strains, important alterations were observed in the OM properties and in the survival within J774A.1 macrophages and HeLa epithelial cells, which could, at least in part, explain their attenuation. The mutant  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  presented an adequate persistence and lead a protector immune response even greater than that conferred by the heterologous reference vaccine *B. melitensis* Rev1. Considering the protection observed in the mouse model, together with the differential labeling of the vaccine strain, the homologous vaccine *B. ovis*  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  would facilitate, on one hand, the serological differentiation of the infections caused by *Brucella* smooth strains and, on the other hand, would contribute an additional advantage to the control and eradication campaigns of *B. ovis* infection due to the absence of Omp31. Based on the aforementioned, the  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  attenuated mutant of *B. ovis* PA constitutes an interesting candidate to be evaluated in rams as a specific homologous vaccine against contagious epididymitis caused by *B. ovis*.



# **Introducción**



## 1. El género *Brucella* y la brucelosis

El género *Brucella* está formado por bacterias Gram negativas con morfología cocobacilar, no móviles, y no encapsuladas. Su temperatura óptima de crecimiento es de 36-38 °C, pero pueden crecer en un intervalo de entre 20 y 40°C. Son microorganismos aerobios y algunas de las especies requieren una atmósfera con un 5-10 % de CO<sub>2</sub> para su crecimiento. El género fue descrito por primera vez en 1920 por Meyer y Shaw (Meyer & Shaw., 1920; Corbel & Brinley-Morgan., 1984) y debe su nombre al médico militar Sir David Bruce quien, junto a sus colaboradores, fue el primero en aislar un microorganismo de los que componen este género, a partir de bazos de soldados fallecidos en la isla de Malta. El agente causal fue entonces denominado *Micrococcus melitensis* y el médico Themistocles Zammit determinó como fuente del contagio, el consumo de productos derivados de leche de cabra entre las tropas militares presentes en la isla (Pappas *et al.*, 2006).

Los microorganismos del género *Brucella* son parásitos intracelulares facultativos que infectan una amplia variedad de mamíferos, desde terrestres hasta marinos (Scholz *et al.*, 2012). De manera general, la infección en animales se caracteriza por la aparición de aborto e infertilidad y en el hombre por un proceso septicémico febril recurrente (también conocido como Fiebre de Malta o fiebre ondulante). El término brucelosis se emplea para describir la infección causada por microorganismos de este género en animales y en humanos, y constituye una de las zoonosis de mayor distribución e importancia a nivel mundial.

El género *Brucella* pertenece a la familia *Brucellaceae*, incluida dentro del orden *Rhizobiales*, clase *Alphaproteobacteria* (Scholz *et al.*, 2012). Dentro de la familia *Brucellaceae* se encuentran actualmente incluidos siete géneros: *Crabtreeella*, *Daeguia*, *Mycoplana*, *Ochrobactrum*, *Paenochrobactrum* y *Pseudochrobactrum* (Kämpfer *et al.*, 2014). Dentro de ellos, el género *Ochrobactrum*, constituido por especies saprófitas, patógenos ocasionales de humanos (Holmes *et al.*, 1988), representa el vecino más cercano filogenéticamente de *Brucella*. Las alfaproteobacterias son un grupo de bacterias ecológicamente diverso y entre sus miembros se encuentran microorganismos patógenos y simbiontes de plantas (como *Agrobacterium*, *Rhizobium* y *Mesorhizobium*) y patógenos de animales (como *Bartonella*, *Rickettsia* y *Ehrlichia*). Muchos de los representantes pertenecientes a esta clase han evolucionado desde una forma de vida libre, siendo capaces de sobrevivir en el ambiente, hacia un tipo de vida intracelular. Esta adaptación al medio intracelular se ha asociado, en algunos de sus miembros, con una pérdida de genes no necesarios en este entorno tan especializado (Ficht., 2010).

El genoma de *Brucella* posee características que lo diferencian de varios de los miembros de su orden. En concreto, posee dos cromosomas circulares (a excepción de *B. suis* biovar 3 que solo tiene uno) con un tamaño aproximado de 2,2 Mb (Cr. I) y 1,1 Mb (Cr. II), contrastando con el genoma de cromosoma único de muchas de muchas de las bacterias del orden *Rhizobiales* (Michaux-Charachon *et al.*, 1997; Cloeckert & Vizcaíno., 2005). Adicionalmente, carece de plásmidos, en contraste con su vecino filogenético *O. anthropi* que posee cuatro de estos elementos extracromosómicos (Chain *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de la pérdida de genes innecesarios, *Brucella* ha ganado genes de virulencia y posee, por ejemplo, un genoma de tamaño relativamente mayor (50-100%) con respecto al de *Bartonella* (también patógeno intracelular facultativo) (Ficht., 2010). Esto sugiere el potencial de existir en ambientes diversos y/o la capacidad de adaptarse a diversos hospedadores.

El inicio de la taxonomía de este género comenzó en 1920 con la inclusión, por Meyer y Shaw, de dos especies; *B. melitensis* (nombre que hace referencia a la Isla de Malta), patógena principalmente de cabras y ovejas, como la especie tipo del género y *B. abortus* especie patógena cuyo nombre hace referencia a los abortos que ocasiona en el ganado bovino. Más tarde, se añadieron *B. suis* (Huddleson., 1929), patógeno de ganado porcino y pequeños roedores, y *B. ovis* (Buddle., 1956), patógena del ganado ovino. En 1957 se incorporaron *B. neotomae*, aislada de la rata desértica *Neotoma lepida* (Stoenner & Lackman., 1957) y en 1968, *B. canis* (Carmichael & Bruner., 1968), patógena de cánidos. *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* se subdividen también en biovariedades atendiendo, entre otras, a características antigénicas del lipopolisacárido (LPS) de membrana externa (ME) (Dubray & Limet., 1987; Alton *et al.*, 1998). Estas seis especies se siguen denominando a día de hoy como “especies clásicas de *Brucella*”, descritas y clasificadas inicialmente en función de rasgos fenotípicos y según la preferencia de hospedador mostrada. Con el avance del conocimiento en biología molecular y a la

## 2 Introducción

vista del elevado porcentaje de homología a nivel genético que mostraban estas especies clásicas, (>90 % en estudios de hibridación ADN-ADN e indistinguibles a nivel de la secuencia del 16S rRNA), se llegó a incluir a todas en un mismo género, *B. melitensis*, con diferentes biovariedades (Verger *et al.*, 1985). Sin embargo, el modelo de especie única no reflejaba completamente las diferencias observadas en patogenicidad, ni de preferencia de hospedador y debido a la gran difusión y utilidad epidemiológica de la anterior clasificación, esta no llegó a ser abandonada completamente por la comunidad científica. Además, el desarrollo de métodos moleculares basados en el ADN, permitió encontrar marcadores capaces de diferenciar las distintas especies e incluso biovariedades (Vizcaíno *et al.*, 2000). Así, atendiendo a características fenotípicas y moleculares existentes entre las distintas especies, el Comité de Taxonomía de *Brucella* en 2006 propuso el retorno a la antigua clasificación (Osterman & Moriyón., 2006).

Hasta el siglo XXI el género se mantuvo sin modificaciones, pero a inicios del mismo, empezaron a incluirse nuevas especies aisladas de mamíferos no terrestres. Estas, aisladas ya en 1994 (Ross *et al.*, 1994), se identificaron como pertenecientes a la familia *Brucellaceae* en base a pruebas de caracterización fenotípica clásicas (actividad ureasa y otras pruebas bioquímicas, crecimiento en presencia de determinados colorantes, lisis por bacteriófagos y aglutinación con sueros monoespecíficos anti-LPS). Sin embargo, estos microorganismos exhibían características genéticas y moleculares que no eran asimilables a las mostradas por las especies clásicas. Finalmente, el género se amplió en 2007 con la inclusión de dos nuevos miembros aislados de mamíferos marinos: *B. ceti*, y *B. pinnipedialis*, aisladas fundamentalmente de cetáceos y pinnípedos, respectivamente (Clockaert *et al.*, 2001 b; Jacques *et al.*, 2007; Foster *et al.*, 2007). La lista de especies continuó creciendo con otros microorganismos aislados de hospedadores no convencionales, como *B. microti*, aislada del suelo, del topillo común y de zorros (Scholz *et al.*, 2008 a, 2008 b, 2009), la cual posee características bioquímicas especialmente diferentes a las de otras especies de *Brucella*. Así mismo, se incluyó en el género a *B. inopinata*, aislada de un implante mamario y de una biopsia pulmonar de un paciente con neumonía obstructiva crónica, aunque se desconoce su reservorio natural (Scholz *et al.*, 2010; Tiller *et al.*, 2010), siendo en aquel momento la especie más divergente del género a nivel filogenético. Las especies más recientes, hasta el momento, incorporadas al género son *B. papionis* (Whatmore *et al.*, 2014) y *B. vulpis* (Scholz *et al.*, 2016), las cuales han sido aisladas de primates y zorros, respectivamente. Más recientemente se han aislado cepas a partir de ranas del continente africano que comparten elevada similitud con *Brucella* (Eisenberg *et al.*, 2012; Fischer *et al.*, 2012) y de entre cuyas características destaca la presencia de un flagelo polar. Las cepas aisladas de anfibios podrían representar las primeras especies de *Brucella* móviles (Eisenberg *et al.*, 2012), aunque todas las cepas de *Brucella* están equipadas de genes del aparato flagelar (Kämpfer *et al.*, 2014), observándose bajo determinadas condiciones, la formación de un flagelo funcional (Fretin *et al.*, 2005).

A pesar de la similitud a nivel genético en términos globales que poseen los microorganismos de este género, la aparición de nuevas especies, junto con la secuenciación de varios genomas completos de *Brucella* y el análisis de la información contenida en ellos, continúan sumando evidencias acerca de la existencia de diferencias entre los miembros de este género (Chain *et al.*, 2005). Aunque estas diferencias continúan siendo menores que las existentes dentro de otros géneros, parecen estar relacionadas con los cambios adaptativos ocurridos a lo largo del tiempo (Ficht., 2010). Así, *Brucella* posee una capacidad muy limitada de permanecer en el ambiente, encontrándose normalmente asociada a especies muy concretas de hospedadores. Esta estrecha coevolución de las especies de *Brucella* con sus hospedadores preferentes no parece haber seguido un patrón evidente y además, parece haber ocurrido de manera relativamente rápida y reciente en el tiempo. Así, estudios filogenéticos recientes (Wattam *et al.*, 2014) dividen el género *Brucella* en dos grupos: el de las especies descritas recientemente (cepas “atípicas”), las cuales parecen haber divergido antes a nivel evolutivo y las más conservadas (cepas “clásicas”), grupo que posee el mayor número de especies patógenas. Diferentes eventos moleculares, como la transferencia horizontal de genes, han permitido a *Brucella* la incorporación de elementos que contribuyeron presumiblemente a la aparición de diferencias con respecto a su ancestro común, *Ochrobactrum*, las cuales parecen haberle permitido dar un paso más en el camino hacia el desarrollo de patogenicidad (Wattam *et al.*, 2014).

Como se ha mencionado, cada especie del género *Brucella* muestra una marcada preferencia de hospedador primario al que infecta, estableciendo infecciones crónicas y manteniendo el ciclo de transmisión/infección en especies muy concretas, aunque también puede infectar a hospedadores secundarios. Salvo *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. microti* y las biovariedades 2 y 5 de *B. suis*, el resto de especies clásicas se han aislado de humanos, pero se desconoce el potencial zoonótico de las nuevas especies (Godfroid *et al.*, 2011). *B. melitensis* es la especie de mayor potencial zoonótico, seguida de *B. abortus* y *B. suis* (Godfroid *et al.*, 2005).

La brucelosis como zoonosis es una enfermedad de la que no existe evidencia de su transmisión persona-persona, siendo el animal (salvaje o doméstico) el principal reservorio. La infección en humanos (causada generalmente por *B. melitensis*) se caracteriza por la presencia de síntomas no específicos, como episodios recurrentes de fiebre, sudoración, cefalea, artralgias, esplenomegalia, hepatomegalia y linfadenopatías (Corbel., 1990; Xavier *et al.*, 2010 a). También se han descrito algunas complicaciones más graves como neurobrucelosis, endocarditis o abscesos hepáticos (Hartigan., 1997; Franco *et al.*, 2007). Se trata de una enfermedad debilitante, raramente mortal, en la que los síntomas agudos pueden llegar a persistir durante periodos de incluso un año, llegando así a cronificarse (Castaño & Solera., 2009). La vía más común de infección en humanos es por ingestión de derivados lácteos contaminados, especialmente queso sin pasteurizar. El control de la infección requiere de tratamiento antibiótico prolongado y no existen vacunas disponibles en humanos (Pappas *et al.*, 2006).

En general, la infección por las especies “clásicas” de *Brucella* en animales provoca, entre otros, problemas de fertilidad en los machos, pérdida de peso, menor producción de leche en las hembras y abortos. Por ello, la brucelosis causa importantes pérdidas económicas en las cabañas ganaderas, especialmente en países o regiones dedicadas a la explotación de ganado susceptible o de países en los que las medidas de control de la enfermedad en animales son deficientes. Entre los lugares de alta prevalencia de brucelosis a nivel mundial (haciendo referencia a la infección causada por *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*) se encuentran regiones de Oriente Medio, países de la cuenca Mediterránea, Mongolia, Rusia, Asia, África, así como América Central y del Sur (Godfroid *et al.*, 2005). Debido al considerable potencial zoonótico de *Brucella*, el control y la erradicación de la brucelosis en animales tiene importantes implicaciones a nivel de Sanidad Pública. Entre las medidas de prevención y control de la brucelosis animal se encuentra la vacunación, siendo las vacunas vivas atenuadas (VVA) las más empleadas (principalmente *B. abortus* S19 y RB51, para ganado bovino y *B. melitensis* Rev1, para pequeños rumiantes) (WHO, 2006). Estas vacunas, pese a ser efectivas, presentan una serie de limitaciones (entre otras y dependiendo de la vacuna: potencial abortivo, interferencia en el diagnóstico serológico diferencial de animales vacunados/infectados por especies lisas de *Brucella* y/o riesgos de infección humana en la manipulación) sobre las que actualmente se realizan esfuerzos a nivel científico para paliarlas.

## 2. La membrana externa de *Brucella*

*Brucella* es un patógeno intracelular facultativo capaz, no solo de sobrevivir dentro de las células de su hospedador, sino también de replicarse dentro de ellas, siendo su presencia extracelular accidental (Moreno & Moriyón., 2002). La ME de las bacterias que establecen interacciones con células hospedadoras puede observarse desde un punto de vista dual: para la bacteria constituye una barrera protectora de primera línea frente a las agresiones de un medio hostil, como es el intracelular, y para el organismo hospedador la ME es una estructura accesible y reconocible por sus mecanismos de defensa. La ME es, pues, un elemento clave en el establecimiento de las interacciones entre el patógeno y el hospedador.

La ME de *Brucella* (**Figura 1**), como la de otras bacterias Gram negativa, es una bicapa lipídica asimétrica constituida por el lipopolisacárido (LPS) dispuesto en la cara externa, fosfolípidos (PLs) y proteínas de ME (OMPs) (Vizcaíno & Cloeckert., 2012). Sin embargo, la ME de *Brucella* ha ido evolucionando incorporando modificaciones que le confieren características peculiares y que se describen a continuación.

## 4 Introducción

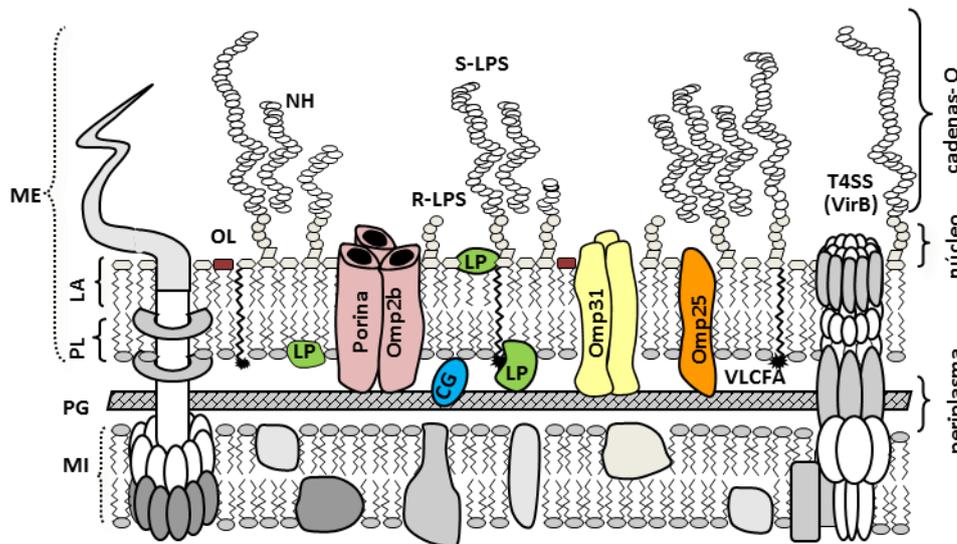


Figura 1. Esquema de la ME de una cepa lisa de *Brucella* spp. Tomado y modificado de Vizcaíno & Cloeckert, 2012.. MI; membrana interna; CβG; β1,2 glucanos cíclicos, LA; lípido A, LP; lipoproteínas, NH; hapteno nativo, OL; lípido de ornitina, PL; fosfolípidos, PG; peptidoglucano, R-LPS; lipopolisacárido en fase rugosa, S-LPS; lipopolisacárido en fase lisa, T4SS; sistema de secreción tipo IV, VLCFA; ácido graso de cadena muy larga.

### 2.1. Fosfolípidos

Aunque la composición en fosfolípidos (PLs) de la ME de *Brucella* no ha sido determinada específicamente, análisis de células enteras de *B. abortus* y *B. melitensis* mostraron que los principales fosfolípidos en estas dos especies son: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, difosfatidilglicerol y fosfatidilglicerol (Vizcaíno & Cloeckert., 2012). Los dos primeros son más abundantes e importantes para la virulencia en *B. abortus* (Conde-Álvarez *et al.*, 2006; Bukata *et al.*, 2008). La presencia de fosfatidilcolina como uno de los PLs mayoritarios en la ME de *Brucella* es un hecho singular, dado que es una molécula mayoritaria en la membrana de células eucariotas. A pesar de ello, la fosfatidilcolina se ha ido detectando cada vez con más frecuencia en diversas bacterias, concretamente en aquellas que establecen relaciones con células eucariotas, simbióticas o parasíticas, o aquellas capaces de producir infecciones persistentes (Sohlenkamp & Geiger., 2016). La ME también posee lípidos de ornitina, que no se han detectado en otros patógenos de animales. Sin embargo, al menos en *B. abortus*, estos lípidos no son imprescindibles para la virulencia ni para desencadenar la respuesta inmune innata en el hospedador (Palacios-Chaves *et al.*, 2011).

### 2.2. Lipopolisacárido

El lipopolisacárido (LPS) es el principal componente que posee *Brucella* en la ME. En el LPS se pueden diferenciar tres regiones: lípido A, insertado en la ME, un oligosacárido intermedio denominado núcleo, y las cadenas polisacáridicas O dispuestas hacia el exterior de la bacteria, pero que no están presentes en todos los organismos del género *Brucella*.

#### Lípido A

El lípido A es una molécula de naturaleza hidrofóbica, formada por un disacárido al que se le unen ácidos grasos y que muestra ciertas similitudes químicas con el lípido A de algunas de las alfa-proteobacterias con las que *Brucella* está relacionada filogenéticamente como por ejemplo, *Ochrobactrum* y *Mesorhizobium* (Moreno *et al.*, 1990). En la mayoría de bacterias Gram negativas está formado por un disacárido de glucosamina

bifosforilado con ácidos grasos (de C<sub>12</sub> a C<sub>14</sub>) en enlace éster o amida (Raetz *et al.*, 2007). Sin embargo, el lípido A de *Brucella* es un disacárido mono o bifosforilado de diaminoglucosa [2,3-diamino-2,3-didesoxi-D-glucosa, unida mediante enlace β-1,6], a la que se le unen β-hidroxiácidos de cadena muy larga (de C<sub>28</sub> a C<sub>30</sub>) (VLCFAs: *Very Long Chain Fatty Acids*) y otros ácidos grasos de cadena larga (Moreno *et al.*, 1990). Estos VLCFAs se disponen atravesando la ME, mostrando el grupo hidroxilo terminal en el espacio periplásmico, lo cual favorece probablemente un fuerte anclaje del LPS y la integridad de la ME (Velasco *et al.*, 2000; Iriarte *et al.*, 2005; Barquero-Calvo *et al.*, 2009). A pesar de que el esqueleto sacarídico del lípido A en Gram negativas parece mantenerse constante, no se ha detectado hasta el momento la presencia de etanolamina, arabinosamina, ni otros azúcares neutros, en *Brucella* (Freer *et al.*, 1995; Moriyón & López-Goñi., 1998). La heterogeneidad existente en esta parte del LPS suele residir en el grado de fosforilación y de sustitución en ácidos grasos que posee (Moriyón & López-Goñi., 1998).

### Núcleo

La región del LPS constituye el nexo entre el lípido A y la cadena O. En las especies naturalmente rugosas *B. canis* y *B. ovis* el núcleo es la parte más externa de la molécula del LPS, debido a que carecen de cadenas polisacáridicas O. Suele estar compuesto por una cadena de monosacáridos de diferentes características. En *B. abortus* está formado por ácido-2-ceto-3-desoxioctulosónico (KDO), glucosamina, quinovosamina, glucosa y manosa. Sin embargo, no se ha observado en su composición otros componentes comunes del núcleo de otras alfaproteobacterias, como heptosas, ortofosfatos o azúcares ácidos como el galacturónico (Iriarte *et al.*, 2005; Barquero-Calvo *et al.*, 2009). Se han descrito varios genes implicados en la síntesis de azúcares precursores del núcleo: entre ellos el gen *pgm* (fosfoglucomutasa) (Ugalde *et al.*, 2000), *manB<sub>core</sub>* y *manC<sub>core</sub>* (metabolismo de la manosa) (Monreal *et al.*, 2003; González *et al.*, 2008) y genes de transferasas de azúcares al núcleo (*wadA*, *wadB* y *wadC*) (Monreal *et al.*, 2003; González *et al.*, 2008; Conde-Álvarez *et al.*, 2013; Gil-Ramírez *et al.*, 2014).

El núcleo es una estructura bastante conservada dentro del género, si bien también existe cierta diversidad, como la observada entre *B. abortus* 2308 y *B. melitensis* 16M en su parte interna, mediante empleo de anticuerpos monoclonales (González *et al.*, 2008). La estructura completa del núcleo de *B. abortus* biovar 4, *B. melitensis* biovar 3 y *B. suis* biovar 4 ha sido determinada mediante resonancia magnética nuclear (Kubler-Kielb & Vinogradov., 2013 a), lo cual ha permitido, por un lado, confirmar la composición química previamente descrita, y por otro, verificar la existencia de una ramificación lateral de la cadena que se une con el polisacárido O (Conde-Álvarez *et al.*, 2012; Kubler-Kielb & Vinogradov., 2013 a; Gil-Ramírez *et al.*, 2014). Esta ramificación, en cuya síntesis están implicados los genes *wadB* y *wadC*, actúa como factor inmunomodulador, interfiriendo con el reconocimiento por parte de receptores del sistema innato del hospedador (Conde-Álvarez *et al.*, 2012). La inactivación de dichos genes en *B. abortus* y *B. melitensis* conduce a una atenuación en modelos de infección *in vitro* e *in vivo* (Conde-Álvarez *et al.*, 2012; Gil-Ramírez *et al.*, 2014; Fontana *et al.*, 2016). También se ha demostrado la necesidad de la presencia de un núcleo del LPS intacto para mantener la eficacia protectora de la vacuna rugosa *B. abortus* RB51 frente a la infección por *B. ovis* y *B. abortus* en ratón (Monreal *et al.*, 2003). Estudios recientes han demostrado que el núcleo del LPS es una estructura esencial para la supervivencia *in vivo* no solo para especies lisas de *Brucella*, sino también para las especies naturalmente rugosas como *B. ovis* (Soler-Lloréns *et al.*, 2014). Además, acorde con el papel inmunomodulador descrito para el núcleo, mutantes de *B. abortus* y *B. ovis* en los genes *wadB* y *wadC* son capaces de conferir protección frente a infecciones por especies homólogas en modelo murino (Conde-Álvarez *et al.*, 2013; Soler-Lloréns *et al.*, 2014).

### Cadenas polisacáridicas O

Estas moléculas, cuya existencia varía dentro del género, están compuestas por repeticiones de un azúcar. Según la presencia o ausencia de la cadena O en el LPS de las cepas *Brucella*, su estructura se denomina lisa (S-LPS) o rugosa (R-LPS) (Corbel., 1990). Así, *B. ovis* y *B. canis* son especies naturalmente rugosas, mientras que el resto de especies suelen incluir mayoritariamente cepas lisas (Vizcaíno & Cloeckert., 2012). Las cadenas O están constituidas por homopolímeros de N-formilperosaminas unidas mediante enlaces α (1-2) y α (1-3) y son el

## 6 Introducción

antígeno inmunodominante en el S-LPS (Fernández-Lago & Díaz., 1986; Alonso-Urmeneta *et al.*, 1998). La proporción de estos dos tipos de enlaces varía entre las especies de *Brucella*, según han mostrado estudios con anticuerpos monoclonales, dando lugar a la existencia de tres epítomos básicos dentro del género: i) epítomo A, aparece cuando las cadenas no tienen enlaces  $\alpha(1-3)$  o la proporción de  $\alpha(1-2)$  es predominantemente superior a los enlaces  $\alpha(1-3)$ ; ii) epítomo M, presente sólo en los polisacáridos con enlaces  $\alpha(1-3)$  y iii) el epítomo C (común a todos los tipos químicos de cadena O) (Cherwonogrodzky *et al.*, 1987; Douglas & Palmer., 1988; Perry & Bundle., 1990; Kubler-Kielb & Vinogradov., 2013 b). Además, existe un cuarto epítomo, denominado C/Y, que muestra reacciones serológicas cruzadas con otras especies que poseen derivados de la perosamina en la cadena O, especialmente con *Yersinia enterocolitica* O:9, pero también con varios serotipos de *Vibrio cholerae*, *E. coli* O:157:H7 y *Salmonella*, entre otras (Bundle *et al.*, 1984; Perry & Bundle., 1990; Vizcaíno *et al.*, 1991). Dentro del grupo de las denominadas cepas atípicas de *Brucella* (De *et al.*, 2008; Tiller *et al.*, 2010) se han observado diferencias en genes relacionados con la biosíntesis del S-LPS (Wattam *et al.*, 2012), las cuales redundan en la composición química respecto a la de las especies clásicas (Wattam *et al.*, 2014). En concreto, *B. inopinata* BO2 posee un S-LPS con una cadena O basada en ramnosa (Wattam *et al.*, 2012) que no aglutina con sueros monoespecíficos frente a los epítomos A, ni M y muestra un perfil en tinción de plata similar al del S-LPS de enterobacterias (Zygmunt *et al.*, 2012).

Las cadenas polisacáridicas O del S-LPS se consideran esenciales para la virulencia de las cepas lisas de *Brucella*, puesto que mutantes rugosos obtenidos *in vitro* a partir de cepas virulentas naturalmente lisas, presentan atenuación en modelos animales (Allen *et al.*, 1998; Godfroid *et al.*, 1998; Foulongne *et al.*, 2000; Lacerda *et al.*, 2010). En estos estudios se han identificado genes implicados en la biosíntesis de la cadena O del LPS, los cuales se encuentran localizados en dos loci diferentes: el locus *wbk* y el locus *wbo*. En las especies *B. canis* y *B. ovis* se ha demostrado la existencia de deleciones en genes situados en estos loci, lo cual se relaciona con su fenotipo rugoso (Vizcaíno *et al.*, 2004; González *et al.*, 2008). Pese a la ausencia de cadenas O en estas especies rugosas, *B. ovis* y *B. canis* son virulentas tanto en sus hospedadores preferentes (carneros y perros, respectivamente) como en modelos de experimentación animal, e incluso *B. canis* ha mostrado ser virulenta en humanos (Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2010; Barkha *et al.*, 2011; Martín-Martín *et al.*, 2012; Dentinger *et al.*, 2015).

Además de las cadenas O, se ha descrito la presencia de otro polisacárido en la ME de especies lisas de *Brucella*, denominado hapteno nativo, el cual tiene una composición química idéntica a dichas cadenas (polisacárido de N-formilperosamina, que carece del núcleo oligosacárido) (Aragón *et al.*, 1996). Existe controversia acerca su presencia como molécula independiente, ya que se ha considerado como un posible artefacto obtenido durante el proceso de hidrólisis del S-LPS para la obtención de las cadenas O (Zygmunt *et al.*, 1998).

### 2.3. Proteínas de la membrana externa (OMPs)

La ME de *Brucella* se encuentra principalmente compuesta, a parte del LPS, de OMPs, mostrando un perfil proteico más complejo que el de enterobacterias como *E. coli* (Moriyón & López-Goñi., 1998). En la década de 1980 se identificaron 3 grupos de OMPs según su masa molecular y, dependiendo de su abundancia relativa, se clasificaron en proteínas mayoritarias y minoritarias (Cloekaert *et al.*, 2002 b; Vizcaíno & Cloekaert., 2012): i) grupo 1 en el que se encuentra la proteína minoritaria Omp89 u Omp1, de masa molecular entre 88-94 kDa; ii) grupo 2 donde se sitúa la proteína mayoritaria Omp2b (36-38 kDa) y iii) grupo 3 al que pertenecen proteínas mayoritarias Omp25 (25-27 kDa) y Omp31 (31-34 kDa). Dentro de este tercer grupo se encuentran siete proteínas homólogas entre sí (incluyendo las dos anteriores), que conforman la familia Omp25/Omp31.

Las OMPs mayoritarias de *Brucella* se detectaron inicialmente en la fracción insoluble de la pared celular, durante la extracción de ésta con SDS (Dubray & Charriaut., 1983). Estas proteínas se encuentran fuertemente asociadas al PG (Cloekaert *et al.*, 1992), lo cual parece proporcionar estabilidad a la ME. Mediante estudios de reactividad con anticuerpos y diferentes técnicas inmunológicas como el Western Blot, ELISA o la citometría de flujo, se ha evidenciado la exposición de OMPs mayoritarias en la superficie de *Brucella* spp. y también su

translocación a la ME de cepas recombinantes de *E. coli* (Marquis & Ficht., 1993; Bowden *et al.*, 1995 b; Vizcaíno *et al.*, 1996 a, 2001 b). Sin embargo, mediante estas mismas técnicas, se ha descrito un menor acceso de los anticuerpos a las OMPs presentes en cepas lisas de *Brucella*, en contraste con la mayor reactividad en cepas rugosas. Este hecho se atribuye al impedimento estérico ocasionado por las cadenas O del S-LPS (Clockaert *et al.*, 1991; Bowden *et al.*, 1995 a).

La ME de las bacterias Gram negativas constituye una barrera permeable a diferentes moléculas, cuyo paso a través de la misma puede estar controlado por diferentes OMPs. En este sentido, las porinas (proteínas integrales de membrana) juegan un papel importante en la difusión de diferentes compuestos (azúcares, inones, aminoácidos) a través de la ME de las bacterias Gram negativas (Nikaido., 2003) y también están representadas en la ME de *Brucella*. Los genes *omp2a* y *omp2b* (Ficht *et al.*, 1988, 1989) comparten un elevado grado de identidad (>85%), se encuentran orientados de manera opuesta en el genoma de *Brucella* y están separadas por tan solo 830 pb (Marquis & Ficht., 1993). Esta región presenta cierto grado de polimorfismo, por lo que ambos genes han sido muy utilizados en la tipificación molecular de especies y biovariedades de *Brucella* (Ficht *et al.*, 1990; Vizcaíno *et al.*, 2000; Paquet *et al.*, 2001; Whatmore *et al.*, 2014). Las secuencias de ambos genes codifican proteínas con actividad porina que están constituidas por 16 dominios transmembrana y ocho bucles orientados hacia la cara exterior de la ME (Mobasher *et al.*, 1997; Paquet *et al.*, 2001). Sin embargo, pese a que ambos genes han sido clonados y expresados en *E. coli*, no hay evidencia de que la proteína Omp2a se sintetice en *Brucella* (Vizcaíno & Clockaert., 2012). También se han descrito características estructurales relacionadas con porinas en la proteína mayoritaria Omp31 (Vizcaíno *et al.*, 1996 b), aunque no se ha llegado a estudiar su funcionalidad a este respecto.

También expuestas en la superficie celular se encuentran proteínas minoritarias como las lipoproteínas Omp10, Omp16 y Omp19 (Clockaert *et al.*, 1990; Tibor *et al.*, 1999). Estas proteínas están conservadas a lo largo del género *Brucella* (Vizcaíno *et al.*, 2000) y muestran también un bajo grado de polimorfismo respecto a proteínas ortólogas descritas en *O. anthropi* (Barquero-Calvo *et al.*, 2009). Entre otras OMPs minoritarias identificadas en el género *Brucella* se encuentran componentes de la estructura flagelar y el sistema de secreción Tipo IV (codificado por el operón *virB*) esencial en el tráfico intracelular de *Brucella* (**Figura 1**) (Vizcaíno & Clockaert., 2012). Así mismo, se han descrito OMPs implicadas en el transporte de grupos hemo (BhuA) (Paulley *et al.*, 2007), manganeso (MnTH) (Anderson *et al.*, 2009) o en la resistencia a compuestos biliares como la proteína BepC, homóloga de TolC (Posadas *et al.*, 2007). También se han descrito diversas proteínas implicadas en procesos de adhesión como SP41 (Castañeda-Roldán *et al.*, 2006) o BigA (Czibener *et al.*, 2015), junto con autotransportadores como BmaC (Posadas *et al.*, 2012), BtaF (Ruiz-Ranwez *et al.*, 2013 a) o BtaE (Ruiz-Ranwez *et al.*, 2013 b) relacionados con esta misma función.

Por su interés en este trabajo, las proteínas BepC y SP41 se detallan en el **Apartado 3** de esta Introducción. A continuación se describen la familia Omp25/Omp31 y las lipoproteínas Omp10, Omp16 y Omp19 como proteínas de la ME de *Brucella* de interés en este trabajo.

### 2.3.1. Familia Omp25/Omp31

La familia Omp25/Omp31 de *Brucella* está compuesta por las proteínas homólogas Omp22, Omp25, Omp25b, Omp25c, Omp25d, Omp31 y Omp31b, las cuales se encuentran asociadas al PG de la pared celular. Los 7 miembros de esta familia están desigualmente distribuidos en la ME de las diferentes especies de *Brucella*, presentando polimorfismo a nivel de la secuencia genética (Salhi *et al.*, 2003; Vizcaíno *et al.*, 2004; Martín-Martín *et al.*, 2009). Todas ellas poseen una estructura proteica de barril  $\beta$ , con un péptido señal en el extremo amino-terminal (N-terminal) y un aminoácido fenilalanina en el extremo carboxi-terminal (C-terminal) (de Wergifosse *et al.*, 1995; Vizcaíno *et al.*, 1996 b; Salhi *et al.*, 2003). Dichas características, además de la presencia de dominios anfipáticos en las láminas  $\beta$ , permiten alcanzar el grado de solubilización necesario para la translocación de estas proteínas desde el citoplasma, donde se sintetizan, a la ME en las bacterias Gram negativas (Pugsley., 1993; Koebnik *et al.*, 2000).

### Omp25

Esta proteína está formada por ocho láminas  $\beta$  transmembrana conectadas de manera alternativa por giros cortos en el periplasma o por cuatro largos bucles en la cara exterior (Cloekaert *et al.*, 2002 b). La proteína Omp25 se ha detectado en las seis especies clásicas de *Brucella* (Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2009). A pesar del elevado grado de conservación de esta proteína, existe polimorfismo a nivel de la secuencia del gen *omp25*. La diferencia de mayor relevancia es la delección de 36 pb en el extremo 3' detectada en *B. ovis* y que provoca un acortamiento de la proteína y disminución en su masa molecular aparente (Cloekaert *et al.*, 1996). Dicha delección se considera específica de *B. ovis* dado que no ha sido observada en ninguna otra especie de *Brucella* (Vizcaíno *et al.*, 2004). Además, se cree que este cambio en el extremo C-terminal de la proteína Omp25 es el causante de las diferencias antigénicas observadas entre la proteína truncada de *B. ovis* y la del resto de especies (Cloekaert *et al.*, 1996).

Respecto a su función, aunque se ha especulado con la posible similitud entre la proteína Omp25 de *B. abortus* y OmpA de *E. coli* (Verstrete *et al.*, 1982), estudios posteriores descartaron la homología entre estas proteínas (de Wergifosse *et al.*, 1995). Sin embargo, puesto que ambas interactúan con el PG y presentan un perfil electroforético modificable por calor (típico de la estructura de barril  $\beta$ ) (Moriyón & López-Goñi., 1998), se ha sugerido que ambas podrían desempeñar una función similar confiriendo estabilidad a la ME. En *B. suis* se ha visto que esta OMP es necesaria para la liberación de proteínas periplásmicas al exterior en condiciones de pH ácido, como las que se dan en el interior de los fagosomas (Boigegegrain *et al.*, 2004). Además, en estudios con esta misma especie en macrófagos humanos, se ha descrito un efecto represor de la proteína Omp25 sobre la producción de TNF $\alpha$ , aunque no está claro el mecanismo implicado (Jubier-Maurin *et al.*, 2001). De igual modo, no está esclarecida la implicación de la proteína Omp25 en la virulencia de *Brucella*. Se ha descrito la atenuación en modelo murino y hospedador primario, de mutantes carentes de dicha OMP en las cepas *B. melitensis* 16M, *B. ovis* LSU99 y *B. abortus* 2308 (Edmonds *et al.*, 2001, 2002 a, 2002 b). Sin embargo, en mutantes de *B. ovis* PA y también de *B. abortus* 2308 obtenido en otro laboratorio, se ha descartado la relación entre la proteína Omp25 y la virulencia de ambas cepas (Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2008; Manterola *et al.*, 2007).

### Omp31

La proteína Omp31 está compuesta por un barril  $\beta$  de ocho láminas, con cuatro bucles expuestos al exterior, los cuales son de mayor tamaño que los de la proteína Omp25 (Cloekaert *et al.*, 2002 b). Existen diferencias a nivel de la proteína Omp31 entre las especies de *Brucella*, siendo la más destacable la ausencia del gen que la codifica en la especie *B. abortus*. En esta especie el gen *omp31* forma parte de una delección de 25 kb que además afecta a una veintena de hipotéticos genes (Vizcaíno *et al.*, 2001 a). Otra diferencia destacable es la existencia de nueve sustituciones nucleotídicas en la secuencia del gen *omp31* de *B. ovis*, respecto a la secuencia de *B. melitensis*. Este polimorfismo se traduce en siete aminoácidos de diferencia en la proteína Omp31 de *B. ovis*, de los cuales tres se encuentran en una región inmunodominante del bucle externo de la región N-terminal. Estas variaciones topológicas explican las importantes diferencias antigénicas existentes entre la proteína Omp31 de *B. ovis* y *B. melitensis* (Vizcaíno *et al.*, 2001 b; Cloekaert *et al.*, 2002 b) y que podrían estar relacionadas, al menos en parte, con las diferencias observadas en la reactividad de sueros de ovejas infectadas naturalmente con *B. ovis* y analizada frente a la proteína Omp31 de ambas especies (Kittelberger *et al.*, 1998). Por lo tanto, la proteína Omp31 de *B. ovis*, la cual es inmunodominante en la infección (Kittelberger *et al.*, 1995), es un antígeno de interés en el diagnóstico serológico de *B. ovis* y podría ser un candidato DIVA (*Differentiation infected-vaccinated animals*).

En *B. melitensis* se ha observado la formación de oligómeros de Omp31 que son resistentes a la desnaturalización por SDS a bajas temperaturas, siendo esta una característica de las proteínas con función porina, con las que se ha relacionado a esta OMP (Vizcaíno *et al.*, 1996 b). Además, se ha postulado que podría existir un papel compensatorio entre la función de Omp31 y Omp2b teniendo en cuenta la ausencia de la primera en *B. abortus* y la presencia mayoritaria de Omp2b (Salhi *et al.*, 2003; Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2009; Vizcaíno & Cloekaert., 2012). Adicionalmente, se ha relacionado a la proteína Omp31 con

funciones asociadas con la unión a grupos hemo y otros complejos de hierro (Delpino *et al.*, 2006), en base a la homología que muestra con la proteína HbpA del parásito de eritrocitos *Bartonella quintana* (Carroll *et al.*, 2000). En concreto, la expresión de la proteína Omp31, al menos en *B. suis*, *B. melitensis* y *B. ovis*, parece inducirse en condiciones de acceso limitado de hierro (Delpino *et al.*, 2006). También se le ha atribuido un papel inmunomodulador en *B. melitensis* 16M relacionado con la inhibición de la apoptosis mediada por la secreción de TNF $\alpha$  en macrófagos (Zhang *et al.*, 2016). Pese a la relevancia que supondrían dichas funciones para la viabilidad de *Brucella* en el entorno intracelular, la ausencia de Omp31 en *B. melitensis* Rev1 y *B. ovis* PA no tiene efectos drásticos en la virulencia de la bacteria (Cloeckeaert *et al.*, 2004; Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2008). Sin embargo, *B. melitensis* Rev1 posee niveles inferiores de Omp31 respecto a su cepa parental (Eschenbrenner *et al.*, 2002), lo cual podría indicar alguna relación entre esta OMP y la atenuación de esta cepa vacunal. Teniendo en cuenta el efecto compensatorio descrito entre proteínas de la familia Omp25/Omp31 en mutantes de *B. suis* 1330 y *B. ovis* PA (Salhi *et al.*, 2003; Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2009), otras proteínas de esta familia podrían suplir la pérdida de Omp31.

### Otros miembros de la familia Omp25/Omp31

A partir de la secuenciación de los genomas de varias cepas de *Brucella*, tales como *B. melitensis* 16M (DelVecchio *et al.*, 2002) o *B. suis* 1330 (Paulsen *et al.*, 2002), se detectó la existencia de cinco nuevos genes (*omp31b*, *omp25b*, *omp25c*, *omp25d*, *omp22*), correspondientes a proteínas que presentan diferente grado de homología con Omp25 y Omp31 (Salhi *et al.*, 2003; Vizcaíno *et al.*, 2004). En concreto, considerando las secuencias determinadas en *B. suis* 1330, las proteínas maduras Omp25b, Omp25c y Omp25d comparten un 60% de identidad entre ellas y un 40 % respecto a Omp25 (Salhi *et al.*, 2003), Omp31b comparte un 67 % con Omp31 y la que presenta menor homología de la familia es la proteína Omp22, con un 25 % de identidad aproximado con las seis proteínas restantes (Salhi *et al.*, 2003).

La proteína Omp31b en *B. ovis* y *B. canis* posee un codón prematuro de parada de la traducción que parece conducir a una proteína truncada (Vizcaíno *et al.*, 2004), lo que probablemente explica que y no se haya detectado su presencia en estas dos especies. En *B. melitensis* esta proteína tampoco se ha detectado, posiblemente debido a la delección existente en la región terminal 5' del gen que la codifica y que involucra el codón de inicio de la traducción y el sitio de unión al ribosoma (Salhi *et al.*, 2003; Vizcaíno *et al.*, 2004).

Respecto al gen *omp25b*, se trata del más heterogéneo de la familia y se encuentra situado en una isla genómica que está ausente en *B. ovis*. Por otro lado, dependiendo de la cepa, posee una delección o una inserción de un nucleótido que afecta a la proteína codificada en *B. abortus*, *B. canis*, *B. pinnipedialis* y *B. ceti* (Vizcaíno *et al.*, 2004). La proteína Omp25b se ha detectado de manera experimental tan sólo en *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* (Connolly *et al.*, 2006; Al Dahouk *et al.*, 2008). En cambio, Omp25c ha sido detectada en las seis especies clásicas de *Brucella* (Wagner *et al.*, 2002; Connolly *et al.*, 2006; Lamontagne *et al.*, 2007; Al Dahouk *et al.*, 2008; Martín-Martín *et al.*, 2009). Además, en *B. ovis* PA se ha descrito la presencia mayoritaria de esta OMP en la ME, aunque su ausencia no causa ningún efecto en la virulencia de esta cepa en modelo murino (Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2009).

En cuanto a la proteína Omp25d, sólo se ha detectado en *B. abortus* 2308 (Connolly *et al.*, 2006) y en el mutante  $\Delta$ *omp25d* de *B. ovis* PA complementado con el gen silvestre clonado en un plásmido y obtenido en nuestro laboratorio (Martín-Martín *et al.*, 2009). A pesar de la baja detección de esta OMP dentro del género, la secuencia del gen *omp25d* está bastante conservada (Vizcaíno *et al.*, 2004) y se transcribe en todas las especies analizadas (Martín-Martín *et al.*, 2009). La proteína Omp22 se ha evidenciado en *B. ovis* PA, *B. neotomae* y *B. abortus* 2308 (Martín-Martín *et al.*, 2009; Guzmán-Verri *et al.*, 2002; Connolly *et al.*, 2006). Mutantes de *B. ovis* PA en los genes *omp25d* y *omp22* poseen una reducción de su supervivencia en macrófagos murinos y células HeLa y también están fuertemente atenuados en ratón, por lo que se atribuye a estas proteínas un papel en el establecimiento del nicho intracelular de la bacteria (Martín-Martín *et al.*, 2008).

### 2.3.2. Lipoproteínas

Las lipoproteínas bacterianas constituyen un grupo de proteínas de membrana que se encuentran modificadas de manera covalente con una parte lipídica en el aminoácido cisteína del extremo N-terminal (Narita *et al.*, 2004; Goolab *et al.*, 2015). Aquellas que se localizan en la ME o periplasma son sintetizadas en forma de precursores y son translocadas desde el citoplasma a través de la membrana interna (MI) gracias a un péptido señal (Narita *et al.*, 2004). Las lipoproteínas, especialmente las situadas en la ME, suelen estar implicadas en funciones relacionadas con la fisiología de la bacteria como la captación de nutrientes, mantenimiento de la envoltura celular, transducción de señales o plegamiento de proteínas. También juegan papeles relevantes en el desarrollo de procesos patogénicos, contribuyendo a la adhesión celular, colonización, invasión y persistencia a través de la evasión de la respuesta inmune (Kovacs-Simon *et al.*, 2011; Goolab *et al.*, 2015).

En *Brucella*, las lipoproteínas Omp10, Omp16 y Omp19 se localizan en la ME (Tibor *et al.*, 1999), comparten epítomos comunes con otros miembros de las alfaproteobacterias, especialmente con *O. anthropi* (Cloeckaert *et al.*, 1999) y se han detectado mediante inmunotransferencia, en las seis especies clásicas (Cloeckaert *et al.*, 1990; Tibor *et al.*, 1994, 1996, 1999). Las tres poseen, dentro de la secuencia señal (extremo N-terminal), un tetrapéptido muy similar a la secuencia consenso requerida para la modificación y procesamiento de precursores de lipoproteínas bacterianas (Tibor *et al.*, 1999) y poseen características bioquímicas que las definen como tales. Se ha propuesto que es a través de la parte lipídica que estas OMPs se asocian a la región periplásmica de la ME, anclándose de manera más fuerte a ésta que otras lipoproteínas de bacterias Gram negativas (Moriyón & López-Goñi., 1998).

La lipoproteína Omp16, cuya función en *Brucella* es desconocida, presenta elevada homología con las lipoproteínas asociadas al peptidoglucano de la pared celular (PALs) del sistema Tol-PAL (Tibor *et al.*, 1994), el cual consiste en un complejo multiproteico que conecta la ME con el peptidoglucano (PG) y la MI de Gram negativas (Godlewska *et al.*, 2009). Hasta el momento presente no se han descrito mutantes del género *Brucella* defectivos en Omp16 (Sidhu-Muñoz *et al.*, 2016). Así mismo, se han referido dificultades en la obtención de mutantes PAL en otras bacterias Gram negativas (Chen & Henning., 1987; Murphy *et al.*, 2006; Yeh *et al.*, 2010) y aquellos disponibles muestran importantes alteraciones en la integridad de la envoltura celular, en el crecimiento y/o la virulencia (Dubuisson *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2006; Yeh *et al.*, 2010). Por todo ello, parece probable que la lipoproteína Omp16 desempeñe un papel significativo en el mantenimiento de la estructura de la pared celular de *Brucella*. En cuanto a la función de Omp10 y Omp19 en *Brucella*, existe diversidad de resultados sobre su papel en la virulencia. Se ha descrito su implicación en la virulencia en ratón de *B. abortus* 544 (Tibor *et al.*, 2002), aunque la proteína Omp10 se no se requiere para la supervivencia intracelular de esta cepa ni en macrófagos murinos ni en células epiteliales HeLa (Tibor *et al.*, 2002). También se ha demostrado que la inactivación del gen *omp19* conduce a la atenuación de la virulencia de *B. abortus* 2308 (de Souza Filho *et al.*, 2015) e incrementa la atenuación de la cepa vacunal *B. abortus* S19 (Campos *et al.*, 2002). Sin embargo, las proteínas Omp10 y Omp19 no son necesarias para la virulencia de *B. ovis* PA (Sidhu-Muñoz *et al.*, 2016) y la ausencia de Omp19 tampoco aumenta la atenuación de la cepa vacunal *B. abortus* RB51 (Vemulapalli *et al.*, 2000).

Por otro lado, estudios realizados en monocitos THP-1 y células dendríticas (CDs) humanos han mostrado que la parte lipídica (pero no la proteica) de las proteínas Omp16 y Omp19 tiene propiedades inmunomoduladoras que podrían jugar un papel en el desarrollo de la infección (Giambartolomei *et al.*, 2004; Zwerdling *et al.*, 2008). Además, la parte proteica de las proteínas Omp16 y Omp19 se ha identificado como un patrón molecular asociado a patógeno (PAMP) capaz de activar CDs murinas *in vivo* y conferir cierto grado de protección frente a *B. abortus* 544 en ratones BALB/c (Pasquevich *et al.*, 2010, 2011). Recientemente, se ha descrito que la coadministración de la parte no lipídica de la proteína Omp19 (U-Omp19) de *B. abortus* con antígenos de *Trypanosoma cruzi* estimula una respuesta inmune adaptativa que confiere protección frente a este parásito en modelo murino (Coria *et al.*, 2016 a). Así mismo, U-Omp19 es capaz de inhibir *in vitro* la actividad proteolítica de catepsinas humanas (enzimas lisosomales) y mejorar la presentación de antígenos entre CDs

humanas y células T CD8+ colaboradoras por lo que se ha propuesto la coadministración de la U-Omp19 como coadyuvante (Coria *et al.*, 2016 b).

En los últimos años se ha descrito también la presencia de una lipoproteína en *B. abortus* (nº de acceso al GenBank: 3339351), cuya ausencia en *B. abortus* 544 conduce a cambios en la superficie celular relacionados con una mayor adherencia a células epiteliales y macrófagos, junto con una menor colonización esplénica en ratón (Kim *et al.*, 2013).

#### 2.4. Propiedades relacionadas con la membrana externa de *Brucella*

La patogenicidad bacteriana suele estar ligada a factores de virulencia como exotoxinas, flagelos, variación antigénica, plásmidos y/o bacteriófagos (Cossart *et al.*, 2005). Sin embargo, hay una serie de patógenos intracelulares, entre ellos *Brucella* (Moreno & Moriyón., 2002), en los que todos o muchos de estos factores están ausentes, con lo cual no es posible definir su virulencia en estos términos. Además, *Brucella* posee otras diferencias singulares respecto a otras bacterias Gram negativas que sugieren peculiaridades relacionadas con su ME, como son la incapacidad de crecimiento en muchos de los medios selectivos para bacterias de este tipo y la resistencia que muestra a los procedimientos clásicos de extracción de componentes periplásmicos (Moriyón & López-Goñi., 1998). Estas observaciones, entre otras, han conducido a que muchos de los aspectos de la virulencia de *Brucella* se hayan relacionado con las características de su ME.

La integridad de muchas bacterias Gram negativas depende de una fuerte carga negativa en su superficie, que normalmente se encuentra estabilizada por cationes divalentes y poliaminas, que la convierte en una barrera selectiva (Nikaido, 2003). Sin embargo, en la superficie de *Brucella* existe una reducción de esta carga negativa, debido, al menos en parte, a las características del LPS, el cual posee una baja proporción de azúcares ácidos en el núcleo y de grupos fosfato en el lípido A, junto con la presencia de residuos libres de ornitina cargados positivamente (Moriyón & López-Goñi., 1998). Además, existen otras características destacables de la ME de *Brucella* que contribuyen a la mayor estabilidad observada en comparación con otras bacterias Gram negativas. Entre ellas destacan: i) la presencia de fosfatidilcolina como PL más abundante en la ME de *B. melitensis* y *B. abortus* (Thiele & Schwinn., 1973), ii) la existencia de VLCFAs en el lípido A (Moreno *et al.*, 1990; Velasco *et al.*, 2000), iii) una elevada hidrofobicidad (Martínez de Tejada & Moriyón., 1993; Moriyón & López-Goñi., 1998; Freer *et al.*, 1999) y iv) la fuerte asociación de algunas OMPs al LPS y PG (Dubray & Bézard., 1980; Winter., 1987; Cloeckart *et al.*, 1992; Vizcaíno *et al.*, 1996 b).

Respecto a la mencionada relación entre el PG y la ME, se ha observado, mediante estudios de microscopía electrónica realizados en *B. melitensis* y *B. abortus*, una interacción mucho más estrecha que en otras bacterias Gram negativas como *E. coli* (Moriyón & López-Goñi., 1998). Además, mientras que la inactivación por calor de las células de *Brucella* conlleva al colapso de la membrana citoplásmica, la ME parece conservar intacta su apariencia. Todo ello sugiere que la relación entre PG y ME contribuye a la mayor estabilidad de la misma.

Además de las características mencionadas, la ME de *Brucella* presenta propiedades de relevancia a nivel funcional que se han puesto de manifiesto por su comportamiento en presencia de péptidos catiónicos, agentes quelantes, detergentes, suero no inmune y compuestos hidrofóbicos (Martínez de Tejada *et al.*, 1995; Freer *et al.*, 1999; Velasco *et al.*, 2000; Barquero-Calvo *et al.*, 2009; Martín-Martín *et al.*, 2011). Algunas de estas propiedades están relacionadas con los mecanismos de resistencia a las defensas del hospedador. Así, mediante análisis comparativos se han observado diferencias en las propiedades de la ME entre las especies clásicas de *Brucella*, las cuales podrían jugar un papel en la preferencia de hospedador y patogenicidad que estas muestran (Martín-Martín *et al.*, 2011). En concreto, las especies de *Brucella* presentan una elevada resistencia a la polimixina B, uno de los péptidos catiónicos más ampliamente estudiado. Los péptidos catiónicos son parte de los mecanismos oxígeno-independientes desplegados en el interior de los fagocitos, encontrándose también en los fluidos y tejidos corporales (Jenssen *et al.*, 2006). Esta resistencia se atribuye presumiblemente a la reducida carga negativa de la ME y al impedimento estérico causado por las cadenas O y el núcleo del LPS que impiden el acceso del péptido a los componentes cargados negativamente de la ME (Moriyón & López-Goñi., 1998; Conde-Álvarez *et al.*, 2013). Sin embargo, las especies naturalmente rugosas *B. ovis* y *B. canis*, carentes de

cadena O, son más resistentes a polimixina B que cepas lisas de *B. abortus* y *B. neotomae* (Martín-Martín *et al.*, 2011). Así mismo, tanto la reducida carga negativa como la elevada hidrofobicidad de la ME parecen también ser las responsables de la resistencia de las especies de este género a la acción de agente quelantes como el EDTA, en contraste al efecto de estos compuesto en otras bacterias Gram negativas que requieren de cationes divalentes para estabilizar dicha carga negativa (Moriyon & Berman., 1982; Freer *et al.*, 1996). También muestran resistencia a los componentes bactericidas presentes en el suero no inmune (como las proteínas del sistema del complemento), los cuales forman parte de los mecanismos de defensa frente a la localización extracelular de patógenos. Diversos estudios han postulado que las cadenas O del LPS de especies lisas de *Brucella* son relevantes en esta resistencia, puesto que mutantes rugosos de *B. melitensis* y *B. abortus* son más sensibles (Corbeil *et al.*, 1988; Eisenschenk *et al.*, 1999; Fernández-Prada *et al.*, 2001; González *et al.*, 2008). Sin embargo, de nuevo, las especies naturalmente rugosas *B. canis* y *B. ovis* son incluso más resistentes al suero que algunas cepas lisas (Eisenschenk *et al.*, 1999; Martín-Martín *et al.*, 2011), lo que sugiere indirectamente la implicación de otros componentes en esta resistencia.

Por otro lado, se han observado características diferenciales entre cepas naturalmente virulentas y atenuadas/avirulentas pertenecientes a la misma especie. Así, la cepa atenuada *B. abortus* B19 posee una mayor susceptibilidad a desoxicolato sódico que las cepas virulentas *B. abortus* 2308 y 544. Así mismo, la cepa avirulenta *B. ovis* Reo198 y la virulenta *B. ovis* PA presentan entre otras diferencias, un comportamiento divergente en condiciones de pH ácido, al que *B. ovis* Reo198 muestra una elevada susceptibilidad (Martín-Martín *et al.*, 2011). Dicho comportamiento podría estar relacionado con la atenuación de *B. ovis* Reo 198, puesto que la acidificación del fagosoma es requisito para la replicación de *Brucella* dentro de los fagocitos (Porte *et al.*, 1999; Starr *et al.*, 2008).

La heterogeneidad existente en las propiedades de la ME entre las especies de *Brucella* no recae en exclusiva en el fenotipo rugoso o liso del LPS, por lo que otras diferencias relacionadas con la ME deben contribuir a la misma. La diferente distribución de las proteínas de la familia Omp25/Omp31 entre especies (Martín-Martín *et al.*, 2009), la composición de la cadena O del LPS, lípido A y núcleo (Iriarte *et al.*, 2005; González *et al.*, 2008) o diferencias a nivel de aminoácidos en determinadas OMPs (Cloeckert *et al.*, 2002 b), entre otras, podrían estar relacionadas con la variabilidad observada en las propiedades de la ME. Así mismo, podrían contribuir a explicar las diferencias de patogenicidad y preferencia de hospedador que existen entre las especies de *Brucella*.

### **3. Aspectos más relevantes para este trabajo del proceso de infección y de los mecanismos de supervivencia de *Brucella***

El poder patogénico de *Brucella* se relaciona con su capacidad de sobrevivir y replicarse dentro de una gran variedad de células hospedadoras, incluyendo tanto fagocitos profesionales como no profesionales. Su elevado grado de replicación en trofoblastos de placenta está asociado con problemas a nivel reproductivo en el ganado (Carvalho Neta *et al.*, 2008; Salcedo *et al.*, 2013 a) y su persistencia en macrófagos da lugar a la cronificación de la infección (Xavier *et al.*, 2013 a). Ambos son rasgos característicos de la infección por *Brucella* en los hospedadores naturales (de Figueiredo *et al.*, 2015).

Para conseguir alcanzar las células diana, las bacterias de este género necesitan atravesar numerosas barreras del tracto respiratorio, genitourinario o digestivo, donde son internalizadas por distintos tipos celulares, lo cual resulta en la diseminación del microorganismo por el sistema linfático y órganos reproductores (Xavier *et al.*, 2010 a). En estudios realizados en rumiantes (vacas, cabras y ovejas) se ha descrito que, tras la infección experimental con cepas virulentas de *Brucella*, las bacterias colonizan los ganglios linfáticos regionales, accediendo desde ahí al torrente sanguíneo donde se diseminan por el sistema polimorfonuclear (Poester *et al.*, 2013). En el caso de hembras gestantes, el microorganismo coloniza la placenta, alcanzando posteriormente al feto, pudiendo causar aborto especialmente durante el último tercio del periodo de gestación. En los machos *Brucella* puede causar epididimitis, orquitis y prostatitis en diferentes grados de severidad (Xavier *et al.*, 2010 a; Poester *et al.*, 2013).

La interacción que se establece entre *Brucella* y las células diana determina normalmente el desenlace de la infección (Köhler *et al.*, 2003). La localización de *Brucella* dentro de los macrófagos, especialmente los presentes en bazo e hígado, le permite protegerse de los anticuerpos y proteínas del sistema del complemento (Roop *et al.*, 2009). Estudios de infección *in vitro* de macrófagos humanos con *B. suis* han mostrado la capacidad de este microorganismo de evitar la apoptosis, evidenciando la importancia de mantenerse dentro de este nicho protector para la cronificación de la infección (Gross *et al.*, 2000; Cui *et al.*, 2014). Si bien la relación entre la persistencia de *Brucella* en macrófagos y su virulencia está bien documentada (Celli *et al.*, 2003; Celli., 2006; Martín-Martín *et al.*, 2012; Copin *et al.*, 2012), el conocimiento sobre la interacción con células dendríticas (importantes fagocitos profesionales) es más limitado, aunque es cada vez más estudiada. *Brucella* también se replica en este tipo de células, en contraste con otros patógenos intracelulares, y es capaz de interrumpir su maduración, interfiriendo, por tanto, en su función presentadora de antígeno (Billard *et al.*, 2007; Salcedo *et al.*, 2008). Otro punto clave de contacto entre *Brucella* y el hospedador es el que se da al atravesar las barreras mucosas, puesto que son la primera línea de entrada de la bacteria en el hospedador en la infección natural (Poester *et al.*, 2013). La eficacia con la que este microorganismo invade células epiteliales es baja, en comparación con otras bacterias consideradas eficientemente invasivas (Moreno & Gorvel., 2004 a). En consecuencia, no está clara la contribución efectiva que tiene la colonización de las células epiteliales en el inicio de la infección por *Brucella*. Sin embargo, se cree que las células M de la mucosa intestinal constituyen una puerta de entrada al hospedador cuando la infección es adquirida por vía oral (Paixão *et al.*, 2009; Rossetti *et al.*, 2013).

### 3.1. Mecanismos de adhesión y transporte relacionados con este trabajo

El proceso de adhesión celular bacteriana representa el paso inicial en el ciclo infeccioso de prácticamente todos los patógenos y para llevarlo a cabo, éstos han desarrollado moléculas de superficie que interaccionan con diferentes receptores celulares. Estas proteínas se denominan adhesinas y poseen dominios extracelulares implicados en el contacto con moléculas particulares del hospedador. En concreto, muchas de las adhesinas bacterianas son lectinas, proteínas que tienen afinidad por azúcares. La adherencia bacteriana permite a los patógenos interaccionar de manera estrecha con membranas celulares, colonizar tejidos y establecer nichos de infección, por lo que se considera un rasgo relacionado con la virulencia (Bonazzi & Cossart., 2011). Mientras que los mecanismos relacionados con la capacidad de penetración y replicación de *Brucella* en macrófagos han sido y son ampliamente estudiados, el conocimiento sobre el proceso de adhesión e invasión de este género es más limitado.

Otro aspecto clave en el ciclo de vida bacteriano en general es el transporte de moléculas. Éste es necesario para numerosos procesos vitales como la adquisición de nutrientes o la secreción de factores de virulencia. En bacterias patógenas el transporte de moléculas desde el citoplasma es un aspecto clave en la interacción con el hospedador. Gracias a la progresiva secuenciación de genomas de *Brucella* (DelVecchio *et al.*, 2002; Paulsen *et al.*, 2002; Chain *et al.*, 2005; Tsolis *et al.*, 2009; Wattam *et al.*, 2009; Audic *et al.*, 2011) y a los análisis filogenéticos se ha mejorado el conocimiento sobre algunas de las piezas que articulan la patogenicidad de este género, lo que ha permitido además el refinamiento de conceptos clásicos sobre la virulencia. En este contexto, estudios predictivos han apuntado la presencia en el genoma de *Brucella*, de elementos transportadores como bombas de flujo, autotransportadores y canales de ME (Moreno & Moriyón., 2002). Algunos de ellos están implicados en la virulencia de determinadas especies de este género, ya sea permitiendo su detoxificación (Posadas *et al.*, 2007), asegurando su adherencia a las células hospedadoras (Castañeda-Roldán *et al.*, 2006; Posadas *et al.*, 2012; Czibener *et al.*, 2015), secretando efectores que modulan la respuesta inmune del hospedador (Lacerda *et al.*, 2013) o permitiendo la adquisición de micronutrientes en el interior de la célula (Elhassanny *et al.*, 2013). A continuación, se describen factores de virulencia implicados en procesos de adhesión y transporte de interés para el presente trabajo.

### 3.1.1. Proteína de superficie SP41

Estudios centrados en las propiedades de adherencia celular de especies lisas de *Brucella*, demostraron que cepas de *B. abortus* y *B. melitensis* son capaces de adherirse a diferentes células eucariotas (Castañeda-Roldán *et al.*, 2004). En concreto, se observó que la adherencia en estas cepas es dependiente de receptores de residuos de ácido siálico presentes en la superficie de eritrocitos, macrófagos y células epiteliales humanas (Rocha-Gracia *et al.*, 2002; Castañeda-Roldán *et al.*, 2004). Además, *B. abortus* es capaz de unirse a algunas proteínas de la matriz extracelular como fibronectina y vitronectina que podrían actuar como puente en las etapas de adhesión de esta especie, facilitando su diseminación en los tejidos (Castañeda-Roldán *et al.*, 2004). En base a estas observaciones, se sugirió que *Brucella* podría poseer adhesinas involucradas en el proceso de invasión intracelular. En el año 2006 se describió por primera vez la presencia, en *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*, de una proteína de ME denominada SP41 capaz de unirse a células HeLa, así como de producir anticuerpos específicos detectables en el suero de pacientes con brucelosis (Castañeda-Roldán *et al.*, 2006). El análisis bioquímico de dicha proteína mostró un fragmento con una secuencia de aminoácidos que se correspondía con parte del producto predicho para el gen *ugpB* presente en los genomas disponibles entonces de *B. melitensis* 16M, *B. abortus* biovar 1 y *B. suis* 1330. El producto de dicho gen presenta similitud con un transportador de glicerol-3-fosfato de tipo ABC (*ATP binding cassette*) presente en microorganismos de plantas, patógenos y simbiontes, como *A. tumefaciens* y *Sinorhizobium meliloti*, y también en patógenos humanos como *Salmonella enterica* (Castañeda-Roldán *et al.*, 2006). Pese a la similitud entre el producto del gen *ugpB* de *Brucella* con la familia de transportadores tipo ABC, la proteína SP41 no posee ninguno de los tres dominios conservados del *cassette* de unión al ATP y no existe evidencia experimental de que funcione como un transportador tipo ABC en *Brucella*.

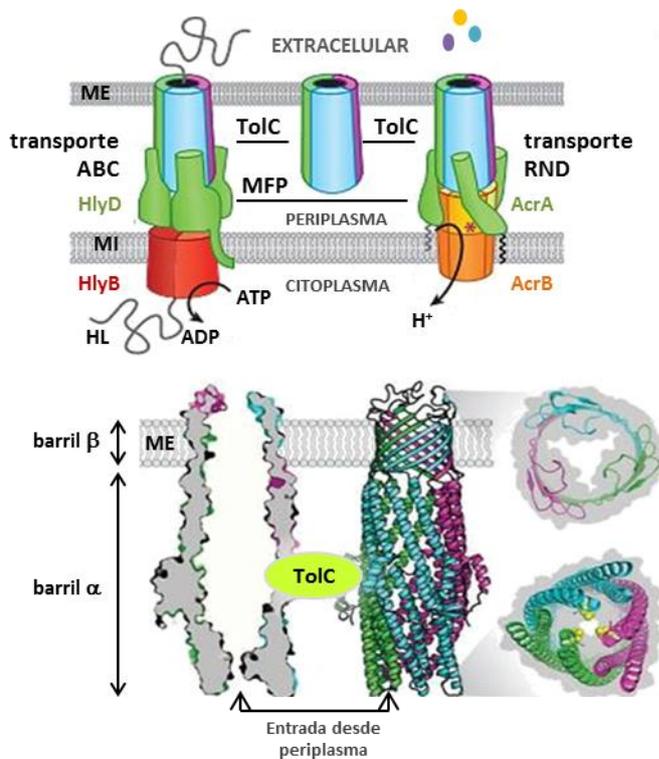
En base al perfil de hidrofobicidad mostrado por la proteína SP41 y a su detección mediante inmunofluorescencia, se trata de una proteína con una región transmembrana localizada en la ME de *Brucella* (Castañeda-Roldán *et al.*, 2006). La inactivación del gen *ugpB* en *B. suis* 1330 conduce a una disminución significativa de la adhesión e invasión a células HeLa, respecto a la cepa parental. Sin embargo, la ausencia de esta proteína en *B. suis* 1330 no afectó a la formación del fagosoma, ya que, una vez internalizado, el mutante  $\Delta$ *ugpB* desarrolló una tasa de replicación intracelular idéntica a la cepa parental. No se ha analizado hasta el momento el papel de la proteína SP41 en la virulencia *in vivo* de ninguna de las especies de *Brucella*. En los últimos años se han descrito nuevas adhesinas en *Brucella*, especialmente en especies lisas, junto con moléculas del hospedador implicadas en procesos de adhesión celular. Entre ellas se encuentran la proteína BmaC, perteneciente a la familia de autotransportadores tipo I, también conocidos como sistema de secreción tipo V (Posadas *et al.*, 2012). Los autotransportadores son sintetizados como una única proteína modular que hipotéticamente contiene todo lo necesario para su secreción y está organizada en tres dominios: i) péptido señal, ii) dominio translocador (barril  $\beta$  anclado en la membrana externa) en extremo C-terminal y iii) dominio denominado pasajero, correspondiente al efector secretado, el cual se encuentra situado entre los dos anteriores. Algunos de los miembros de esta familia presentan función adhesina o invasina en patógenos, como la pertactina en *Bordetella spp* o la adhesina Ag43 de *E. coli* (Henderson & Nataro., 2001). La proteína BmaC está localizada en la superficie bacteriana de *B. suis* y su ausencia causa una marcada disminución en la capacidad de adhesión e internalización de *B. suis* 1330 en células epiteliales. Sin embargo, la ausencia de BmaC no parece afectar a la supervivencia dentro de las células epiteliales, ni tampoco parece estarlo en la adhesión e invasión de macrófagos murinos (Posadas *et al.*, 2012).

Otras adhesinas descritas en especies lisas de *Brucella* son las proteínas BtaE, BtaF o BigA (Ruiz-Ranwez *et al.*, 2013 a, 2013 b; Czibener *et al.*, 2015). También se ha descrito otro sistema transportador de tipo ABC presente en la isla de patogenicidad BOP-1 de *B. ovis*, el cual es necesario para la virulencia de esta especie y está ausente en las especies clásicas de *Brucella* (Silva *et al.*, 2011 a).

### 3.1.2. Proteína BepC

En el genoma de *B. suis* 1330 se identificó el gen *bepC* que codifica una proteína de ME denominada BepC (*Brucella efflux protein*), perteneciente a la familia TolC (Posadas *et al.*, 2007). La proteína TolC es una proteína canal de ME que forma parte de los sistemas tripartitos de bombas de expulsión en bacterias Gram negativas. La perteneciente a *E. coli* fue cristalizada en el año 2000 (Koronakis *et al.*, 2000) y presentó una estructura única, trimérica, formada por un barril  $\beta$  de 12 cadenas y un dominio de hélices  $\alpha$  que sobresale hacia el periplasma. La proteína TolC, junto con un transportador y una proteína de fusión de membrana (MFP, *Membrane Fusion Protein*), forman un canal que conecta el citoplasma con el exterior de la bacteria (**Figura 2**). Este conjunto permite la translocación, a través del espacio periplásmico en *E. coli*, de proteínas como  $\alpha$ -hemolisina o compuestos tóxicos para la bacteria (Dijun *et al.*, 2014).

La proteína TolC de *E. coli* es el paradigma de estructura y función del componente de ME presente en los sistemas de bombas de expulsión de tres componentes. Esta OMP puede estar conectada con MFPs que interaccionan con transportadores de diferentes superfamilias, tales como ABC o RND (*Resistance Nodulation Division*) (Misra & Bavro., 2009). Las proteínas ABC son transportadores primarios, mientras que las proteínas RND son transportadores secundarios que emplean cationes como contraiones para la expulsión de compuestos de la bacteria. Los genes correspondientes a los componentes ABC/RND y MFP se hallan generalmente codificados en un operón, mientras que el gen que codifica la OMP (TolC) puede transcribirse de forma independiente. En *E. coli*, el gen *tolC* no se encuentra ligado a un operón de transporte, sino que forma parte de un regulón que responde a condiciones de estrés, induciendo la expresión de varios genes (Aono *et al.*, 1998). En la secreción de  $\alpha$ -hemolisina por esta bacteria (**Figura 2**) intervienen, además de TolC, el transportador ABC HlyB y la proteína periplásmica HlyD (Thanabalu *et al.*, 1998). Para la eliminación de compuestos tóxicos para la bacteria (antibióticos, sales biliares, etc), la bomba más efectiva está compuesta por las traslocasas de MI AcrA y AcrB (Dijun *et al.*, 2014). Estudios bioquímicos han demostrado que para que ocurra un transporte eficiente del sustrato a través del espacio periplásmico, las traslocasas de la MI deben en primer lugar unirse al sustrato antes de reclutar a la proteína TolC (Thanabalu *et al.*, 1998; Touzé *et al.*, 2004).



**Figura 2.** Esquema de las familias de transportadores tipo ABC y RND que pueden formar parte de sistemas tripartitos de transporte junto a otras dos proteínas; MFP y TolC. Tomado y modificado de Hinchliffe *et al.*, 2003. ME; Membrana externa, MI; Membrana interna, MFP; proteína periplásmica de fusión de membrana, HL; hemolisina, HlyD; MFP que interacciona con transportador ABC, HlyB; transportador ABC, AcrA; MFP que interacciona con transportador RND, AcrB; transportador RND. En estos sistemas los sustratos son enviados al medio extracelular en un único paso. Los transportadores ABC son transportadores primarios y los RND son transportadores secundarios que emplean cationes como contraiones. En todos ellos TolC es el componente de ME, de estructura trimérica, formada por un barril  $\beta$  de 12 cadenas y un dominio de hélices  $\alpha$  que sobresale hacia el periplasma. TolC, junto con la MFP y el transportador de MI forman un canal que conecta el citoplasma con el exterior de la bacteria. Los sistemas TolC-ABC están implicados, preferentemente, en la secreción de  $\alpha$ -hemolisina y los TolC-RND en la secreción de antibióticos y sales biliares.

## 16 Introducción

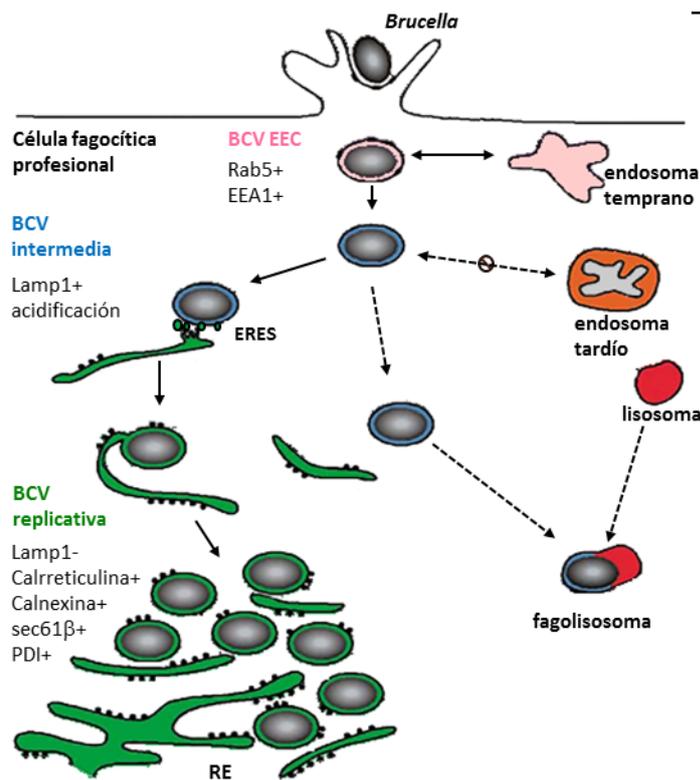
En estudios *in vitro* del mutante  $\Delta bepC$  de *B. suis* 1330 se observó una mayor sensibilidad de esta cepa, con respecto a la cepa parental, a colorantes catiónicos, detergentes, diversos antibióticos y sales biliares (Posadas *et al.*, 2007). Mediante técnicas de complementación heteróloga, se ha podido comprobar que la proteína BepC de *B. suis* es capaz de restaurar, en mutantes *tolC*-deficientes de *E. coli*, la excreción de moléculas hidrofóbicas (ciertos fármacos y detergentes), pero no la de  $\alpha$ -hemolisina, poniendo de manifiesto la probable implicación de esta proteína en mecanismos de resistencia a agentes antimicrobianos en *B. suis* (Posadas *et al.*, 2007). Además, *Brucella* posee una notable permeabilidad a sustancias hidrofóbicas, entre ellas compuestos nocivos como las sales biliares, que podrían penetrar la ME con facilidad (Moriyón & López-Goñi., 1998; Moreno & Moriyón., 2002), por lo tanto, la proteína BepC podría contribuir a la supervivencia de la bacteria en el hospedador protegiéndola frente a las secreciones intestinales cuando la infección es adquirida por vía oral (Posadas *et al.*, 2007). También se ha comprobado que la proteína BepC está implicada en la virulencia *in vivo* de *B. suis*, ya que la colonización esplénica en ratones BALB/c del mutante deficiente en el gen *bepC* es notablemente inferior a la obtenida con la cepa parental (Posadas *et al.*, 2007). Sin embargo, la proteína BepC no es crucial para la supervivencia intracelular en modelos celulares de infección, mostrando el mutante  $\Delta bepC$  de *B. suis* 1330 un comportamiento similar al de la cepa parental tanto en macrófagos J774A.1 como en células HeLa (Posadas *et al.*, 2007).

En estudios posteriores, se ha descrito la presencia en *B. suis* de proteínas transportadores de MI de tipo RND (BepDE y BepFG) que podrían interactuar con BepC (Martín *et al.*, 2009). Concretamente, al menos el sistema BepDE es dependiente de la presencia de BepC en la ME de *B. suis* para ejercer su función de transporte de compuestos tóxicos en esta especie (Martín *et al.*, 2009). Por último, se desconoce la contribución de la proteína BepC en la virulencia de especies rugosas de *Brucella*, si bien se han descrito sistemas de transporte como los de tipo ABC, que intervienen en la expulsión de compuestos tóxicos en *B. ovis* (Silva *et al.*, 2011 a).

### 3.2. Internalización, tráfico intracelular de *Brucella* y establecimiento del nicho replicativo

La habilidad de *Brucella* para introducirse en las distintas células diana y conseguir establecer un nicho replicativo, es un proceso molecular complejo en el que la bacteria consigue controlar el tráfico intracelular de la célula hospedadora (**Figura 3**). Una vez en contacto con la membrana celular, las bacterias adheridas se acumulan, formando microcolonias (Castañeda-Roldán *et al.*, 2004). Posteriormente, *Brucella* ingresa en la célula formando un macropinosoma, internalizándose a través de balsas lipídicas (Watarai *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004; Celli., 2006). Se ha demostrado que la entrada de *Brucella* en la célula hospedadora depende de componentes de las balsas lipídicas (*lipids rafts*) para establecer la infección con éxito (Naroeni & Porte., 2002; Watarai *et al.*, 2002; Martín-Martín *et al.*, 2010). Las balsas lipídicas son microdominios especializados de las membranas plasmáticas de células eucariotas ricos en colesterol, esfingomielina, gangliósidos y fosfolípidos. Presentan a su vez una gran variedad de proteínas, especialmente quinasas (Pike., 2003). Son regiones de elevado dinamismo de formación y disgregación, y además, están implicadas en diferentes procesos celulares fundamentales, como la transducción de señales o la endocitosis (Kim *et al.*, 2004; Lapaque *et al.*, 2006). En su entrada en la célula hospedadora, *Brucella* desencadena mecanismos que implican el reclutamiento de filamentos de actina y la activación de proteínas del citoesqueleto, como las GTPasas de la familia Rho (Guzmán-Verri *et al.*, 2001; Chaves-Olarte *et al.*, 2002). Otros de los elementos que también contribuyen a su internalización son mediadores de rutas de señalización celular como el GMP cíclico y diversas quinasas como PIP3-K, Tyr-K y MAP-k (Guzmán-Verri *et al.*, 2001).

Tras la internalización de la bacteria en la célula, ya sea en fagocitos profesionales o en no profesionales (Pizarro-Cerdá *et al.*, 2000), *Brucella* se localiza en unos compartimentos membranosos denominados BCVs (*Brucella-containing vacuoles*). Transcurridos pocos minutos, estas vacuolas experimentan un proceso de maduración mediante la interacción con los endosomas tempranos (EEC; *Early Endosomal Compartments*) de la ruta endocítica, adquiriendo transitoriamente en su superficie las proteínas Rab5 y EEA-1 (Chaves-Olarte *et al.*, 2002; Celli *et al.*, 2003).



**Figura 3. Esquema de la ruta intracelular seguida por *Brucella* en células fagocíticas profesionales. Tomado y modificado de Celli, 2006.** Una vez *Brucella* penetra en la célula se localiza en BCVs que interactúan con los endosomas tempranos (rosa), adquiriendo transitoriamente marcadores de estos últimos. Las BCVs sufren interacciones con componentes líticos, acidificándose y adquiriendo en su membrana marcadores lisosomales como Lamp1. Dichos cambios son imprescindibles para evitar su interacción con los endosomas tardíos (naranja) y fusión con los lisosomas (flechas discontinuas). Las BCVs intermedias (azules) consiguen interceptar la ruta secretora de la célula mediante su interacción con los dominios ERES del RE. La fusión de la BCV con el RE conlleva a la formación de la denominada BCV replicativa, la excluye de su membrana el marcador Lamp1 y adquiere nuevas moléculas del RE. Dentro de este compartimento replicativo se dan las condiciones óptimas para la supervivencia y multiplicación intracelular de la bacteria.

Las vacuolas continúan su maduración produciéndose un desplazamiento de los marcadores hacia la presencia de Rab7 y LAMP-1 e interaccionando de manera breve con los endosomas tardíos y lisosomas. Gracias a esta interacción, la BCV adquiere parcialmente propiedades de fagolisosoma, acidificándose (Starr *et al.*, 2008). Tras el breve contacto con los lisosomas, la vacuola no concluye la ruta fusionándose con éstos, siendo imprescindible la disminución del pH para evitar dicha fusión (Porte *et al.*, 1999; Celli *et al.*, 2003; Celli., 2006; Starr *et al.*, 2008). La maduración de la BCV continúa con la pérdida progresiva de la glicoproteína de membrana lisosomal LAMP-1 y su interacción con los denominados “sitios de salida del retículo endoplásmico o ERES” que forman parte de la ruta secretora (Celli *et al.*, 2005; Starr *et al.*, 2008). Se trata de subcompartimentos del retículo endoplásmico (RE) dedicados a la formación de vesículas secretoras que son transportadas al Aparato de Golgi (Celli & Tsolis., 2015). La BCV se fusiona con el RE y, gracias a un intercambio progresivo de membrana con el mismo, va adquiriendo marcadores de RE, como calnexina, calreticulina, PDI y sec61β (**Figura 3**) (Pizarro-Cerdá *et al.*, 1998 a; Celli., 2006). La fusión con el RE da lugar a la formación de un orgánulo denominado BCV replicativa, el cual presenta condiciones permisivas para la replicación de *Brucella* (Pizarro-Cerdá *et al.*, 1998 b; Celli *et al.*, 2003). Se ha observado que dicha fusión es dependiente de la actividad de unas pequeñas GTPasas denominadas Sar1 y Rab2 (Kuge *et al.*, 1994; Aridor *et al.*, 2001; Celli *et al.*, 2005; Fugier *et al.*, 2009). Sar1 interacciona con el complejo COPII de transporte anterógrado de vesículas y Rab2 con la proteína efectora RicA (Celli *et al.*, 2005; de Barsy *et al.*, 2011). En este punto de la ruta, se cree que la replicación bacteriana se ve favorecida por la fisión de la BCV replicativa en dos BCV hijas, mediada por el aporte membranoso del RE (Celli., 2006). Finalmente, la vacuola replicativa puede interceptar la ruta autofágica convirtiéndose en un compartimento capaz de propagarse a otras células (Brumell., 2012; Starr *et al.*, 2012; Miller & Celli., 2016).

La invasión masiva del RE por la bacteria puede llegar a desembocar en una reorganización total de este orgánulo en vacuolas replicativas (Celli & Tsolis., 2015), todo ello sin producir daño celular aparente ya que *Brucella* es capaz de bloquear los mecanismos de apoptosis (Galdiero *et al.*, 2000; Gross *et al.*, 2000; Fernández-Prada *et al.*, 2003; Pei & Ficht., 2004; Scian *et al.*, 2013). Se ha observado que mutantes rugosos de cepas lisas

de *Brucella*, tanto espontáneos como obtenidos por manipulación genética, tienen un efecto citotóxico (Fernández-Prada *et al.*, 2003; Pei *et al.*, 2006; Qin *et al.*, 2008). En cambio, las cepas lisas parentales, así como las especies naturalmente rugosas *B. ovis* y *B. canis* no tienen dicho efecto (Lamontagne *et al.*, 2009; Martín-Martín *et al.*, 2008). Esto les permite adaptarse a los distintos ambientes intracelulares que se van encontrando, pasando prácticamente inadvertidas a los mecanismos de defensa de las células invadidas.

Aunque *Brucella* es considerada un patógeno intracelular facultativo, su existencia se mantiene predominantemente ligada a su localización dentro de células de los hospedadores a los que infecta y su presencia extracelular es accidental (Moreno & Moriyón., 2002). Por ello, su entrada en la célula es un aspecto determinante en la supervivencia de la bacteria (Celli., 2006). Algunos de los determinantes moleculares de *Brucella* relacionados con su internalización y las primeras etapas que la acompañan, están controlados por el sistema regulador de dos componentes BvrR-BvrS (López-Goñi *et al.*, 2002), el cual está conservado en las diferentes especies de *Brucella* (Lavín *et al.*, 2010). La disrupción de este sistema en *B. abortus* 2308 provoca una profunda alteración de la homeostasis y estructura de la ME de la bacteria (Guzmán-Verri *et al.*, 2002; Lamontagne *et al.*, 2007). Entre las alteraciones relacionadas con la ME se encuentra una modificación en el grado de acilación del lípido A del LPS, que se ha relacionado con el incremento de la sensibilidad a péptidos catiónicos, o modificaciones en el patrón de expresión de distintos genes de OMPs (Guzmán-Verri *et al.*, 2002; Manterola *et al.*, 2005; Viadas *et al.*, 2010). Los mutantes BvrR/BvrS son pobres invasores celulares y además, una vez internalizados en las células fagocíticas profesionales y no profesionales son dirigidos a los lisosomas y destruidos en los fagolisosomas (Sola-Landa *et al.*, 1998; Guzmán-Verri *et al.*, 2002), lo que también explica, al menos en parte, su atenuación en modelo murino. (Sola-Landa *et al.*, 1998). También se ha comprobado que, al contrario de lo que ocurre en las cepas virulentas (Chaves-Olarte *et al.*, 2002), estos mutantes no estimulan la generación de las formas activas de las pequeñas GTPasas de la familia Rho en el momento del contacto con la célula eucariota. (Guzmán-Verri *et al.*, 2001). Este hecho proporciona una evidencia adicional de la implicación del sistema BvrR/BvrS en la interacción de la bacteria con la célula hospedadora. Además, como se ha comentado, este sistema regulador se requiere para la supervivencia de *Brucella* dentro de la célula, lo que puede estar relacionado, al menos en parte, con su papel regulador de la expresión del operón *virB* (Martínez-Núñez *et al.*, 2010) que es imprescindible para el establecimiento del nicho replicativo (Celli *et al.*, 2003) y que se describe en el **Apartado 3.3.**

### 3.3. Supervivencia dentro de las células hospedadoras

A pesar del beneficio obvio que le aporta a *Brucella* la evasión de la ruta endocítica, minimizando la fusión de la BCV con los lisosomas, ésta debe hacer frente dentro de la célula a un fuerte estrés químico y nutricional. De manera similar a otras bacterias, *Brucella* requiere de varios metales esenciales para su supervivencia tanto *in vitro* como *in vivo*. La adquisición de niveles suficientes de metales como manganeso, zinc e hierro está especialmente limitada dentro de las células hospedadoras (Roop., 2012). En concreto, el hierro es un micronutriente para *Brucella*, así como para la mayoría de las bacterias (Waring *et al.*, 1953), que desempeña un papel determinante en la respuesta inmune tanto innata como adaptativa (Weiss., 2005). El hierro que no se encuentra incorporado a los tejidos del hospedador se encuentra secuestrado por proteínas aceptoras como la transferrina y la lactoferrina (entorno extracelular), o como la ferritina que actúa en el interior de la célula hospedadora. Este sistema de almacenamiento de hierro sirve, entre otras cosas, para limitar su disponibilidad en caso de invasión microbiana (Weiss., 2005). Se ha observado experimentalmente que el hierro es esencial para que *Brucella* lleve a cabo su replicación dentro del macrófago (Roop *et al.*, 2009) y se ha detectado la producción de sideróforos en respuesta a bajas concentraciones de hierro *in vitro* y también la presencia de transportadores para este metal (Paulley *et al.*, 2007; Ojeda *et al.*, 2012). Además se ha sugerido que el grupo prostético hemo es una fuente mayoritaria de hierro para la bacteria, ya que la eliminación en *B. abortus* del gen *bhuA*, que codifica una proteína implicada en el transporte de estos grupos, conduce a una atenuación de su virulencia en macrófagos y en ratón (Paulley *et al.*, 2007; Anderson *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta estos hechos, se ha sugerido que la interacción de las BCVs con el RE podría proporcionar una fuente de hierro a la

bacteria, la cual provendría de la degradación de grupos hemo realizada en los macrófagos por la enzima hemo oxidasa (Roop *et al.*, 2009).

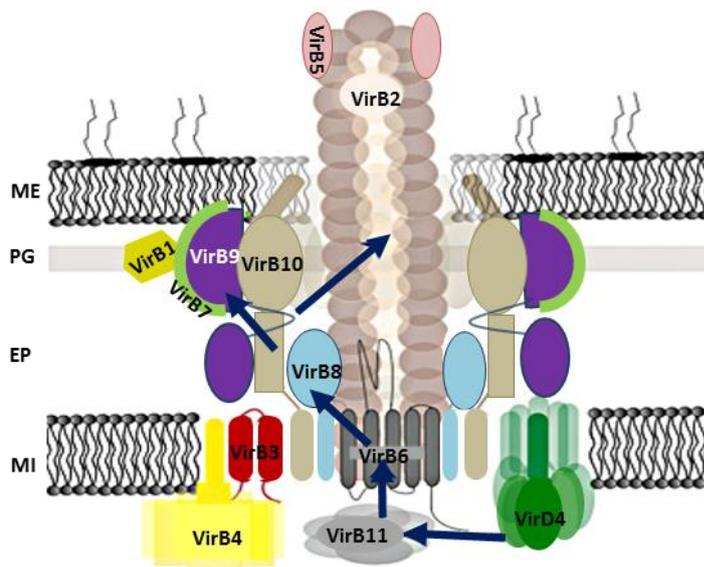
La modulación del metabolismo de *Brucella* durante la infección en el hospedador es un aspecto crucial para el desarrollo de su virulencia (Barbier *et al.*, 2011). En concreto, mutantes en genes de rutas metabólicas relacionadas con la respuesta a estrés nutricional, como el gen *rsh* en *B. suis* y *B. melitensis*, presentan una fuerte atenuación *in vitro* e *in vivo* (Dozot *et al.*, 2006). Respecto al catabolismo de la glucosa, se considera que en *Brucella* transcurre a través de la vía de las pentosas fosfato (en conjunción con el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, TCA), en vez de por la vía de la glucólisis o la ruta de Entner-Doudoroff (Barbier *et al.*, 2014; Zúñiga-Ripa *et al.*, 2014). Si bien los microorganismos de este género pueden metabolizar las hexosas a través de las vías mencionadas, éstas no parecen ser una fuente de carbono favorable, al menos para *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*. Dichas especies catabolizan preferentemente el eritritol (polialcohol con cuatro átomos de carbono) (Barbier *et al.*, 2014). En cambio, *B. ovis* presenta mutaciones en genes relacionados con el catabolismo de este polialcohol, relacionándose este hecho con diferencias en la patogenicidad con respecto a cepas lisas de *Brucella* (Tsolis *et al.*, 2009). Durante el inicio de la infección de macrófagos murinos por *B. abortus* se ha observado una reducción en la producción de enzimas del metabolismo central del carbono, incluidas las de la vía de las pentosas fosfato. Este hecho parece sugerir una menor disponibilidad intracelular de azúcares en esta etapa, viéndose favorecido el catabolismo de aminoácidos como fuente de energía alternativa (Lamontagne *et al.*, 2009). En etapas más avanzadas de la infección, una vez alcanzado el RE, la vía de las pentosas fosfato se activa en *Brucella* sugiriendo una nueva disponibilidad de azúcares (Lamontagne *et al.*, 2009). Así mismo, se ha observado que, durante la infección crónica en ratón, *Brucella* invade predominantemente los denominados “macrófagos alternativamente activados” (MAA) (Xavier *et al.*, 2013 a). Este tipo de macrófagos, a diferencia de los “clásicamente activados” (MCA) (vía IFN $\gamma$  y/o TNF $\alpha$ ) cuya función es fundamentalmente proinflamatoria y bactericida, desempeñan un papel importante en la resolución de la inflamación y curación de tejidos (Biswas & Mantovani., 2012). Se ha comprobado que los niveles intracelulares de glucosa en MAA son superiores a los presentes en MCA y que la replicación eficiente de la bacteria en MAA depende de su capacidad de transportar glucosa (presumiblemente para metabolizarla) (Xavier *et al.*, 2013 a). Si bien, no ha podido establecerse una relación entre una invasión preferente de este tipo de macrófagos (con capacidad bactericida reducida) y una mayor replicación de *Brucella*. Más bien, la mayor permisividad de estas células se relaciona con una mayor disponibilidad de glucosa como fuente de carbono para *Brucella* (Roop & Caswell., 2013).

Además del estrés nutricional, la bacteria todavía debe hacer frente a otro tipo de amenazas dentro del macrófago como son la exposición a especies reactivas de oxígeno, la producción de óxido nítrico y péptidos antibacterianos o al pH ácido, entre otros. *Brucella* se encuentra bien equipada, fisiológica y metabólicamente, para hacer frente a este medio hostil. Varios han sido los genes relacionados con la protección de *Brucella* frente a las condiciones de pH ácido del fagosoma, cuyos productos incluyen desde chaperonas hasta proteínas con funciones tamponantes. Algunos de ellos son *cydB* (Endley *et al.*, 2001), *hfq* (Roop *et al.*, 2002), *hdeA* (Valderas *et al.*, 2005) o *asp24* (Kahl-McDonagh & Ficht., 2006; Kahl-McDonagh *et al.*, 2006). Además, la mayoría de las especies de *Brucella* producen ureasa, la cual favorece la supervivencia de la bacteria en las condiciones de pH extremadamente ácido que se encuentra durante su paso por el tracto gastrointestinal en la infección oral. Sin embargo, parece que esta enzima no interviene en la protección de la bacteria dentro de las células hospedadoras (Bandara *et al.*, 2007; Sangari *et al.*, 2007; Paixão *et al.*, 2009). También el sistema dependiente de glutamato descarboxilasa (GAD), componente relevante en la resistencia al ácido en enterobacterias (Castanie-Cornet *et al.*, 1999; De Biase & Pennacchietti., 2012), está presente en *Brucella* (Roop *et al.*, 2009). Estudios recientes de secuenciación masiva de genomas de *Brucella* han evidenciado que, en las especies clásicas de este género, el sistema multiproteico GAD se encuentra degradado y no es funcional, en cambio en las especies “atípicas” (incluidas las aisladas de anfibios y babuinos), este sistema se encuentra genéticamente conservado y funcional, contribuyendo a la supervivencia *in vitro* a pH extremadamente bajos (Damiano *et al.*, 2015).

Aunque todavía se desconoce el mecanismo de actuación de muchos de los productos relacionados con el estrés ácido en *Brucella*, parece que alcanzar valores bajos de pH es un estímulo necesario para la inducción de

los genes del operón *virB* que codifican componentes del sistema de secreción Tipo IV (T4SS) necesario para la virulencia de la bacteria (Boschiroli *et al.*, 2002; Rouot *et al.*, 2003). El sistema VirB de *Brucella*, conservado en todas las cepas secuenciadas del género, está formado por 12 proteínas (VirB1-VirB12) que poseen similitud con las proteínas VirB de *Agrobacterium tumefaciens* (O'Callaghan *et al.*, 1999). En esta especie el sistema está formado por 11 proteínas codificadas en el operón VirB (VirB1-VirB11) y la proteína VirD4 codificada en el operón VirD, las cuales se distribuyen formando un canal que atraviesa las dos membranas de la envuelta celular y en cuyo extremo apical posee una estructura que entra en contacto con la célula hospedadora, mientras que en el extremo citoplásmico se sitúan proteínas con actividad NTPasa (VirB4 y VirD4) que aportan energía para la traslocación de moléculas efectoras (**Figura 4**) (Christie & Cascales., 2005; Chandran., 2013). El T4SS de *Brucella*, aunque no está completamente caracterizado, presenta dos principales diferencias respecto al de *A. tumefaciens*; un gen extra en el operón VirB (*virB12*), que codifica una proteína de ME (Sun *et al.*, 2005) y la ausencia de un gen homólogo a *virD4* (Boschiroli *et al.*, 2002). Recientemente se ha identificado una nueva proteína periplásmica, VirJ, que parece estar asociada al dominio secretor del T4SS en *Brucella* (Del Giudice *et al.*, 2016).

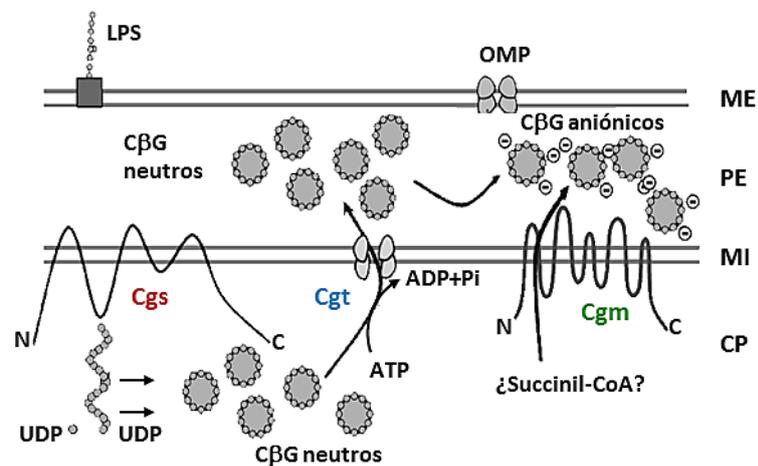
Entre los efectores del T4SS descritos en *Brucella* se encuentran VceA y VceC (de Jong *et al.*, 2008), RicA (de Barsy *et al.*, 2011; Marchesini *et al.*, 2011) y las proteínas BspA, BspB, BspC, BspE y BspF (Myeni *et al.*, 2013). Además de los efectores secretados a través del sistema T4SS, se han identificado otros secretados a través de una vía independiente del mismo (Salcedo *et al.*, 2008; Radhakrishnan *et al.*, 2009; de Barsy *et al.*, 2012), lo cual sugiere la existencia en el género *Brucella* de un sistema alternativo al T4SS para la secreción de sustancias (Lacerda *et al.*, 2013). Muchos de los sustratos del sistema T4SS poseen dominios eucariotas, sugiriendo una interacción directa con proteínas del hospedador, pero se desconoce la función de muchos de ellos. Se ha observado que el T4SS desempeña un papel esencial en el desarrollo de la vacuola replicativa en *Brucella*, modulando el tráfico intracelular (Celli *et al.*, 2003; Myeni *et al.*, 2013; Ahmed *et al.*, 2016) y es necesario para el establecimiento de la infección (O'Callaghan *et al.*, 1999; Sieira *et al.*, 2000; Celli *et al.*, 2003; Martín-Martín *et al.*, 2012; Sá *et al.*, 2012; Macedo *et al.*, 2015; Del Giudice *et al.*, 2016). Mutantes de *Brucella* en el operón *virB*, tanto de especies lisas como rugosas, no interactúan con el RE y se fusionan con los lisosomas, lo que conduce a la degradación de la bacteria (Comerci *et al.*, 2001; Delrue *et al.*, 2001; Celli *et al.*, 2003; Starr *et al.*, 2008; Macedo *et al.*, 2015). En consecuencia, estos mutantes muestran una marcada atenuación tanto en cultivos de fagocitos profesionales y no profesionales (O'Callaghan *et al.*, 1999; Sieira *et al.*, 2000; Celli *et al.*, 2003; Martín-Martín *et al.*, 2012; Macedo *et al.*, 2015; Del Giudice *et al.*, 2016), como en modelo murino (Sieira *et al.*, 2000; Kahl-McDonagh & Ficht., 2006; Martín-Martín *et al.*, 2012; Sá *et al.*, 2012; Macedo *et al.*, 2015; Del Giudice *et al.*, 2016) y en el hospedador natural (Kahl-McDonagh & Ficht., 2006; Zygumnt *et al.*, 2006).



**Figura 4.** Modelo estructural del sistema de secreción tipo IV de *Agrobacterium tumefaciens*. Esquema tomado y modificado de Chandran, 2013. Este sistema está compuesto por 11 proteínas (VirB1-VirB11) codificadas por el operón *virB* y por la proteína VirD4 codificada en el operón *virD*. En flechas se indica la interacción propuesta entre los diferentes miembros para la traslocación de sustratos efectoras al medio extracelular. ME; Membrana externa, PG; Peptidoglucano, EP; Espacio periplásmico, MI; Membrana interna.

Otros factores relacionados con el establecimiento del nicho replicativo en *Brucella*, son los glucanos cíclicos (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005), una familia de polímeros cíclicos de moléculas de D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$ 1,2 (C $\beta$ G) y que están presentes en el espacio periplásmico tanto de *Brucella*, como de otras especies relacionadas de patógenos de plantas (Bohin., 2000). Éstos son sintetizados por la proteína periplásmica Cgs (*Cyclic Glucan Synthase*) (**Figura 5**) codificada en el gen *cgs* (Iannino *et al.*, 1998). Un transportador de tipo ABC específico de *Brucella* denominado Cgt (*Cyclic Glucan Transporter*) transloca los C $\beta$ G al espacio periplásmico donde son modificados, mediante la adición de grupos succínicos, por la enzima Cgm (*Cyclic Glucan Modifier*) (Roset *et al.*, 2004, 2006). La síntesis de C $\beta$ G por la enzima Cgs en *Brucella*, al contrario de lo que ocurre en las bacterias patógenas de plantas, no se encuentra osmoregulada (Briones *et al.*, 1997; de Iannino *et al.*, 2000). Se han realizado estudios de la ruta sintética de los C $\beta$ G con mutantes simples de *B. abortus* en los genes *cgs*, *cgm* y *cgt* (Roset *et al.*, 2006, 2014), observándose, por un lado, que los residuos succínicos confieren un carácter aniónico a la envuelta bacteriana (Roset *et al.*, 2006). Por otro lado, no se detectó la presencia de C $\beta$ G en el mutante  $\Delta cgs$ , los polímeros presentes en los mutantes restantes mostraron carga neutra y su localización difirió en función de la mutación; citoplásmica ( $\Delta cgt$ ) o periplásmica ( $\Delta cgm$ ) (Roset *et al.*, 2014). Además, se comprobó que la presencia de C $\beta$ G aniónicos interviene en la adaptación de la bacteria a condiciones hipo-osmóticas y que la carga de los C $\beta$ G no es determinante en la supervivencia intracelular de la bacteria, sugiriéndose que en el tráfico intracelular de la misma no se dan condiciones hipo-osmóticas (Roset *et al.*, 2006, 2014).

La función de los C $\beta$ G en la supervivencia intracelular de la bacteria recae en su capacidad para secuestrar colesterol presente en las membranas de células eucariotas, sugiriendo que estos polímeros son capaces de desorganizar las balsas lipídicas ricas en colesterol presentes en las membranas de los fagosomas fagosomas (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005). En estos microdominios también se localiza la proteína flotilina-1, la cual es reclutada en la membrana de los fagosomas durante su maduración mediante la fusión con los endosomas tardíos (Dermine *et al.*, 2001). En este contexto, se cree los C $\beta$ G podrían intervenir en la maduración de la BCV. Se ha detectado un enriquecimiento en flotilina-1 en las membranas de BCVs que albergan *B. abortus* 2308 y una menor presencia de esta proteína en las vacuolas que contienen un mutante  $\Delta cgs$  de esta cepa (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005). Además, las BCVs infectadas con dicho mutante reclutan cathepsina D y se fusionan con los lisosomas, mientras que las que contienen la cepa parental evitan dicha fusión y terminan dirigiéndose al RE (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005). Sin embargo, no está totalmente claro el mecanismo completo por el que ocurre la disrupción de las balsas lipídicas de las BCVs por los C $\beta$ G (Celli, 2006). Otros estudios realizados en CDs, fagocitos profesionales importantes en la activación de la respuesta inmune en el foco de infección, han mostrado un papel activador de los C $\beta$ G sobre estas células, permitiéndoles alcanzar un estado de maduración transitorio (Martirosyan *et al.*, 2012).



**Figura 5. Modelo de la síntesis de los C $\beta$ G en *Brucella*.** Esquema tomado y modificado de Roset *et al.*, 2014. Los C $\beta$ G de carga neutra se sintetizan en el citoplasma (CP) por la proteína Cgs (rojo) localizada en la membrana interna (MI) a partir de UDP-glucosa. Después se transportan al periplasma (PE) por el transportador tipo ABC denominado Cgt (azul), un vez allí son modificados con una media de dos residuos succinil por la proteína Cgm (verde) empleando como donador probable Succinil-CoA. Los C $\beta$ G aniónicos intervienen en la adaptación de la bacteria a condiciones hipo-osmóticas. LPS; lipopolisacárido, OMP; proteína de ME.

*Brucella* requiere de la interacción con las balsas lipídicas presentes en la membrana plasmática de la célula hospedadora para establecer la infección con éxito (Kim *et al.*, 2004; Lapaque *et al.*, 2006; Martín-Martín *et al.*, 2010). Debido a que el colesterol es componente mayoritario de las balsas lipídicas, los C $\beta$ G podrían estar también involucrados en la interacción inicial entre la bacteria y la célula (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005). En este contexto, se ha observado que la inactivación del gen *cgs* en *B. abortus* 2308 y *B. abortus* S19 produce un aumento de la sensibilidad bacteriana a agentes surfactantes, lo que sugiere la introducción de alteraciones en la ME que podrían afectar a su penetración en las células (Briones *et al.*, 2001). Dichas alteraciones no parecen incluir diferencias en la exposición de elementos de la ME como Omps (Omp16, Omp19) y LPS, puesto que su expresión en mutantes  $\Delta cgs$  y  $\Delta cgt$  de *B. abortus* fue similar a la detectada en la cepa parental (Roset *et al.*, 2014). Además, los mutantes  $\Delta cgs$  de *B. abortus* 2308 y *B. abortus* S19 no mostraron diferencias en la internalización en células HeLa o macrófagos murinos, pero fueron incapaces de replicarse intracelularmente (Briones *et al.*, 2001).

También se ha descrito un papel de los C $\beta$ G determinante en el desarrollo de inflamación en el bazo de los ratones infectados con cepas lisas de *Brucella* (Roset *et al.*, 2014; Degos *et al.*, 2015). Los ratones infectados con  $1 \times 10^6$  UFC del mutante  $\Delta cgs$  tanto de *B. abortus* S19, como de *B. abortus* 2308 mostraron bazos de tamaño notablemente menores a los obtenidos en la infección con las cepas respectivas cepas parentales, a pesar de detectarse recuentos esplénicos bacterianos elevados (Briones *et al.*, 2001; Roset *et al.*, 2014). Además, para alcanzar niveles de esplenomegalia similares entre la cepa parental y el mutante  $\Delta cgs$  de *B. abortus* S19 fue necesario una dosis  $10^3$  veces superior del mutante, respecto a la dosis inicial de *B. abortus* (Roset *et al.*, 2014).

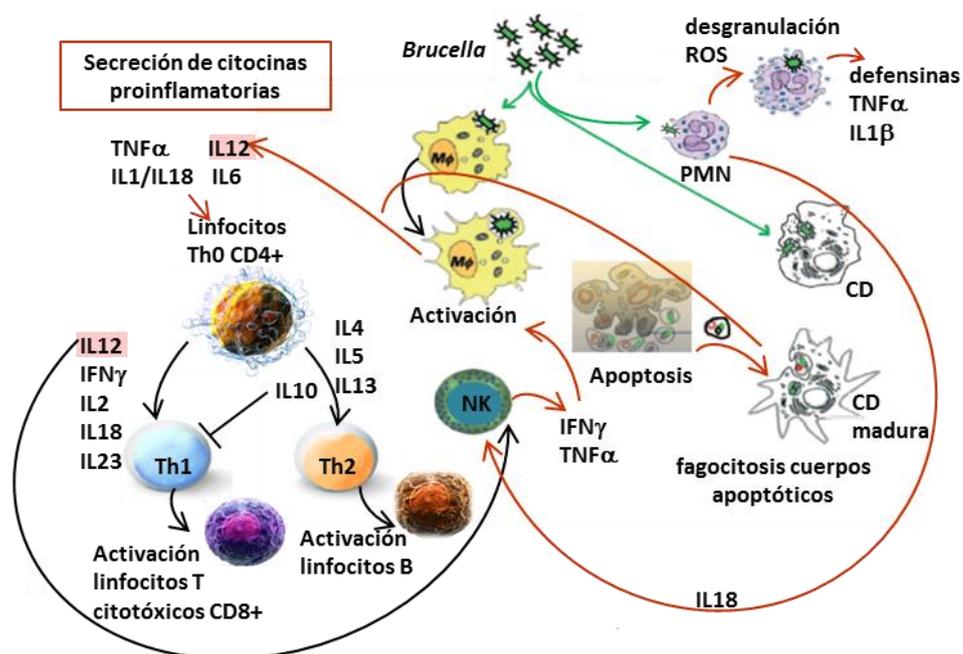
Respecto al papel del gen *cgs* en la virulencia de *Brucella*, se han obtenido distintos resultados dependiendo de la cepa analizada. Por un lado, se ha observado que su inactivación en *B. abortus* 2308 provoca una ligera atenuación de la colonización esplénica de la bacteria y ésta es más acusada en el mutante  $\Delta cgs$  de la cepa vacunal *B. abortus* S19 (Briones *et al.*, 2001). Por otro lado, en ratones infectados con  $1 \times 10^6$  UFC del mutante  $\Delta cgs$  de *B. ovis* PA se ha detectado una drástica reducción en la colonización esplénica, mientras que en cultivos de macrófagos murinos no se observaron diferencias en la tasa de multiplicación intracelular del mutante  $\Delta cgs$  y la cepa parental (Martín-Martín *et al.*, 2012). Sin embargo, el incremento de la dosis de inoculación ( $1 \times 10^8$  UFC) del mutante  $\Delta cgs$  de *B. ovis* PA conduce a una colonización esplénica similar a la de la cepa parental (Sancho., 2014). En estas últimas condiciones, en concordancia con el papel inflamatorio descrito para los C $\beta$ G (Roset *et al.*, 2014), el mutante  $\Delta cgs$  de *B. ovis* PA mostró una marcada reducción del tamaño del bazo en comparación con la cepa parental, la cual se detectó en presencia de grados de infección elevados del mutante (Sancho., 2014).

#### 4. Respuesta inmune inducida por *Brucella*

La inmunidad innata se articula en torno a una serie de mecanismos de respuesta no específicos en las etapas tempranas de la infección, antes de que la inmunidad adaptativa, mediada por la selección clonal de linfocitos específicos, se haya establecido. Los efectores principales de la inmunidad innata en mamíferos (entre ellos macrófagos, CDs y neutrófilos) detectan la presencia de patógenos invasores a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) y promueven tanto mecanismos de inmunidad innata, como adaptativa para erradicar o controlar la infección (Hajishengallis & Lambris., 2016). Una de las principales familias de PRR está representada por los receptores de tipo Toll (TLR). Cada miembro de los TLRs reconoce distintas estructuras microbiológicas conservadas (patrones) (PAMPs), dotando así a la respuesta innata de un cierto grado de especificidad. Además de los efectores celulares, la inmunidad innata posee componentes humorales que incluyen moléculas de reconocimiento de patrones, como las colectinas (entre ellas la lectina de unión a manosa) o las proteínas del sistema del complemento (Hajishengallis & Lambris., 2016).

La señalización de los TLRs en las células presentadoras de antígeno (CPAs) juega un papel crucial en el vínculo entre respuesta innata y adaptativa. Todos los TLRs comparten un dominio citoplasmático denominado Toll/IL1-Receptor (TIR), en el cual se inicia la vía de señalización desencadenada por la unión del TLR a su

ligando. El dominio TIR tiene como adaptadores, entre otros, MyD88, TRIF, TRAM y TIRAP. Su interacción con éstos permite que la señal se transmita al núcleo con la translocación del factor NF- $\kappa$ B y producción de citocinas proinflamatorias (Hajishengallis & Lambris., 2010). Aunque la delimitación total entre inmunidad innata y adaptativa no es posible, las citocinas están involucradas en el inicio de la respuesta inflamatoria y sirven para definir la magnitud y naturaleza de la respuesta inmune específica. En este contexto, las células fagocíticas realizan una labor de gran importancia en el establecimiento de una respuesta inmune adaptativa que elimine el patógeno, ya que son los principales productores de citocinas, especialmente de IL1, IL6, IL8, IL12 y TNF $\alpha$  (**Figura 6**) (Baldwin & Goenka., 2006). El reconocimiento de endotoxinas como el LPS bacteriano es una potente señal que activa los macrófagos murinos, induciendo en éstos la producción de TNF $\alpha$ . Éste a su vez provoca una potenciación de las capacidades antimicrobianas de los macrófagos al activarse la ruta dependiente del óxido nítrico y de oxígeno (Raetz *et al.*, 2007). Además, tanto macrófagos como CDs una vez activados por la detección del patógeno van a producir IL12, la cual estimula la producción de IFN $\gamma$  por las células citotóxicas NK (Baldwin & Goenka., 2006).



**Figura 6. Principales citocinas secretadas en respuesta a la infección por *Brucella*.** Esquema tomado y modificado de Martirosyan *et al.*, 2011. Tras penetrar en el organismo hospedador, *Brucella* es fagocitada (flechas verdes) por células del sistema inmune innato, principalmente macrófagos (M $\Phi$ ), células dendríticas (CD) y polimorfonucleares (PMN). No se produce la desgranulación de PMNs y liberación extracelular de mediadores de la inflamación y los mecanismos de apoptosis se encuentran inhibidos. La infección desencadena una débil respuesta innata que se pone de manifiesto por una débil producción de citocinas proinflamatorias (flechas rojas) y baja activación/maduración de las células de la respuesta innata. Esto conduce al desarrollo de una pobre respuesta inmune adaptativa. En concreto, tanto la baja producción de IL12, citocina central en la coordinación de la respuesta innata hacia una respuesta inmune adaptativa, principalmente celular Th1, como de TNF $\alpha$ , fallan al estimular la producción de IFN $\gamma$  por los linfocitos CD4+. Esto reduce la función potenciadora del IFN $\gamma$  sobre la actividad citotóxica de los linfocitos CD8+ para eliminar todas aquellas células infectadas por *Brucella*.

Una respuesta inmune adaptativa eficaz permite eliminar el patógeno que ha escapado a los mecanismos de la respuesta innata y protege al hospedador frente a la re-infección con este mismo patógeno. En este contexto, la selección de linfocitos es determinante para el establecimiento de la memoria inmunológica, la cual es un aspecto fundamental de la vacunación. En concreto, los linfocitos T colaboradores (Th) CD4+ son especialmente

importantes. Estos determinan qué tipo de respuesta adaptativa se dispara, la celular/Th1 (actividad citotóxica) o la humoral/Th2 (producción de anticuerpos). Esta decisión depende en gran parte del patrón de citocinas producido. Las repuestas inmunológicas eficaces frente a patógenos que persisten intracelularmente están fundamentalmente mediadas por la inmunidad celular. Los componentes claves de la inmunidad celular en ratón incluyen citocinas proinflamatorias como el IFN $\gamma$ , producido por linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, así como por células del sistema innato (NK) y la fagocitosis favorecida por la opsonización del patógeno con inmunoglobulinas de tipo IgG2 (Baldwin & Goenka., 2006). En concreto, el IFN $\gamma$  es un factor crucial en la activación de la maquinaria antimicrobiana de los macrófagos para una destrucción eficiente del patógeno. Además, la producción de IL12 por macrófagos activados potencia la polarización hacia una respuesta de tipo Th1. Así mismo, ésta citocina induce la producción de las subclases de inmunoglobulinas IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> e IgG<sub>3</sub> por linfocitos B (Finkelman *et al.*, 1990; Snapper & Paul., 1987; Snapper *et al.*, 1992). Por último, los linfocitos Th2 en ratón producen principalmente las citocinas IL4, IL5 e IL10 y controlan la respuesta inmune humoral asociada a la producción de IgG<sub>1</sub> (Finkelman *et al.*, 1990; Mosmann *et al.*, 2005) (**Figura 6**). El papel de la respuesta de tipo Th2 en el control de la brucelosis murina ha sido, por lo general, considerado de menor relevancia respecto al ejercido por la respuesta tipo Th1 (Baldwin & Goenka., 2006; Goenka *et al.*, 2011; Vitry *et al.*, 2012). Sin embargo, se están sumando evidencias que muestran un papel fundamental de la inmunidad humoral en la protección frente a la reinfección de *Brucella* (Vitry *et al.*, 2014).

Los microorganismos pertenecientes al género *Brucella* manifiestan un marcado carácter evasivo a los mecanismos del sistema inmune del hospedador. Éste se ejemplifica, entre otros, con la ausencia de signos de endotoxicidad como sepsis o coagulación en el torrente sanguíneo, y una baja actividad del sistema del complemento (Barquero-Calvo *et al.*, 2007). Transcurridas las primeras horas tras la entrada de *Brucella* en la célula hospedadora, el 90% de los organismos son destruidos por ésta, mientras que el 10% es capaz de alcanzar un nicho replicativo, estableciendo con éxito la infección (Pei *et al.*, 2008). Así, aun con un pequeño número de bacterias, *Brucella* es capaz de producir una infección crónica, lo cual pone de manifiesto su elevado poder patogénico (de Figueiredo *et al.*, 2015).

Como bacteria Gram negativa, *Brucella* es detectada por los TLR2, TLR4 y TLR9, los cuales reconocen lipoproteínas, el LPS y el ADN bacteriano, respectivamente (Oliveira *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha propuesto que las bacterias de este género han desarrollado una estrategia sigilosa de entrada en el hospedador mediante la reducción de PAMPs, asegurándose una baja actividad estimuladora y toxicidad en las células hospedadoras (Lapaque *et al.*, 2005; Barquero-Calvo *et al.*, 2007, 2009; Palacios-Chaves *et al.*, 2011). En concreto, el LPS de *Brucella*, al contrario que el de otras bacterias Gram negativas como *Salmonella* o *E. coli*, es un débil inductor de la respuesta innata y las rutas de señalización mediadas por el reconocimiento de TLRs en macrófagos murinos desencadenan una pobre producción temprana de citocinas proinflamatorias (Barquero-Calvo *et al.*, 2007). El LPS de *Brucella* presenta particularidades estructurales, tanto a nivel de la cadena O como del núcleo y del lípido A, respecto LPS de otras bacterias Gram negativas, que parecen actuar como un escudo escondiendo PAMPs (Lapaque *et al.*, 2005; Conde-Álvarez *et al.*, 2012; Kubler-Kielb & Vinogradov., 2013 a). Además, se han identificado dos proteínas producidas en algunas especies de *Brucella*, BtpA (Salcedo *et al.*, 2008) y BtpB (Salcedo *et al.*, 2013 b) relacionadas con una supresión de la respuesta innata del hospedador mediada por TLRs. Ambas proteínas contienen dominios TIR que interaccionan con el adaptador TIRAP, acelerando su degradación y reduciendo la producción de citocinas proinflamatorias por las células infectadas (Radhakrishnan *et al.*, 2009; Sengupta *et al.*, 2010; Snyder *et al.*, 2014). El papel de los TLR2 y TLR4 en la inmunidad frente a *Brucella* ha sido discutido. Algunos estudios *in vitro* han descrito a las lipoproteínas como potentes activadores de la producción de citocinas proinflamatorias mediada por el receptor TLR2 (Giambartolomei *et al.*, 2004). También se ha descrito una mayor proliferación de *B. abortus* en ratones *knock out* (KO) para el receptor TLR4, (Campos *et al.*, 2004; Copin *et al.*, 2007). En cambio, en otros estudios no se ha observado una contribución de los receptores TLR2 y TLR4 en el curso de la infección por *B. abortus* en ratones KO, respecto a los ratones *wild type* (Weiss., 2005). En cuanto a la infección por *B. ovis* en modelo murino, los receptores TLR2 y TLR4 no son necesarios para el control de la infección (Vieira *et al.*, 2013). En cambio, se ha demostrado que el receptor

TLR9 desempeña un papel fundamental en el control de la infección por *B. ovis* en la fase aguda (día 7 p.i.) (Vieira *et al.*, 2013).

Por otro lado, tras la infección *ex vivo* de CDs y macrófagos murinos con *Brucella* también se observa una débil producción de citocinas proinflamatorias (Weiss., 2005; Martín-Martín *et al.*, 2010). En la infección por *Brucella* las CDs son rápidamente invadidas y no son capaces de concluir su maduración (Salcedo *et al.*, 2008; Archambaud *et al.*, 2010), lo cual se cree que contribuye a un fracaso en el establecimiento de una respuesta inmune adaptativa efectiva, representando uno de los reservorios en los que la infección permanece latente (Billard *et al.*, 2007). Estudios con C $\beta$ G de *B. abortus* han mostrado que estos parecen ser reconocidos por los receptores TLR4 y de lectina tipo C presentes en CDs, promoviendo una importante expresión de citocinas proinflamatorias en estas células (Martirosyan *et al.*, 2012; Degos *et al.*, 2015). En este contexto, al contrario que lo observado para otros factores de virulencia de *Brucella* que suelen poseer propiedades inmunosupresoras, los C $\beta$ G parecen ser potentes activadores de las CDs (Martirosyan *et al.*, 2012). La estimulación *in vitro* de cultivos CDs de ratón y humanas con C $\beta$ G provoca la secreción de un patrón de citocinas dual, pro y antiinflamatorias, que parecen facilitar un reclutamiento transitorio de neutrófilos en el lugar de la inyección de C $\beta$ G en ratones (Degos *et al.*, 2015). Sin embargo, el papel de los neutrófilos, nicho de replicación secundario para *Brucella* por su breve ciclo de vida, parece estar relacionado con un control negativo en la activación de la respuesta de tipo Th1, en vez de ejercer como primera línea de defensa en la infección murina (Barquero-Calvo *et al.*, 2013). En concreto, se ha observado que la ausencia de PMNs en ratones KO infectados con *B. abortus* 2308 incrementa la activación de poblaciones de linfocitos T CD4+, CD8+ y linfocitos B, mejorando la eliminación de la infección en bazo (Barquero-Calvo *et al.*, 2013).

En las etapas tempranas de la infección *Brucella* también es capaz de retrasar e incluso inhibir los mecanismos de apoptosis. Este hecho se ha comprobado en linfocitos y monocitos de animales infectados de manera natural por *Brucella*, no así en las mismas células de controles negativos o en animales vacunados con *B. abortus* S19 (Galdiero *et al.*, 2000). También se ha comprobado la capacidad de *B. suis* de prolongar la vida de macrófagos, inhibiendo la apoptosis sin activar estas células de manera significativa (Gross *et al.*, 2000). El mecanismo por el que *Brucella* inhibe la apoptosis no está claro, aunque parece estar mediado por el ligando Fas y la activación de la vía de las caspasas o por el IFN $\gamma$  (He *et al.*, 2006). La capacidad de *Brucella* para producir señales antiapoptóticas en las células hospedadoras le permite alcanzar elevados niveles de parasitemia, sin alterar, en general, la viabilidad de la célula (Baldwin & Goenka., 2006). En consecuencia, existe una pobre liberación al medio extracelular de cuerpos apoptóticos y mediadores de la inflamación. Todo ello se traduce en una débil activación de la respuesta innata, conduciendo a una baja expresión de moléculas presentadoras de antígenos, tanto en CDs como en macrófagos (Salcedo *et al.*, 2008). La deficiente presentación de antígenos y la consecuente articulación de una respuesta adaptativa ineficaz, favorecen el establecimiento y cronificación de la infección (Billard *et al.*, 2007; Salcedo *et al.*, 2008; Xavier *et al.*, 2010 a).

El papel del IFN $\gamma$  en la defensa frente a la infección por *Brucella*, mediante la polarización hacia una respuesta inmune de tipo Th1 y activación de las células CD8+, está bien establecido (Murphy *et al.*, 2001; Paranavitana *et al.*, 2005; Durward *et al.*, 2012). Como también lo está el papel de los linfocitos CD4+ en la estimulación de la producción de IFN $\gamma$  en ratón, tras la infección por *Brucella* (Jiménez de Bagüés *et al.*, 1994; Zhan *et al.*, 1995; Hort *et al.*, 2003; Vitry *et al.*, 2014). Estudios con ratones que poseen una producción defectiva de IFN $\gamma$  han mostrado una mayor replicación de *B. abortus* (Murphy *et al.*, 2001). También se ha observado una mayor invasión de esta especie en ratones KO para el factor F-1 regulador de la producción de IFN $\gamma$  (IRF-1) (Ko *et al.*, 2002). Además, la administración de IL18 e IL12 recombinantes en ratones BALB/c infectados con *B. abortus* induce protección frente a la infección, debido a un aumento en la producción de IFN $\gamma$  (regulada por estas dos citocinas) (Pasquali *et al.*, 2002). En cuanto a la evolución de los niveles de IFN $\gamma$  e IL12 a lo largo del tiempo, se ha observado que, tras una primera infección de ratones con *B. abortus*, la presencia de ambas citocinas se detecta en suero durante la primera semana en la fase aguda (Sathiyaseelan *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 2008; Cha *et al.*, 2010). Durante esta fase, la producción de IL18 endógena, la cual actúa en sinergia con IL12 para inducir la producción de IFN $\gamma$ , está regulada negativamente en los esplenocitos de los

animales infectados con *B. abortus* (Fernández-Lago *et al.*, 1996). Sin embargo, se ha observado que la represión de la producción de IL18 una vez *Brucella* establece la infección, no afecta a la producción de IFN $\gamma$  (Fernández-Lago *et al.*, 1999). A partir de la fase aguda, los niveles máximos de IFN $\gamma$  e IL12 en suero van disminuyendo hasta alcanzar niveles basales al inicio de la fase crónica (Fernández-Lago *et al.*, 1996; Hort *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2008; Cha *et al.*, 2010). Sin embargo, la producción endógena de IFN $\gamma$  se detecta hasta finales de la fase crónica (Pasquali *et al.*, 2001; Hort *et al.*, 2003). Estas diferencias entre los niveles en séricos y esplénicos de IFN $\gamma$  han sugerido que éste podría permanecer como reservorio en el bazo, liberándose en menor medida a la circulación (Sathiyaseelan *et al.*, 2006). Además, en ratones BALB/c se ha observado un paréntesis en la producción de IFN $\gamma$  por esplenocitos murinos entre las dos primeras semanas de la fase aguda y el inicio de la fase crónica. Esto se ha relacionado, por un lado, con lesiones esplénicas derivadas de la importante colonización de *Brucella* en la fase aguda conducentes a una depleción de linfocitos CD4+ y CD8+ (Hort *et al.*, 2003). Sin embargo, los esplenocitos de estos animales son capaces de producir IFN $\gamma$  tras la reestimulación *ex vivo* con antígenos de *Brucella* (Hort *et al.*, 2003). Por otro lado, se ha relacionado con la disminución en la expresión del receptor-2 de IL12 observada en esplenocitos de los animales durante ese periodo de tiempo (Sathiyaseelan *et al.*, 2006). Además, se ha observado que, tras una segunda infección con *B. abortus*, una producción endógena temprana de IFN $\gamma$  juega un papel determinante en prevenir la infección en ratón (Pasquali *et al.*, 2001).

Por otro lado, se ha comprobado una influencia en el patrón de citocinas inducido, dependiendo de la naturaleza del antígeno con el que se inmunicen los ratones. Así, durante la fase aguda de la infección de los ratones con *B. abortus* viva, no se detecta la producción de IL2, ni IL4 por las células esplénicas, pero sí una predominante producción de IFN $\gamma$  (respuesta Th1). En cambio, los esplenocitos de los animales inoculados *in vivo* con *B. abortus* inactivada por calor o con extractos solubles, se detectan cantidades significativas de IL4, pequeñas cantidades de IL2 y baja frecuencia de precursores CD4+ productores de IFN $\gamma$  (respuesta Th2) (Zhan *et al.*, 1995; Zhan & Cheers., 1995). Por último, en los animales no se detecta la presencia de IL 2 e IL4 en bazo durante la fase aguda de la infección (semana 4 p.i.) (Zhan *et al.*, 1995). Este aspecto relevante a la hora del diseño de vacunas, puesto que las bacterias vivas inducen una respuesta Th1 dependiente de células T, la cual es fundamental para el control de la infección (Martirosyan *et al.*, 2011). Estudios en ratones inmunizados con diferentes antígenos de *B. ovis* muestran una producción de citocinas de respuesta inmune tipo Th1 durante los primeros días posteriores a una segunda estimulación *ex vivo*. Así, en respuesta a la reestimulación con OMPs de *B. ovis* se detecta un pico máximo en los niveles de IL2 en el día 1 post estimulación, que posteriormente desciende notablemente a las 48 horas, pudiendo mantenerse los niveles de IL2 elevados durante 5 días en el caso de reestimulación con proteínas de MI y los niveles de IL4 en respuesta a OMPs se mantiene basales a lo largo del tiempo (Salas-Téllez *et al.*, 2005).

La naturaleza de la respuesta inmune generada en ratón puede analizarse por la presencia de las distintas subclases de IgG frente al LPS de *Brucella* (Elzer *et al.*, 1994 a; Fernández-Lago *et al.*, 1996; Hort *et al.*, 2003). En la respuesta de tipo Th1 frente a especies lisas de *Brucella* hay una predominancia de anticuerpos IgG<sub>2a</sub> e IgG<sub>3</sub> frente al S-LPS que se detectan durante las dos primeras semanas p.i., mientras que los de tipo IgG<sub>1</sub> se detectan a partir del final de la fase aguda (Fernández-Lago *et al.*, 1996). Si bien, mediante el empleo de un panel de ratones con fenotipos deficientes en varias vías activación de la respuesta adaptativa (linfocitos T CD4+, adaptador MyD88, entre otras), que mostraban varias subclases de IgG alteradas, se ha demostrado que el predominio de estas no es un factor crítico en conferir protección, al menos frente a *B. melitensis* en una segunda infección (Vitry *et al.*, 2014).

Otra de las citocinas de interés en el curso de la brucelosis murina es la IL10. Su producción por las células CD4+ Th2, macrófagos activados y algunas poblaciones de células B, parece ejercer un efecto regulador sobre la producción de IFN $\gamma$  y la respuesta Th1 en ratón y en humano (Fernandes & Baldwin., 1995; Fernández-Lago *et al.*, 1996). Se ha observado que, tras la inhibición de la señalización de la IL10, los ratones son capaces de controlar mejor la infección por *Brucella* (Xavier *et al.*, 2013 b). También se relaciona la producción de IL10 por el hospedador con una limitación de la inflamación (Saraiva & O'Garra., 2010).

Por último, la búsqueda de parámetros relacionados con la inmunidad protectora es un aspecto importante en el desarrollo de vacunas. En este aspecto, las citocinas que juegan un papel fundamental en la inmunidad adaptativa frente a *Brucella* en modelo murino son IL12, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  (Ko & Splitter., 2003). Aunque se considera que una inmunidad protectora depende más del momento en el que se produce la respuesta de citocinas que del nivel absoluto de la expresión de una citocina concreta (Pasquali *et al.*, 2001), no se han identificado marcadores que puedan correlacionar inequívocamente con una protección inmunológica en el ganado (de Figueiredo *et al.*, 2015).

## 5. Modelo murino en el estudio de la brucelosis.

La investigación de la infección por *Brucella* en los hospedadores naturales es descartada con frecuencia debido a motivos éticos, económicos y prácticos, por lo que se emplean modelos experimentales. Numerosos aspectos de la virulencia de *Brucella* se investigan en cultivos celulares y en modelos animales. Entre los empleados en el estudio de la brucelosis se encuentran los ratones, ratas y cobayas. El ratón (*Mus musculus*), aunque no es el hospedador natural de *Brucella*, es el modelo experimental empleado con más frecuencia (Vemulapalli *et al.*, 2000; Baldwin & Parent., 2002; Ko & Splitter., 2003; Grilló *et al.*, 2012). Este tipo de modelo se utiliza para investigar, entre otros aspectos, factores de virulencia de *Brucella*, caracterizar la respuesta inmune del hospedador o evaluar tratamientos farmacológicos y vacunas (Baldwin & Parent., 2002; Grilló *et al.*, 2006 b; Martín-Martín *et al.*, 2012; Sancho *et al.*, 2014; Clausse *et al.*, 2014; Soler-Lloréns *et al.*, 2014; Czibener *et al.*, 2016). El curso de la brucelosis murina depende, entre otros, de la virulencia de la cepa bacteriana, la dosis y vía de inoculación, así como del fondo genético, la edad y el sexo de los animales (Grilló *et al.*, 2012).

Se ha demostrado experimentalmente que todas las especies de ratones empleadas son susceptibles a la infección por *Brucella* (Cheers & Ho., 1983; Phillips *et al.*, 1989). Sin embargo, existen líneas más susceptibles que otras. En concreto, los ratones BALB/c son susceptibles a la infección por *Brucella*, mientras que la línea C57BL/10 es relativamente resistente (Baldwin & Parent., 2002). Ambas líneas de ratones poseen un genotipo “sensible” a la infección respecto al alelo *Nramp1* (*natural resistance-associated macrophage protein*) (Grilló *et al.*, 2012). El gen murino *Nramp1* codifica una glicoproteína de membrana implicada en la limitación del acceso microbiano a micronutrientes esenciales como hierro y manganeso dentro de los fagosomas, lo cual está implicado en la activación temprana de los macrófagos (Cellier *et al.*, 2007). La secuenciación del gen *Nramp1* de 20 líneas de ratones resistentes (Bcg<sup>r</sup>) y 7 sensibles (Bcg<sup>s</sup>) a la infección por micobacterias mostraron que la susceptibilidad a la infección está asociada con la sustitución de un aminoácido en este transportador (Malo *et al.*, 1994). En concreto, la presencia de un residuo de Asp en vez de Gly en el segundo dominio transmembrana causa la susceptibilidad a la infección en ratones (Malo *et al.*, 1994; Vidal *et al.*, 1995). Mientras que la presencia de mutaciones en este alelo está ligada a la resistencia murina a la infección por diferentes patógenos como *Leishmania*, *Salmonella* y *Mycobacterium* (Ko & Splitter., 2003), *Nramp1* no parece jugar un papel fundamental en la susceptibilidad de las cepas de ratones a *Brucella* (Guilloteau *et al.*, 2003). Las bases de la diferencia entre el fenotipo “resistente” y “susceptible” de ratón frente a la infección por *Brucella* parecen recaer en la incapacidad de este último, en el mantenimiento de la producción de IFN $\gamma$  a partir de la fase aguda de la infección (Hort *et al.*, 2003).

Las vías de inoculación comúnmente empleadas para la infección en ratón son la intraperitoneal (IP) y la intravenosa (IV), con dosis de *Brucella* que pueden ir desde 10<sup>4</sup> UFC/ratón a 10<sup>8</sup> UFC/ratón en volúmenes de 0,05 a 0,2 mL (Grilló *et al.*, 2012). El bazo y el hígado son los principales órganos diana, aunque la mayoría de los órganos del sistema reticuloendotelial del ratón pueden ser infectados por *Brucella*. Ambas vías infectan al 100% de los ratones de manera similar, sin embargo, la vía IP es la más ampliamente utilizada pues es técnicamente más sencilla de realizar y admite mayores volúmenes. Además, mediante la inoculación IP se obtienen niveles bacterianos más elevados y una colonización del bazo más rápida que de otros órganos diana en el ratón (Jiménez de Bagüés *et al.*, 1993; Hort *et al.*, 2003). Por otro lado, la vía IV promueve una colonización

del hígado ligeramente más rápida y con niveles de infección superiores a los obtenidos por la administración IP durante los primeros 10 días (Pardon & Marly., 1976).

Las cepas de *Brucella* pueden diferenciarse en relación a su habilidad de multiplicarse y persistir en ratón, en virulentas, atenuadas y no virulentas. El recuento de bacterias en bazo proporciona perfiles de colonización altamente reproducibles que permiten evaluar la virulencia de las distintas cepas. Así, en el curso de la infección murina por cepas virulentas, pueden diferenciarse cuatro etapas: i) el inicio de la infección que se corresponde con la colonización del bazo durante los primeros 2-3 días p.i.; ii) la fase aguda que abarca desde el tercer día hasta que se alcanzan los recuentos esplénicos máximos (2-3 semanas p.i.); iii) la fase crónica constante en la que se produce una meseta en los recuentos esplénicos (hasta las semanas 8-11 p.i.) y iv) la fase crónica de declive en la que los recuentos esplénicos comienzan a disminuir y que puede extenderse más allá de las 36 semanas p.i. (Plommet & Plommet., 1988). Este patrón es sensible a pequeñas variaciones de virulencia y permite evaluar la atenuación de mutantes frente a cepas parentales virulentas (Grilló *et al.*, 2012). Las cepas no virulentas de *Brucella* no son capaces de multiplicarse o persistir en el ratón, independientemente de la dosis de infección. En cambio, las cepas atenuadas pueden multiplicarse y alcanzar niveles de recuentos, en las etapas tempranas de la infección, similares a los de la cepa parental virulenta, pero persisten durante un menor periodo de tiempo, incluso al ser inoculadas en dosis más elevadas (por ejemplo de  $10^8$  UFC/ratón) (Grilló *et al.*, 2012). Al mismo tiempo que la bacteria se multiplica en el bazo, se produce una esplenomegalia que se caracteriza por un aumento del peso del órgano y es consecuencia de la inflamación. Esta depende de la dosis y la virulencia de la cepa de *Brucella* y también del estado inmunológico del ratón (Bosserey *et al.*, 1982).

Respecto a la influencia del sexo del animal en el curso de la brucelosis, y más concretamente en la colonización esplénica, no parece haber diferencias relevantes entre machos y hembras. Así, en estudios comparativos con *B. ovis* se observó que, la evolución de los recuentos de UFC/bazo eran independientes del sexo del ratón (Jiménez de Bagüés *et al.*, 1993). El empleo de ratones de un sexo u otro cobra relevancia en los estudios de patogenicidad (evaluación de las alteraciones producidas por *Brucella* en el aparato reproductor). Por ejemplo, se ha comprobado en ratones gestantes la colonización de las células de placenta por *B. abortus* y la existencia de abortos, aunque los ratones son más resistentes a esto último que los hospedadores naturales (Tobias *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2005). También existen modelos que emplean ratones macho para el estudio de la orquitis y epididimitis causadas por *B. ovis* (Silva *et al.*, 2011 b). Sin embargo, los animales empleados con mayor frecuencia en estudios de virulencia de cepas de *Brucella* son ratones hembras BALB/c de 4-9 semanas de edad (Grilló *et al.*, 2012).

Un aspecto importante tanto en la evaluación de la virulencia de cepas de *Brucella*, como en la evaluación de vacunas atenuadas, es la dosis de infección. *Brucella* desarrolla un perfil de infección inconsistente, con amplias desviaciones en los recuentos esplénicos, cuando se administran dosis infectivas bajas ( $< 10^3$  UFC/ratón), lo cual dificulta la interpretación de resultados (Grilló *et al.*, 2012). La dosis óptima se define como el número mínimo de bacterias necesarias para infectar el bazo en niveles de manera significativa y consistente, en todos los ratones (Plommet & Bosserey., 1984).

Otras variables de la evaluación en ratón de la eficacia (protección) de vacunas atenuadas de *Brucella* son los intervalos post-vacunación empleados para la infección experimental. Diferentes estudios han señalado que transcurridos treinta días desde la vacunación, se considera establecida la inmunidad en el ratón (Zhan *et al.*, 1991; Jiménez de Bagüés *et al.*, 1993). Este intervalo puede ser corto respecto a la persistencia de algunas vacunas atenuadas de referencia. Por ejemplo, la vacuna atenuada *B. melitensis* Rev1, puede persistir hasta 15 semanas, permaneciendo durante más tiempo que las cepas virulentas empleadas para realizar la infección experimental (Grilló *et al.*, 2000). Para la evaluación de eficacia de vacunas frente a *Brucella*, es requisito poder diferenciar, en intervalos concretos, las cepas vacunales de la cepa empleada en la infección experimental (OIE., 2008). Para este fin se han empleado marcadores como la sensibilidad a eritritol (*B. abortus* S19), la resistencia a estreptomycin (*B. melitensis* Rev1), o la sensibilidad a ácido nalidíxico (*B. abortus* 2308) (Grilló *et al.*, 2012). Otra estrategia es prolongar el intervalo de tiempo entre la vacunación y la infección experimental hasta el tiempo en el que se ha producido la eliminación de la vacuna del bazo (Plommet & Plommet., 1988). En cuanto al momento de determinar la eficacia de vacunación, se considera adecuado un intervalo 2-3 semanas desde la

infección experimental, en el cual existen las mayores diferencias entre el grupo control de referencia y el control no vacunado (Jiménez de Bagüés *et al.*, 1993; Grilló *et al.*, 2012) y coincide con la fase aguda de la infección experimental en ratón donde se alcanzan los recuentos esplénicos máximos.

Por último, el modelo murino presenta similitudes, pero también diferencias respecto a la infección de *Brucella* en el hospedador natural. Solo un número limitado de vacunas atenuadas son eficaces frente a la infección natural en rumiantes, lo cual contrasta con el elevado número de vacunas eficaces en ratón. Sin embargo, el hecho contrario no se ha observado y las vacunas que presentan un bajo nivel de protección en ratón, no presentan eficacia alguna en el hospedador natural (Verger *et al.*, 1995; Barrio *et al.*, 2009).

## 6. *B. ovis* y epididimitis contagiosa del carnero

### 6.1. Características de la enfermedad

*B. ovis* es una especie naturalmente rugosa y virulenta en su hospedador natural; ovejas y carneros. Aunque se ha comprobado que el ganado bovino, las cabras y los ciervos son susceptibles a *B. ovis* en experimentos de transmisión artificial, solo se han descrito casos naturales en ciervos criados en contacto directo con carneros infectados (Ridler *et al.*, 2006, 2012).

Este microorganismo fue aislado por primera vez a finales de los años 50 del siglo XX en Australia y Nueva Zelanda (Buddle., 1956) a partir de carneros con epididimitis y de un caso de aborto en oveja, respectivamente. Hasta la fecha no se conocen casos de infección por *B. ovis* en humanos, por lo que esta especie no se considera zoonótica (Godfroid *et al.*, 2011). *B. ovis* es uno de los agentes etiológicos responsable de causar epididimitis contagiosa en el ganado ovino (Burgess, 1982). Esta tiene una amplia distribución mundial, encontrándose extendida en el continente americano, Europa, Sudáfrica, Australia y Asia, aunque probablemente esté presente en la mayoría de países que crían ganado ovino (OIE, 2015).

La epididimitis contagiosa del carnero ocasionada por *B. ovis* es una enfermedad clínica o subclínica que se caracteriza por lesiones genitales en los carneros que han alcanzado la madurez sexual (Burgess, 1982; Walker *et al.*, 1986). Los síntomas clínicos iniciales (fiebre, alteraciones en la respiración, o inflamación del escroto) son notablemente inespecíficos y generalmente pasan desapercibidos. En etapas posteriores pueden aparecer lesiones palpables, siendo la más común un aumento del tamaño del epidídimo, que puede ser uni o bilateral, junto con orquitis y atrofia testicular (Robles, 2008). No está claro el tiempo que tardan en aparecer las lesiones palpables en la infección natural, si bien, en condiciones experimentales de infección de carneros con *B. ovis* por vía conjuntival, la primera lesión palpable en epidídimos se observa transcurridos 45 días desde la inoculación (Bulgin, 1990). La infección por *B. ovis* produce baja calidad del semen en los carneros, caracterizada por un número bajo de espermatozoides y anomalías morfológicas en estos (Picard-Hagen *et al.*, 2015). En las ovejas se puede observar repetición del celo y abortos ocasionales asociados a placentitis (Blasco., 1990; Grilló *et al.*, 1999; Paolicchi *et al.*, 2013). Respecto a las lesiones microscópicas, estas incluyen infiltrados de macrófagos, linfocitos y células plasmáticas en las vesículas seminales y en el epidídimo (Robles., 2008; Poester *et al.*, 2013). En el caso ocasional de aborto, se ha observado perivasculitis y presencia de neutrófilos en la placenta (Paolicchi *et al.*, 2013).

La transmisión venérea entre ovejas y carneros es la forma más común, aunque también puede darse entre carneros (Blasco, 1990). El macho es el diseminador activo de la infección a través del semen, mientras que las ovejas transmiten la infección de forma pasiva, al excretar *B. ovis* en los flujos vaginales y la leche. Por ello, es posible la transmisión tanto oveja-carnero, como oveja-lactante y las hembras deben considerarse relevantes en la epidemiología de esta infección, siendo también importante su inclusión en las correspondientes intervenciones de control y prevención de la enfermedad (Garin-Bastuji & Blasco., 2013). La presencia de esta enfermedad en un rebaño provoca grandes pérdidas económicas (Carpenter *et al.*, 1987), debido, entre otras causas, al aumento del descarte de carneros infectados, la caída de la fertilidad del rebaño, el aumento de la mortalidad perinatal, el acortamiento del periodo de vida reproductor de los machos y las restricciones en el comercio (Blasco, 1990). Al contrario que en otras especies como *B. suis*, *B. abortus* y *B. melitensis*, la

transmisión de *B. ovis* por vía oral no parece ser relevante (Blasco, 1990), lo que podría estar relacionado con la ausencia de actividad ureasa de *B. ovis*, fruto probablemente de una delección encontrada en el genoma de esta especie y que afecta a los genes *ureG2* y *ureT* (Tsolis *et al.*, 2009). La presencia de estos genes es necesaria para la supervivencia de *B. suis*, *B. abortus* y *B. melitensis* a las condiciones de pH ácido que se encuentra la bacteria durante su paso por el tracto gastrointestinal cuando son ingeridas oralmente (Bandara *et al.*, 2007; Sangari *et al.*, 2007, 2010; Paixão *et al.*, 2009).

Además, en el genoma secuenciado de *B. ovis* se han encontrado numerosos pseudogenes relacionados con otras características metabólicas como incapacidad para utilizar piruvato, aminoácidos o glicerol como fuentes de carbono, mecanismo oxidativo defectuoso de la arabinosa, galactosa, ribosa, xilosa, glucosa y eritritol o fenotipo oxidasa negativo. El genoma de *B. ovis* también contiene una región en el cromosoma II de 26,5 Kb que está ausente al menos en *B. suis*, *B. abortus* y *B. melitensis* (Tsolis *et al.*, 2009). Dicha región (BOPI-1, *B. ovis pathogenicity island*), necesaria para la virulencia de *B. ovis*, posee transposasas, transportadores de tipo ABC y varias proteínas hipotéticas. Todo ello podría estar relacionado con el tropismo de tejido y la marcada preferencia de hospedador de esta especie rugosa (Tsolis *et al.*, 2009).

### 6.2. Diagnóstico

Para realizar el diagnóstico se emplea información procedente de exploraciones clínicas de los carneros, test serológicos y análisis bacteriológicos de los fluidos seminales. La palpación de los genitales de los carneros permite detectar la epididimitis, lo cual puede ser un indicio de esta infección en el rebaño. Sin embargo, este diagnóstico nunca es definitivo debido a que pueden existir carneros que, pese a estar infectados con *B. ovis*, no presentan lesiones clínicas (Poester *et al.*, 2013). Además, existen otros microorganismos que pueden producir epididimitis palpables, entre ellos *Histophilus somni*, *Actinobacillus seminis*, *B. melitensis*, *Pasteurella multocida* y *Yesinia pseudotuberculosis* (Gouletsou., 2015).

*B. ovis* se puede aislar de muestras de leche, semen e hisopados vaginales o prepuciales (Blasco., 1990). En las necropsias de carneros, el órgano predominantemente infectado es el epidídimo, junto con vesículas seminales y los ganglios linfáticos inguinales, y en las ovejas, los ganglios linfáticos supramamarios e ilíacos del útero (Garin-Bastuji & Blasco., 2013). El diagnóstico definitivo es el aislamiento directo del patógeno en muestras biológicas, pero es laborioso y requiere de varios días, por lo que generalmente se recurre a pruebas serológicas (Alton *et al.*, 1998).

Las pruebas inmunológicas más eficaces y utilizadas para detectar *B. ovis* son la de fijación de complemento (FC), la prueba de doble inmunodifusión en gel de agarosa (AGID) y el enzoinmunoanálisis indirecto (I-ELISA) (OIE., 2015). Para las pruebas inmunológicas se recomienda usar como antígeno el extracto salino caliente (HS) de la cepa *B. ovis* REO 198 (OIE., 2015). La caracterización química de los extractos HS de *B. ovis* ha puesto de manifiesto que estos se encuentran enriquecidos en lipopolisacárido rugoso (R-LPS), en proteínas de la ME del grupo 3, y en otros componentes de la ME (Riezu-Boj *et al.*, 1986). Por lo tanto, los HS contienen componentes específicos de la envuelta celular de *B. ovis*, pero también determinantes compartidos con especies de *Brucella* lisas y rugosas (Santos *et al.*, 1984).

Actualmente, la única prueba recomendada por la OIE y la Unión Europea para el comercio internacional es la prueba de FC (Garin-Bastuji & Blasco., 2013). A pesar de ello, y aunque se carece de una estandarización a nivel internacional, diferentes estudios comparativos han comprobado que el I-ELISA tiene una mejor sensibilidad que la AGID o la FC (Gall *et al.*, 2003; Praud *et al.*, 2012; OIE., 2015). Sin embargo, las pruebas de diagnóstico serológico actuales no permiten la diferenciación entre animales vacunados y animales infectados, por lo que el desarrollo de nuevas vacunas asociadas a un test de diagnóstico DIVA es un campo de estudio de gran interés (Blasco *et al.*, 2015).

Los métodos moleculares constituyen otro importante medio de detección e identificación de *Brucella* y en los últimos años han experimentado un desarrollo notable. Existen métodos basados en la detección de *B. ovis* mediante PCR en muestras de semen, en los que se amplifica la secuencia de inserción IS6051 específica del género *Brucella* y que en *B. ovis* presenta un gran número de copias (Manterola *et al.*, 2003). Otros métodos,

también en muestras de orina y semen, detectan secuencias genéticas específicas de *B. ovis*, permitiendo la diferenciación con las infecciones causadas por *B. melitensis* (Xavier *et al.*, 2010 b). Así mismo, algunas técnicas permiten un diagnóstico diferencial de los microorganismos que más frecuentemente se encuentran implicados en la epididimitis del carnero (*B. ovis*, *A. seminis* y *H. somni*), aunque la combinación de cebadores empleados para la PCR solo permite diferenciar a nivel de género en el caso de *Brucella* (Saunders *et al.*, 2007). Posteriormente, se han desarrollado mejoras encaminadas a conseguir discriminar a nivel de especie la presencia de *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni*, mediante el diseño de nuevas combinaciones en los cebadores empleados (Moustacas *et al.*, 2013).

Por último, los ensayos de PCR para la tipificación de aislados de *Brucella* se están empezando a utilizar de forma sistemática en muchos laboratorios de diagnóstico. En concreto, se han desarrollado ensayos de PCR múltiple fáciles y eficaces que consiguen diferenciar un elevado número especies de *Brucella* y también las vacunas *B. melitensis* Rev1, *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 y *B. abortus* A19 (García-Yoldi *et al.*, 2006; López-Goñi *et al.*, 2008; Nan *et al.*, 2016). Así como el Bruce-ladder que permite una identificación de la mayoría de especies de *Brucella*, incluida *B. ovis* e incluso hasta el nivel de biovar (López-Goñi *et al.*, 2011).

### 6.3. Control de la enfermedad

Aunque no existen campañas nivel nacional de erradicación de la brucelosis causada por *B. ovis*, existe un consenso generalizado acerca del papel esencial de la vacunación en el control de la brucelosis en el ganado, incluida la producida por *B. ovis* (Moriyón *et al.*, 2004). Sin embargo, el abordaje del problema está sujeto a particularidades de los diferentes países y áreas afectadas y que están relacionadas con las características de los rebaños y factores económicos. Los programas de erradicación basados en el diagnóstico serológico y sacrificio de los animales infectados se recomiendan únicamente cuando la prevalencia en la unidad epidemiológica es muy baja ( $\leq 1-4\%$ ). Cuando la prevalencia es baja-moderada (5-10%) se aconseja un programa combinado de medidas para el control a medio-corto plazo: la vacunación de los individuos más jóvenes y el sacrificio de adultos seropositivos. Para unidades epidemiológicas con una prevalencia elevada ( $\geq 10\%$ ) la vacunación representa la única medida eficaz (Ridler & West., 2011; Blasco *et al.*, 2015). Sin embargo, en la actualidad no existe una vacuna específica frente a la infección por *B. ovis* en carneros.

Los requisitos de la vacuna ideal para la prevención de cualquier tipo de brucelosis en ganado, administrada tanto en machos como en hembras, son: i) la inocuidad para el ganado y eficacia en una única dosis; ii) la no estimulación de la producción de anticuerpos que puedan interferir en el serodiagnóstico; iii) la imposibilidad de transmisión al hombre o a otros animales, lo cual incluye su ausencia en productos derivados para el consumo (leche, carne, etc); iv) la estabilidad *in vitro* e *in vivo*; v) la facilidad de cultivo a gran escala y vi) la posesión de marcadores que permitan su fácil diferenciación en condiciones de campo (Cosivi & Corbel., 1998). Sin embargo, las vacunas actuales frente a la brucelosis en ganado (*B. melitensis* Rev1, *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 y algunas otras menos empleadas) no cumplen todos estos requisitos, especialmente los relacionados con la inocuidad, la estabilidad y la diferenciación serodiagnóstica (Blasco *et al.*, 2015).

La vacuna viva atenuada Rev1 de *B. melitensis*, empleada en la prevención de la brucelosis causada por *B. melitensis* en ganado ovino y caprino, confiere protección heteróloga frente a *B. ovis* (Fensterbank *et al.*, 1982; Blasco *et al.*, 1987) y es considerada la mejor vacuna disponible para la profilaxis de la brucelosis causada por *B. ovis* (Blasco., 1997; Marín *et al.*, 1990). *B. melitensis* Rev1 es una cepa atenuada, resistente a estreptomycin, lo que se ha relacionado con la presencia de un defecto en la proteína ribosomal S12, y que presenta otra serie de diferencias a nivel genético con cepas virulentas de *B. melitensis* (Cloeckaert *et al.*, 2002 a; Eschenbrenner *et al.*, 2002; Mancilla *et al.*, 2013). En otras bacterias como por ejemplo *Salmonella*, la mutación en la proteína S12 provoca resistencia a estreptomycin, una disminución de la tasa de síntesis de proteínas y del crecimiento bacteriano y conduce a una atenuación de la virulencia (Maisnier-Patin *et al.*, 2002). Dicha mutación en *B. melitensis* Rev1 parece estar igualmente relacionada con su atenuación y con el fenómeno de disociación del S-LPS hacia mutantes R-LPS espontáneos que puede ocurrir bajo determinadas condiciones (Mancilla *et al.*, 2013). Se ha demostrado que los mutantes rugosos de *B. melitensis* Rev1 son eliminados rápidamente de los

bazos de ratones vacunados e inducen una menor inmunogenicidad, lo cual provoca una variabilidad en la eficacia de esta vacuna (Blasco & Molina-Flores., 2011; Grilló *et al.*, 2000). Pese a la protección conferida por *B. melitensis* Rev1 frente a infecciones ocasionadas por *B. ovis*, otras de las limitaciones/inconvenientes que hacen que no sea una vacuna totalmente idónea son: i) el elevado riesgo de aborto cuando se administra a hembras gestantes, lo cual puede ser necesario en campañas de vacunación masiva en contextos de elevada prevalencia (Schurig *et al.*, 2002; Blasco *et al.*, 2015); ii) cierto riesgo de infección para el hombre, agravado por la resistencia a estreptomycin que es frecuentemente empleada en combinación con tetraciclina en el tratamiento de la brucelosis humana (Blasco & Díaz., 1993; Skalsky *et al.*, 2008); iii) interferencia en el diagnóstico de animales infectados por cepas lisas del género *Brucella* debido a que en los animales vacunados induce la producción de anticuerpos indistinguibles de los generados por la infección activa (Blasco., 1997). Debido a esta interferencia, se prohíbe el uso de *B. melitensis* Rev1 en países y regiones libres de infecciones por *B. melitensis* (Cassataro *et al.*, 2005; Blasco *et al.*, 2015).

Las vacunas vivas atenuadas (VVA) han demostrado un mayor poder protector que las vacunas inactivadas y subcelulares, frente a las infecciones causadas por otras especies de *Brucella* como *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* (Schurig *et al.*, 2002; Ficht *et al.*, 2009; Godfroid *et al.*, 2011). Esto es principalmente debido a su mayor poder de estimulación de una respuesta inmune protectora (Godfroid *et al.*, 2011; Ávila-Calderón *et al.*, 2013; Pandey *et al.*, 2016). Sin embargo, en el contexto del desarrollo de vacunas que sean eficaces frente a *B. ovis*, se han estudiado también diversas vacunas de subcelulares entre las que se encuentran: el HS obtenido a partir de la cepa *B. ovis* REO 198 (Blasco *et al.*, 1993), proteínas recombinantes como Omp31 de *B. melitensis* (Cassataro *et al.*, 2005) o la quimera BLSOmp31 (BLS; *Brucella Lumacine Synthase*) (Cassataro *et al.*, 2007 a; Estein *et al.*, 2009), una vacuna de ADN que codifica dicha quimera (Cassataro *et al.*, 2007 b) u otras basadas en la administración de nano/micropartículas como sistema de liberación de antígenos de la ME de *B. ovis* (Da Costa Martins *et al.*, 2010). Si bien estas vacunas subcelulares confieren protección frente a la infección por *B. ovis*, requieren de dosis de recuerdo y normalmente, del empleo de formulaciones que estimulen una respuesta Th1 adecuada (Da Costa Martins *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2012), con el correspondiente incremento de los costes y dificultades de aplicación de forma extensiva en el ganado ovino. Sin embargo, las vacunas subcelulares constituyen una alternativa completamente segura en contraposición a las VVA, las cuales pueden desarrollar una virulencia residual. Por ello, un aspecto importante del desarrollo de VVA es garantizar la estabilidad del fenotipo de la cepa vacunal (Grilló *et al.*, 2000).

Por otro lado, se ha demostrado que en el ganado las especies homólogas de *Brucella* confieren una protección superior a las heterólogas (Adams., 1990). Se ha observado que la vacunación de carneros con las cepas *B. abortus* S19 y *B. abortus* RB51 no protege a éstos frente a una infección experimental con *B. ovis* (Jiménez de Bagüés *et al.*, 1995; Moriyón *et al.*, 2004), *B. abortus* RB51 no evita la infección por *B. melitensis* en ovejas (el Idrissi *et al.*, 2001) y la eficacia de la vacuna *B. melitensis* Rev1 en la infección por *B. abortus* en bóvidos es limitada (García-Carrillo., 1980). Respecto a la protección homóloga conferida por VVA de *B. ovis*, no existen demasiados estudios. En concreto, se ha mostrado que la inactivación de genes de un transportador ABC situado en la isla BOPI-1 de *B. ovis* conduce a la atenuación de la bacteria en modelo murino y carneros (Silva *et al.*, 2011 a, 2013 b). Si bien este mutante confiere protección frente a la infección experimental frente a *B. ovis* en ambos modelos (Silva *et al.*, 2015 a, 2015 b), muestra una baja persistencia en ratón y se propone su administración encapsulada en los carneros. También se han analizado en modelo murino mutantes de *B. ovis* portadores de inactivaciones en genes de las proteínas Omp25d y Omp22 (Caro-Hernández *et al.*, 2007; Sancho *et al.*, 2014) y del núcleo del R-LPS (Soler-Lloréns *et al.*, 2014). Todos ellos protegen frente a la infección experimental por *B. ovis*, siendo la capacidad protectora similar a la de la vacuna de referencia *B. melitensis* Rev1 (Soler-Lloréns *et al.*, 2014; Sancho *et al.*, 2014). Sin embargo, estas vacunas experimentales no permiten la diferenciación serológica entre animales vacunados e infectados por *B. ovis*.

En base a los aspectos previamente expuestos, el desarrollo de vacunas específicas frente a *B. ovis*, como alternativa a *B. melitensis* Rev1, presenta gran interés ya que una vacuna homóloga aportaría todos los componentes inmunogénicos que pueden estar involucrados en la protección (Schurig *et al.*, 2002; Ko & Splitter., 2003; Pandey *et al.*, 2016). Para el desarrollo de este tipo de vacunas, un aspecto fundamental es el

estudio de los factores de virulencia de *B. ovis* que hasta el momento han sido poco analizados. Además, teniendo en cuenta el complejo contexto en el que tiene lugar la vacunación, es muy importante tener en cuenta su efecto, como hemos descrito, en el diagnóstico de la enfermedad. Así, el empleo de una vacuna basada en *B. ovis*, carente cadenas O en el LPS, principal antígeno empleado en el diagnóstico de la brucelosis causada por especies lisas de *Brucella* (Nicoletti, 1990; Blasco, 1997), evitaría la interferencia con el diagnóstico de este tipo de infecciones (Moriyón *et al.*, 2004). Además, una vacuna homóloga de *B. ovis* carente de un antígeno de interés para un diagnóstico serológico DIVA aportaría una ventaja adicional en las campañas de control y erradicación de la enfermedad.



# Objetivos



*Brucella ovis* produce epididimitis contagiosa en ganado ovino, una enfermedad infecciosa no zoonótica pero que ocasiona considerables pérdidas económicas en el sector ganadero, debidas fundamentalmente al descenso en la fertilidad de los animales. *B. ovis* posee lipopolisacárido rugoso (R-LPS), caracterizado por la ausencia de cadenas polisacáridicas O, mientras que las cepas virulentas de las especies zoonóticas del género *Brucella* más relevantes, como *B. melitensis*, *B. abortus* o *B. suis*, tienen LPS liso (S-LPS) con cadenas O. Esta característica supone un primer rasgo diferencial entre las cepas lisas de *Brucella* y *B. ovis*, ya que las cadenas O son esenciales para la virulencia de las primeras, mientras que *B. ovis* es virulenta tanto en su hospedador preferente como en modelos animales. Otro rasgo particular de *B. ovis*, que también viene determinado por la ausencia de cadenas O, es que los demás componentes de la ME se encuentran más expuestos en la superficie de la bacteria y más accesibles a la interacción con las células del hospedador, por lo que podrían ser relevantes en su virulencia.

En la actualidad no existe ninguna vacuna comercializada específica para la prevención de las infecciones causadas por *B. ovis*, siendo la vacuna atenuada heteróloga *B. melitensis* Rev1 la considerada más eficaz. Sin embargo, esta vacuna, que se ha diseñado para la prevención de la brucelosis ovina y caprina causada por *B. melitensis*, presenta varios inconvenientes entre los que se encuentran la capacidad de producir infecciones en humanos y abortos en animales o poseer resistencia a estreptomocina. Además, al ser una cepa lisa, induce una importante respuesta de anticuerpos frente a las cadenas O del S-LPS, que son los detectados mayoritariamente en las pruebas de diagnóstico serológico de las infecciones ocasionadas por cepas lisas de *Brucella*. Debido a esto, la vacunación con *B. melitensis* Rev1 dificulta la diferenciación serológica entre animales vacunados y animales infectados por cepas lisas de *Brucella*, por lo que está prohibida en países o regiones en los que las infecciones causadas por *B. melitensis* se consideran erradicadas. Por todo ello, el desarrollo de una cepa atenuada de *B. ovis* que pueda ser utilizada como vacuna presenta gran interés, ya que, por una parte, aportaría componentes inmunogénicos similares a los de la cepa infecciosa y, por otra parte, evitaría la interferencia diagnóstica con infecciones ocasionadas por cepas lisas de *Brucella*. La eliminación de un gen que codifique una proteína inmunodominante en el curso de una infección activa (como es la proteína Omp31) proporcionaría una ventaja adicional a esta vacuna homóloga, ya que facilitaría, además, un diagnóstico serológico diferencial entre animales vacunados y animales infectados por *B. ovis*.

Considerando que el desarrollo de una vacuna atenuada específica y marcada serológicamente presenta gran interés para la prevención de infecciones ocasionadas por *B. ovis*, que para el desarrollo de vacunas atenuadas es importante conocer los factores de virulencia del microorganismo, que los componentes de la superficie de *B. ovis* pueden tener una función relevante en la interacción con el hospedador y que no se ha analizado el papel en la virulencia de *B. ovis* de algunas OMPs relacionadas con la virulencia de cepas lisas de *Brucella*, los objetivos planteados para este trabajo han sido los siguientes:

- 1.- Construcción, caracterización y evaluación de la virulencia de los mutantes  $\Delta bepC$  y  $\Delta ugpB$  de *B. ovis* PA.
- 2.- Construcción, caracterización y evaluación preliminar de la virulencia de un panel de mutantes múltiples en genes relacionados con la membrana externa de *B. ovis* entre los que se incluye *omp31*.
- 3.- Estudio de las propiedades de la membrana externa y de la virulencia en modelos celulares y en ratón de los mutantes seleccionados tras la caracterización preliminar.
- 4.- Análisis en modelo murino del interés como vacuna del mutante atenuado más relevante.



# **Materiales y Métodos**



## 1. Microorganismos, medios de cultivo y condiciones de crecimiento

### 1.1. Género *Brucella*

Las cepas del género *Brucella* empleadas en el presente trabajo y que no fueron obtenidas en el transcurso del mismo se recogen en la **Tabla I**. La cepa parental virulenta *B. ovis* PA, empleada tanto en la obtención de mutantes como en el modelo de infección *in vitro* e *in vivo*, y la cepa vacunal atenuada *B. melitensis* Rev 1, proceden de la colección de Cultivos de *Brucella* del Institut National de la Recherche Agronomique de Nouzilly (BCCN), Francia. El resto de cepas de *B. ovis* proceden de estudios anteriores o se han obtenido en el transcurso de este trabajo (**Apartado 4**).

Los medios empleados para el cultivo y mantenimiento de las cepas de *Brucella* fueron agar tripticaseína de soja (TSA, Pronadisa) o el caldo tripticaseína de soja (TSB, Pronadisa). Ambos medios se suplementaron con extracto de levadura al 0,3 % (p/v) (YE, *yeast extract*, Pronadisa) y suero de caballo al 5% (v/v) (HS, *horse serum*, Gibco-BRL), descomplementado por calentamiento durante 1 hora a 56 ° C (medios TSA-YE-HS o TSB-YE-HS, respectivamente).

En función del perfil de resistencia presentado por las diferentes cepas de *Brucella* empleadas, estos medios fueron suplementados con kanamicina (Kan, Sigma-Aldrich), estreptomina (Estrep, Sigma-Aldrich) o sacarosa (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 50 µg/ml, 2,5 U.I./ml o al 5% (p/v), respectivamente.

Las cepas de *Brucella* se cultivaron a 37° C, en atmósfera húmeda y con 5% de CO<sub>2</sub>. El crecimiento se controló midiendo la densidad óptica de los cultivos a una longitud de onda de 600 nm (DO<sub>600</sub>), empleando para ello el espectrofotómetro CD8000 *Biowave, Cell Density Meter* (WPA, Biochrom).

Todas las cepas empleadas en el presente estudio se almacenaron a -80°C en crioviales con dimetilsulfóxido (DMSO) al 7% (v/v), como agente criopreservador, con la finalidad de mantener su viabilidad durante largos periodos de tiempo.

**Tabla I.** Cepas del género *Brucella* empleadas en este trabajo.

Especies y cepas	Abreviatura	Tipo de LPS y otras características relevantes para este trabajo	Origen <sup>a</sup> o referencia
<b><i>B. melitensis</i></b>			
<i>B. melitensis</i> Rev1	Rev1	S-LPS. Cepa vacunal. Estrep <sup>r</sup>	BCCN V4a
<b><i>B. ovis</i></b>			
<i>B. ovis</i> PA	PA	R-LPS. Cepa parental virulenta	BCCN 76-250
<i>B. ovis</i> -pNV10OVL02	omp10-M	PA con <i>omp10</i> inactivado	Sidhu-Muñoz <i>et al.</i> , 2016
<i>B. ovis</i> -pNV19OVL02	omp19-M	PA con <i>omp19</i> inactivado	Sidhu-Muñoz <i>et al.</i> , 2016
<i>B. ovis</i> -pNV31OVL02	omp31-M	PA con <i>omp31</i> inactivado	Sancho, 2014
<i>B. ovis</i> -pNVvirB2OVL04	virB2-M	PA con <i>virB2</i> inactivado	Martín-Martín <i>et al.</i> , 2012

<sup>a</sup>BCCN, *Brucella Collection of Nouzilly*, Francia.

### 1.2. *Escherichia coli*.

En los trabajos de clonación molecular para el estudio de la región promotora del gen *bepC* (**Apartado 3**) se utilizó la cepa TG1 de *E. coli* y para la obtención de cepas mutantes de *B. ovis* PA se utilizaron las cepas JM109 y CC118 $\lambda$ pir de *E. coli* (**Apartado 4**). Las características más relevantes de todas ellas se recogen en la **Tabla II**.

Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio Luria Bertani (LB), sólido o líquido, compuesto por YE al 0,5%, (p/v) (Pronadisa), triptona al 1% (p/v) (Pronadisa) y cloruro sódico al 0,5 % (p/v) (Panreac). El medio sólido LB se suplementó con agar bacteriológico al 1,5 % (p/v) (Pronadisa). Para el proceso de transformación

de la cepa TG1 (**Apartado 2.9.1**) se empleó el medio líquido rico en nutrientes SOC (triptona 2%, YE 0,5 %, NaCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM y glucosa 20 mM).

Cuando fue necesario seleccionar clones bacterianos en función de su perfil de resistencia a antibióticos (**Apartado 4**), el medio de cultivo se suplementó con Kan y/o ampicilina (Amp, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 50 µg/ml.

Para diferenciar entre clones con o sin actividad β-galactosidasa, el medio LB sólido se suplementó 15 minutos antes de la siembra con X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) e IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) (ambos de Promega) según instrucciones del fabricante.

Las cepas de *E. coli* se almacenaron a -80° C conservadas en viales con DMSO al 7 % (v/v).

**Tabla II.** Cepas de la especie *E. coli* empleadas en este trabajo.

Cepas	Genotipo relevante	Origen o referencia
<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F' traD36, proAB, laq<sup>l</sup>ZΔM15]</i>	Promega Corp.
<i>E. coli</i> CC118 λ <i>pir</i>	<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> TG1	<i>F' [traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15]supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5, (r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>-</sup>)</i>	Olliver <i>et al.</i> , 2005

## 2. Técnicas generales de manipulación de ácidos nucleicos

### 2.1. Vectores de clonación

#### *pGEM<sup>®</sup>-T Easy*

Es un vector bacteriano linealizado de 3017 pb (**Figura 7A**) comercializado por Progenia Corp. Procede del vector pGEM<sup>®</sup>-5Zf (+) digerido con *EcoRV* en la posición 51 y al que se le ha añadido un residuo de timina en cada extremo 3' generado. La presencia de estas bases favorece la clonación de productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) evitando la recircularización del vector y generando extremos compatibles con los productos de amplificación de la mayoría de las ADN polimerasa que añaden una desoxiadenosina en los extremos 3' de dichos productos.

pGEM<sup>®</sup>-T Easy es un vector de alto número de copias que posee 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<sup>r</sup>), el origen de replicación del fago f1, los promotores y sitios de inicio de la transcripción de las RNA polimerasas T7 y SP6, que permiten la síntesis de ARN *in vitro* y un sitio de clonación múltiple insertado en la fase de lectura abierta del gen *lacZ*. Este gen codifica el péptido α de la enzima β-galactosidasa y es inducible por IPTG. Esta enzima transforma el sustrato sintético X-Gal en un producto de color azul, por lo que es posible diferenciar los clones que han incorporado el vector recombinante de los que han incorporado el vector recircularizado sin inserto. La inserción del fragmento de PCR dentro del sitio de clonación múltiple interrumpe la secuencia codificante de *lacZ* inactivándolo y las colonias poseerán un color blanco en presencia del sustrato X-Gal, frente a aquellas que portan el plásmido sin inserto que poseen un color azul (selección blanco-azul).

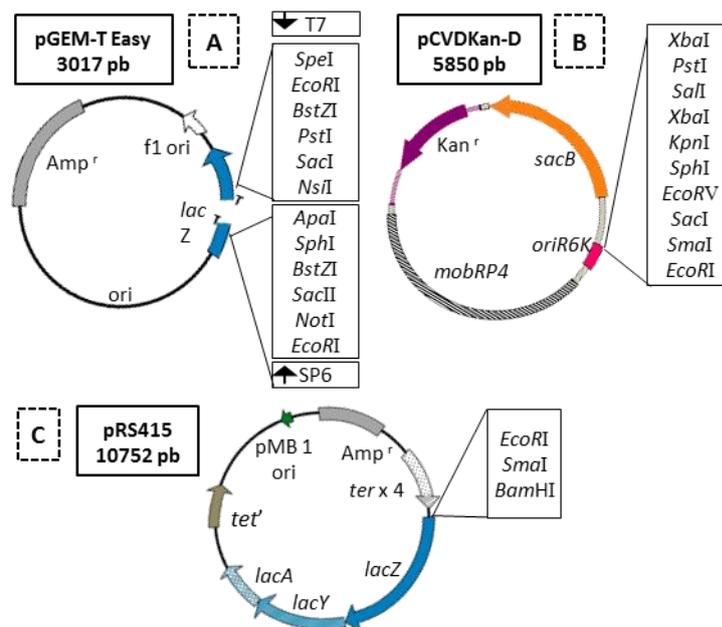
#### *pCVDKan-D*

El plásmido pCVDKan-D (**Figura 7B**) posee un tamaño de 5850 pb y procede del plásmido pCVD442 (Donnenberg & Kaper., 1991), el cual porta en su esqueleto un gen de resistencia a Amp y el gen *sacB* de *Bacillus subtilis* proveniente a su vez del plásmido pUM21 (Ried & Collmer., 1987). El gen *sacB* confiere

sensibilidad a la sacarosa (Sac) ya que codifica una 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). El vector pCVDKan-D posee en orientación directa a *sacB*, un gen que le confiere resistencia a Kanamicina (Kan<sup>r</sup>). Dicho gen procede del plásmido pUC4K y sustituye al gen de resistencia a Amp de pCVD442 (Martín-Martín *et al.*, 2012). Además, pCVDKan-D porta el origen de transferencia *mobRP4* para procesos de conjugación y el de replicación *ori6RK*, procedentes ambos del plásmido pCVD442. A la hora de replicarse, pCVDKan-D requiere una cepa *λpir*, como lo es *E. coli* CC118 (Herrero *et al.*, 1990), que aporte la proteína  $\pi$  (proteína iniciadora de la replicación) codificada por el gen *pir*.

### pRS415

Este plásmido (**Figura 7C**) posee el origen de replicación pMB1, el gen *bla* (Amp<sup>r</sup>) y la porción distal de *tet* (*tet'*), inductor de la transcripción. Dichos elementos provienen del plásmido pBBR322. El plásmido pRS415 está diseñado especialmente para el estudio de la fuerza de promotores (Simons *et al.*, 1987) debido a los elementos que posee situados entre el gen *bla* y *tet'*, los cuales son: cuatro copias en tándem del terminador de la transcripción T1, una zona con sitios únicos de restricción para la inserción de regiones promotoras objeto de estudio, un fragmento del gen *lacZ*, seguido del gen *lacA*, *lacY* y el terminador de transcripción del operon *lac*. El gen *lacZ* presente en pRS415 carece de región promotora, pero preserva el sitio de unión al ribosoma.



**Figura 7.** Esquema de los vectores de clonación pGEM T-Easy, pCVDKan-D y pRS415.

## 2.2. Digestiones enzimáticas y ligaciones

La digestión de ADN con endonucleasas de restricción se empleó de forma rutinaria para la caracterización física de los fragmentos de ADN, así como para la construcción de moléculas recombinantes, y se realizó siguiendo las instrucciones de temperatura y concentración de sales óptimas suministradas por los proveedores (Roche y Promega Corp.).

La ligación de moléculas de ADN se realizó con 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.

### 2.3. Oligonucleótidos y reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR)

Esta técnica permite la amplificación exponencial de ácidos nucleicos (Mullis *et al.*, 1986) y se empleó en el presente trabajo tanto para la amplificación de ADN cromosómico, como plasmídico. Para la obtención de productos de ADN de alta fidelidad se llevaron a cabo reacciones que contenían 10-50 ng de ADN plasmídico o 100 ng para el ADN cromosómico, 1 µl de una concentración 100 µM de cada uno de los oligonucleótidos empleados, 1,75 µl de una mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 25 mM (VWR) y 1 µl de ADN polimerasa AccuPOL de *Thermophilic Rhodohermus* (*AccuPol DNA Polymerase*, 2,5U/ µl, VWR) en un volumen final de 50 µl. Cuando el fin del producto de PCR fue la clonación en los plásmidos empleados en la obtención de cepas mutantes de *B. ovis* PA o su secuenciación, se empleó el *kit Expand Long Template PCR System* (Roche), conteniendo cada reacción 1 µl de una concentración 100 µM de cada uno de los oligonucleótidos empleados, 1,75 µl de una mezcla 10 mM de los cuatro dNTPs y 0,75 µl de una mezcla de ADN polimerasas Taq y Tgo (5 U/µl, Roche), en un volumen final de 50µl.

Cuando no fue necesario la obtención de productos de PCR de alta fidelidad, se empleó el *kit Red Taq DNA Polymerase Master Mix* (VWR) el cual proporciona una mezcla de dNTPs, MgCl<sub>2</sub> y ADN polimerasa Taq en unas concentraciones óptimas para la amplificación del ADN. Además contiene dos colorantes y un agente densificante que permiten el análisis directo de las reacciones de PCR en geles de agarosa.

Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador My Cycler™ (BioRad). El tiempo de amplificación varió en función del tamaño del fragmento a amplificar (aproximadamente 1 minuto por cada 1000 pares de bases). Las condiciones generales de PCR utilizadas fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial (5 minutos a 94 °C), seguido de 30 ciclos de i) desnaturalización, 1 minuto a 94 °C; ii) anillamiento de cebadores, 1 minuto a 58 °C; iii) extensión, entre 1-2 minutos a 72°C y para finalizar, un ciclo de extensión final de 15 minutos a 72 °C. En las **Tablas III-IV** se recogen los cebadores empleados a lo largo de este trabajo.

**Tabla III.** Oligonucleótidos empleados en la obtención de cepas mutantes de *B. ovis* PA y en la construcción de fusiones *lacZ*.

<b>Oligonucleótidos empleados para la construcción de las cepas mutantes de <i>B. ovis</i> PA</b>		
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia nucleotídica 5'-3' <sup>a</sup></b>	<b>Gen diana (posición desde codón de inicio)</b>
BepCMUT-F	TCAGCTTCTGGAAAGCGA	<i>bepC</i> (-660)
BepCOVL-R	GCCAGACAACAATACTGC	<i>bepC</i> (+50)
BepCOVL-F	<b>GCAGTATTGTTGCTCGGCCCTGCGTACACCTGATTG</b>	<i>bepC</i> (+1331)
BepCMUT-R	TTGCAACCGGAGCAACTT	<i>bepC</i> (+1980)
SP41MUT-F	TCCAATGCCCATGTGCTT	<i>ugpB</i> (-673)
SP41OVL-R	GTTTCCTCCTCGGATGTA	<i>ugpB</i> (+32)
SP41OVL-F2	<b>TACATCCGAGGAGGAAACCTCGACAACGCCGTC AAG</b>	<i>ugpB</i> (+1283)
SP41MUT-R2	CAGTGACTTGGGAATTG	<i>ugpB</i> (+1964)
25MUTZ-F	CGACCTTATCCTCCTGAA	<i>omp25</i> (-690)
25OVL-R	GACGATTACGAGAGACTT	<i>omp25</i> (+29)
25OVL-F	<b>AAGTCTCTCGTAATCGTCAAGCTGGACACGCAGGAT</b>	<i>omp25</i> (+557)
25MUTZ-R	CCAGCAAACGTCGCAAA	<i>omp25</i> (+1003)
25cdMUT-F	TGCGTGGTTCAGATTTCG	<i>omp25c</i> (-737)
25cOVL-R	AGCCTTGAGCTTCATGAT	<i>omp25c</i> (+14)
25cOVL-F	<b>ATCATGAAGCTCAAGGCTGCTTACAAGTTCTGATAG</b>	<i>omp25c</i> (+671)
25cMUT-R	AGCCGTAACCAACCTGAC	<i>omp25c</i> (+1115)
<b>Oligonucleótidos empleados para la amplificación de la región promotora del gen <i>bepC</i></b>		
EcoRlpbru-F	CTAGGAATTCGCACCTATGATGTTATTTT	<i>bepC</i> (-378)
BamHlpbru-R	CTAGGGATCCAACGAATCCATCATCGAACC	<i>bepC</i> (-21)

<sup>a</sup> Las secuencias en negrita son complementarias a los cebadores -R OVL

**Tabla IV.** Oligonucleótidos empleados en reacciones de secuenciación, PCR de comprobación y RT-PCR.

Oligonucleótidos adicionales empleados en la verificación de las cepas y plásmidos obtenidos y para RT-PCR		
Nombre	Secuencia nucleotídica 5'-3'	Gen/plásmido diana (posición desde codón de inicio)
Universal-F	GTTTTCCCAGTCACAC	pGEM-T Easy
Universal-R	CAGGAAACAGCTATGAC	pGEM-T Easy
BepC-Sec	CGAGTGTGAAGAGCAGTT	<i>bepC</i> (-177)
BepC-Sec2	GCTGAAACGCAAGTCTTC	<i>bepC</i> (+332)
BepC-Sec3	ACTATCGCAGGGACGGAT	<i>bepC</i> (+839)
BepC-F2	ATAACCAGATCCGCACGA	<i>bepC</i> (-778)
BepC-R2	CGTTTGTGGACATTTGCG	<i>bepC</i> (+2112)
BepC-R4	GCGGCAACATTGTTCTCTG	<i>bepC</i> (+331)
BepC-R5	CGACCAGGCTGAACTGAT	<i>bepC</i> (+1028)
SP41-Sec	TGCCCCATATTATTCAC	<i>ugpB</i> (-195)
SP41-Sec2	TTCCGCAAGCATGGCTAT	<i>ugpB</i> (-388)
SP41-Sec3	GTGATGATGGCAGCGGAA	<i>ugpB</i> (+318)
SP41-Sec4	GAGGCAAAGCAGCTCTTC	<i>ugpB</i> (+800)
SP41-F2	ACCATGGCAAGGCCCTTA	<i>ugpB</i> (-798)
SP41-R2	TGCCGAACGTGTCGAAGA	<i>ugpB</i> (+2097)
SP41-R4	GGCTGCTTGGAACGGAAT	<i>ugpB</i> (+280)
SP41-R6	TTGTACTGGTCGTCGCT	<i>ugpB</i> (+998)
omp25-Sec	GGACCGCGCAAACGTAATT	<i>omp25</i> (-36)
omp25-MAT	GCCGACGCCATCCAGGAA	<i>omp25</i> (+68)
25cd -F2	CGTCTCTGGGCTCGTATT	<i>omp25c</i> (-936)
25c-R2	GATTGCCGCTGGTGATG	<i>omp25c</i> (+1302)
25cMAT	GCTGACGCCGTCATTGAA	<i>omp25c</i> (+16)
Omp10MUT-F	CGCTTGGCGCGCAATATG	<i>omp10</i> (-706)
Omp10-F3	AATGCCCCGATCATAGCC	<i>omp10</i> (+98)
Omp10MUT-R	AGCCAGCGCAAGCGACAT	<i>omp10</i> (+1095)
Omp19MUT-F	AATGTCCTGCCAGTCGAA	<i>omp19</i> (-722)
Omp19-F3	TCCGGCTTGTAATCTC	<i>omp19</i> (+95)
Omp19MUT-R	CAGGAAAAGCTGACGGTT	<i>omp19</i> (+1264)
31MUT-F	AGAATAAAACACATGCCC	<i>omp31</i> (-396)
31MUT-R	GCTGAATGCGGAGATGGT	<i>omp31</i> (+1008)
31-MAT	GCCGACGTGGTTGTTTCT	<i>omp31</i> (+56)
cgsMUTF-F	CGTGTGCTTTTGCTGGAT	<i>cgs</i> (-999)
cgsMUT-R	CACGATCAGAAGATTGCC	<i>cgs</i> (+9513)
cgs-F4	GTA AAAGTGGTTGCGGGT	<i>cgs</i> (+8470)
IF1-F Real	CTCGAATTTCCGGGTGT	<i>IF-1</i> (+106)
IF1-R3 Real	TTGGTCAGGTCATAAGG	<i>IF-1</i> (+243)

#### 2.4. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) es una variante de la PCR convencional que permite la amplificación de ARN mediante la modificación de la técnica consistente en la inclusión de una etapa previa de retrotranscripción del ARN a ADN complementario (ADNc), catalizada por una transcriptasa inversa. Esta técnica se llevó a cabo para verificar la transcripción de los genes *bepC* (BOV\_0938) y *ugpB* (BOV\_A0617) de *B. ovis* PA. En primer lugar se realizó la extracción del ARN total empleando el kit *RNAeasy Midi* (Qiagen), a partir de 1 ml de suspensión bacteriana ajustada a una DO<sub>600</sub> 13 en agua (Martín-Martín *et al.*, 2009). Para la síntesis del ADN complementario (ADNc) se empleó el *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche), realizándose dos reacciones en paralelo (con y sin retrotranscriptasa) que contenían 1 µg de ARN, previamente tratado con *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega corp.) y hexámeros aleatorios. Todos los elementos se emplearon en las concentraciones indicadas por el proveedor. A continuación, se llevó a cabo la amplificación del transcrito de los genes de interés mediante PCR convencional (**Apartado 2.3.**) con los

cebadores BepC-Sec3 + BepC-R5 y SP41-Sec4 + SP41-R6, para los genes *bepC* y *ugpB*, respectivamente. El transcrito del gen *if-1* (BOV\_0267) que se expresa constitutivamente, fue utilizado como control de transcripción (Eskra *et al.*, 2001) y se amplificó con los cebadores IF1-F Real + IF1-R3 Real.

## 2.5. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

La técnica fue utilizada en el análisis cualitativo y semicuantitativo de moléculas de ADN obtenidas, bien por digestión enzimática de plásmidos con endonucleasas de restricción o mediante PCR. Los geles se prepararon al 0,8% (p/v) o al 2% (p/v) de agarosa (*Agarose D-1 Low EEO-GQT*, Pronadisa) en tampón TAE (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA-Na<sup>2+</sup> 1 mM) y contenían bromuro de etidio (1 µg/ml). Para cargar las muestras 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<sup>2+</sup> 67 mM]. El voltaje aplicado en las electroforesis fue de 100-110 V. Para la detección del ADN tras su separación electroforética se irradió el gel con luz ultravioleta de onda corta (~310 nm) en el transiluminador U.V. Gel Doc 2000 (Bio Rad). Los fragmentos se identificaron mediante el empleo de los marcadores de peso molecular *DNA Molecular Weight Marker VI* (Roche) y *ExcACTgene 1 kb DNA ladder* (Fisher).

## 2.6. Purificación de fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa

Para recuperar fragmentos de ADN se empleó el kit *Wizard® SV Gel* (Promega Corp.), siguiendo el procedimiento descrito por la casa comercial. Este método permite la extracción de fragmentos de 100 pb a 10 kb de la matriz de agarosa, gracias a la presencia de altas concentraciones de sales (isotiocianato de guanidina) que generan un entorno hidrofóbico, favoreciendo la unión reversible y específica del ADN a la resina de sílice.

## 2.7. Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

Para la extracción de ADN plasmídico de *E. coli* con alto grado de pureza, se empleó el kit *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Cuando fue necesario obtener mayores cantidades de ADN plasmídico, se utilizaron las columnas de intercambio iónico *Qiagen® Plasmid Midi Kit* y *Qiagen® Plasmid Maxi Kit* (Qiagen Inc.).

## 2.8. Secuenciación de ADN

La secuenciación de los fragmentos de ADN descritos en este trabajo y correspondientes a los experimentos realizados en la Universidad de Salamanca, fue llevada a cabo por el Servicio de Secuenciación de ADN de esta Universidad (secuenciador automático *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer*, Applied Biosystems). La secuenciación se realizó según el método de terminación de cadena descrito por Sanger (Sanger *et al.*, 1977), utilizando un sistema de marcaje por fluorescencia. La secuenciación de los fragmentos de ADN correspondientes a los experimentos realizados en el *Institut National de la Recherche Agronomique* en Nouzilly (Francia) (**Apartado 3**), fue llevada a cabo por *Beckman Coulter Genomics* (Reino Unido).

El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas se realizó empleando los programas *Lasergene®SeqMan* (DNASTar) y *FinchTV* (Geospiza). Para el alineamiento de secuencias se utilizó el servidor del Laboratorio Europeo de Biología Molecular e Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI), del cual se empleó la herramienta *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>) para el alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas y para el alineamiento de secuencias dos a dos de nucleótidos o de aminoácidos se empleó la herramienta *Needle* ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/nucleotide.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html)). Para el análisis de homologías de ADN entre diferentes especies se utilizó la herramienta *Basic Local Alignment Sequence Tool*

(BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (NCBI) y para la predicción de regiones promotoras de genes bacterianos (**Apartado 3**) se empleó la herramienta *Softberry* (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>).

## 2.9. Métodos de transformación de bacterias

### 2.9.1. Transformación de *E. coli*

Para la transformación de las cepas de *E. coli* JM109 y CC118 (**Apartado 4**) se siguió el método diseñado por Hanahan en 1983 (Hanahan., 1983), basado en la aplicación de un choque térmico a células competentes obtenidas mediante tratamiento con  $\text{CaCl}_2$  (Cohen *et al.*, 1972). Para llevar a cabo la transformación, se mezclaron las células competentes de *E. coli* con el ADN plasmídico que se quería introducir en la bacteria. La mezcla se mantuvo en hielo durante 30 minutos y, transcurrido este tiempo, las células se sometieron a un choque térmico exponiéndolas durante 1 minuto a 42° C y después manteniéndolas en hielo durante 2 minutos. A continuación, se les añadió 1 ml de caldo LB y se incubaron durante 1 hora a 37° C con el fin de permitir la expresión del gen de resistencia a antibiótico. Finalmente, las células se sembraron en placas de LB suplementadas con el antibiótico adecuado, X-Gal e IPTG y se incubaron durante 24 horas a 37°C, tiempo tras el cual se analizaron las colonias blancas como posibles clones transformantes.

Para la transformación de la cepa TG1 de *E. coli* (**Apartado 3.1.**) se obtuvieron células electrocompetentes, partiendo de un cultivo de esta cepa en caldo LB (16 horas de incubación a 37°C). Cuando el cultivo alcanzó un valor de  $\text{DO}_{600}$  de 0,4-0,45, se enfrió en hielo durante 20 minutos. A continuación, se lavaron las células 4 veces con glicerol al 10% (v/v) (centrifugando en cada lavado a 5000 rpm durante 20 minutos a 4°C). Después, se mezclaron 40  $\mu\text{l}$  de estas células con 5  $\mu\text{l}$  (aproximadamente 1  $\mu\text{g}$ ) del ADN plasmídico que se quería introducir en la célula. La mezcla se depositó en una cubeta estéril de electroporación (Bio Rad) de 1 mm de separación entre electrodos y se sometió a una descarga eléctrica de 1 pulso (2,5 Kv-4, ms) programa Ec3 en electroporador *Micropulser*<sup>TM</sup> (Bio Rad). Seguidamente, las células se resuspendieron en 1 ml de medio SOC y se incubaron durante 3 horas a 37° C con el fin de permitir que se expresara el gen de resistencia a antibiótico. Finalmente, las células se sembraron en medio sólido LB suplementado con ampicilina. Las placas se incubaron a 37°C hasta la visualización de colonias que se analizaron como posibles transformantes.

### 2.9.2. Transformación de *B. ovis*

Para la introducción de los plásmidos de interés en las diferentes cepas derivadas de *B. ovis* PA, se utilizó como método de transformación la electroporación de membrana. En primer lugar, se obtuvieron células electrocompetentes de las cepas de *B. ovis* empleadas en este trabajo. Para ello, se recogió la biomasa de células de *B. ovis* crecidas en TSA-HS-YE durante 44 h, se lavó 4 veces con agua estéril (centrifugando en cada lavado a 3000 x g durante 5 minutos) y se ajustó a una  $\text{DO}_{600}$  de 10. A continuación, se mezclaron 55  $\mu\text{l}$  de células electrocompetentes con 5  $\mu\text{l}$  del ADN plasmídico de interés (aproximadamente 3  $\mu\text{g}$ ). La mezcla se depositó en una cubeta estéril de electroporación (VWR) de 1 mm de separación entre electrodos y se sometió a una descarga eléctrica de 1 pulso con el programa Ec3 (2,5 Kv-4 ms) en electroporador *Micropulser*<sup>TM</sup> (Bio Rad). Seguidamente, las células se resuspendieron en 1 ml de medio líquido TSB-YE-HS, se depositaron en placas de cultivo celular de 24 pocillos y se incubaron durante 44 h a 37°C en atmósfera con  $\text{CO}_2$  al 5%. Transcurrido este tiempo de incubación, las células se centrifugaron a 3000 x g durante 5 min y se resuspendieron en TSB-YE-HS para sembrarlas en placas de TSA-YE-HS suplementadas con kanamicina. Las placas se incubaron en a 37°C y 5%  $\text{CO}_2$  hasta la visualización de colonias que se analizaron seguidamente como posibles transformantes.

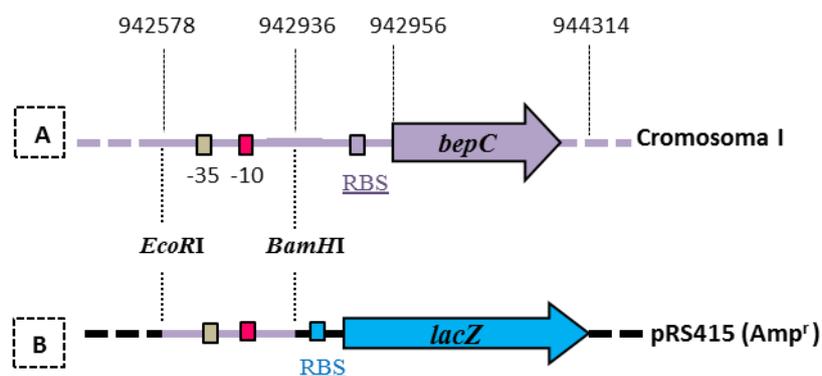
### 3. Estudio de la fuerza de la región promotora del gen *bepC* de *B. ovis*

Los experimentos que tuvieron por objeto el estudio de la región promotora del gen *bepC* se llevaron a cabo en el *Institut National de la Recherche Agronomique* (INRA) de Nouzilly (Francia). Para ello se realizaron las etapas descritas a continuación.

#### 3.1. Obtención de cepas recombinantes de *E. coli* portadoras de plásmidos con la región promotora del gen *bepC* fusionada al gen *lacZ*

En primer lugar, se llevó a cabo la construcción de las fusiones *lacZ*. Para ello se amplificaron mediante PCR (**Apartado 2.3.**) las regiones promotoras del gen *bepC* (BOV\_0938 y BR\_0945), en base a las secuencias publicadas de los genomas de *B. ovis* 63/290 (ATCC 25840; n° acceso al cromosoma I: NC\_009505) y *B. suis* 1330 (ATCC 23444; n° acceso al del cromosoma I: NC\_017251). Para ello se empleó como molde el ADN cromosómico de *B. ovis* PA (BCCN 76-250) y de *B. suis* 1330 (BCCN R12) y los cebadores *EcoRI*pBru-F y *BamHI*pbru-R (**Tabla III**). Cada reacción de PCR contenía 200 ng de ADN cromosómico de la cepa correspondiente, 2,5 µM de cada uno de los oligonucleótidos empleados, 0,2 mM de los dNTPs, 1mM de MgCl<sub>2</sub> y 0,25 µl de ADN polimerasa (*Gotaq®Flexi DNA polymerase*, 5U/µl, Promega Corp.), en un volumen final de 50 µl.

Los productos de PCR correspondientes, que poseían los sitios de restricción *EcoRI* y *BamHI* flaqueando las regiones promotoras a fusionar (**Figura 8A**), fueron digeridos y clonados de manera dirigida en el vector pRS415, previamente digerido con las mismas enzimas (**Figura 8B**). Cada mezcla de ligación se introdujo en la cepa TG1 de *E. coli* por electroporación para seleccionar los plásmidos pRS**p**bepCPA y pRS**p**bepC1330, portadores de las regiones promotoras fusionadas a *lacZ*. Las colonias crecidas tras la electroporación en placas de LB suplementadas con Amp se analizaron como posibles transformantes. El inserto de ADN de cada plásmido se secuenció con el cebador universal F y con el cebador *EcoRI*pBru-F (**Tablas III-IV**) para verificar que no se habían introducido mutaciones no deseadas en la secuencia clonada. Las características de ambos plásmidos se recogen en la **Tabla V**.



**Figura 8. Representación esquemática de la fusión de la región promotora del gen *bepC* con el gen *lacZ* y clonación en el vector pRS415.** A. Las posiciones numéricas son relativas al n° de acceso al cromosoma I de la secuencia publicada de *B. ovis* ATCC 25840 en el GenBank (NC\_009505). Se indican las regiones -35 (caja marrón), -10 (caja rosa) determinadas con *Softberry* y sitio de unión al ribosoma (RBS morado) de la región promotora del gen *bepC*. B. La región promotora del gen *bepC* se clonó delante (extremo 5') del sitio de unión al ribosoma de *lacZ* (RBS azul). Tras la transformación de la cepa TG1 de *E. coli* con los plásmidos recombinantes portadores de las fusiones, se seleccionaron los posibles transformantes crecidos en presencia de ampicilina (Amp<sup>r</sup>).

### 3.2. Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa de fusiones *lacZ*

Una vez verificada la secuencia de los insertos y siguiendo el método descrito por Miller (Miller., 1972), se midió la hidrólisis del sustrato cromogénico ONPG (*o*-nitrofenol) por parte la enzima  $\beta$ -galactosidasa regulada por los promotores fusionados en los plásmidos pRSbepCPA y pRSbepC1330. Para ello, se preparó un cultivo de cada cepa recombinante de *E. coli* TG1, portadora de sendas fusiones (**Tabla VI**) en caldo LB suplementado con ampicilina y se incubó a 37°C h durante 16 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se tomó 1 ml de cada cultivo y tras centrifugarlo a 13000 rpm durante 5 minutos, se resuspendió en 1 ml de tampón PM2 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, MnSO<sub>4</sub> 0,2 mM, 2-mercaptoetanol 50 mM, pH 7). A continuación, se midió la DO<sub>600</sub> de cada suspensión, se ajustó a un valor de 0,6 y se enfrió en hielo durante 20 minutos. Transcurrido ese tiempo, las células se permeabilizaron con 50  $\mu$ l de cloroformo y 25  $\mu$ l de dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,1 % (p/v) y se equilibraron durante 10 minutos a 28 °C. Seguidamente, en placas de 96 pocillos de fondo plano (*Maxisorp Nunc Immunoplate*, Thermo Scientific), se depositaron 100  $\mu$ l por pocillo de diferentes diluciones de las suspensiones bacterianas permeabilizadas (factor “F” en la fórmula a continuación expuesta) y se añadieron 25  $\mu$ l de ONPG al 0,4 % (p/v) (Sigma) (tiempo= 0 minutos). Se midió el tiempo hasta la aparición de una coloración amarilla, momento en el cual la reacción se detuvo mediante la adición de 50  $\mu$ l de solución de parada (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M) y se calculó el intervalo de tiempo transcurrido hasta ese momento ( $\Delta T$ ). Finalmente, se midió la DO de cada pocillo a 420 nm y a 550nm. La actividad  $\beta$ -galactosidasa se expresó en unidades de Miller, empleando para ello la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades} = [\text{DO}_{420} - (1,75 \times \text{DO}_{550}) / \text{DO}_{600} \times \Delta T] \times F \times 1000$$

Los datos se representaron como la media de Unidades Miller de actividad  $\beta$ -galactosidasa  $\pm$  la D.E. de tres ensayos independientes.

## 4. Obtención de mutantes de *B. ovis* PA por inactivación de los genes de interés por PCR de solapamiento

Para la obtención de cepas mutantes simples, en primer lugar, se inactivaron los genes diana mediante la denominada PCR de solapamiento (Ho *et al.*, 1989), empleando como molde el ADN cromosómico de la cepa parental *B. ovis* PA. Posteriormente, se construyeron plásmidos portadores de los genes inactivados y finalmente, se sustituyeron los genes silvestres por los genes inactivados.

### 4.1. Obtención de mutantes simples

#### 4.1.1. Inactivación de genes mediante PCR de solapamiento

En primer lugar se llevó a cabo la inactivación de los genes *bepC* (BOV\_0938), *ugpB* (BOV\_A0617), *omp25* (BOV\_0692) y *omp25c* (BOV\_0116) mediante PCR de solapamiento (**Figura 9**, paneles 1-3). Los cebadores para la obtención de cepas mutantes se diseñaron con el programa *Amplifx* (Nicolas Jullien, CNRS, Marseille), según la secuencia del genoma de *B. ovis* ATCC 25840 disponible en la base de datos del NCBI. (nº acceso GenBank al cromosoma I y II: NC\_009505 y NC\_009504, respectivamente).

Para la inactivación de los genes diana se llevaron a cabo, en primer lugar, dos reacciones de PCR independientes (**Figura 9**, paneles 1 y 2). En cada reacción se obtuvo un producto de amplificación correspondiente a los extremos 5' y 3' del gen a inactivar. Para ello se empleó, en cada una de ellas, un oligonucleótido externo al ORF (marco de lectura abierto) del gen (MUT-F/MUT-R) y otro que hibrida dentro del ORF delimitando la zona a delecionar (OVL-F/OVL-R). El cebador interno al gen empleado en la amplificación del extremo 3'(OVL-F), poseía una región complementaria a la secuencia del otro cebador interno utilizado para amplificar el extremo 5' (OVL-R) (regiones complementarias señaladas en rojo en la **Figura 9**,

paneles 1 y 2). Posteriormente, en una tercera reacción de PCR (**Figura 9**, panel 3), empleando los cebadores externos, los productos amplificados en las reacciones anteriores (5' y 3') se unieron a través de las regiones de solapamiento presentes derivadas de los cebadores internos empleados. De este modo, la tercera reacción de PCR permitió obtener el gen deletado (producto MUT-F+MUT-R). Los cebadores empleados se recogen en la **Tabla III**.

A continuación se indican el gen a inactivar, las parejas de cebadores empleadas en las reacciones de PCR para amplificar los extremos 5' y 3', junto con los empleados para la reacción de PCR solapamiento: *bepC* (extremo 5': BepCMUT-F + BepCOVL-R; extremo 3': BepCOVL-F + BepCMUT-R; solapamiento: BepCMUT-F + BepCMUT-R), *ugpB* (extremo 5': SP41MUT-F + SP41OVL-R; extremo 3': SP41OVL-F2 + SP41MUT-R2; solapamiento: SP41MUT-F + SP41MUT-R2); *omp25* (extremo 5': 25MUTZ-F + 25OVL-R; extremo 3': 25OVL-F + 25MUTZ-R; solapamiento: 25MUTZ-F + 25MUTZ-R) y para la inactivación del gen *omp25c* (extremo 5': 25cdMUT-F + 25cOVL-R; extremo 3': 25cOVL-F + 25cMUT-R; solapamiento: 25cdMUT-F + 25cMUT-R). Como resultado de las PCRs de solapamiento, se obtuvieron fragmentos de ADN correspondientes a los genes inactivados  $\Delta bepC$ ,  $\Delta ugpB$ ,  $\Delta omp25$  y  $\Delta omp25c$ .

#### 4.1.2. Construcción de plásmidos portadores de los genes inactivados

Los productos finales de PCR de solapamiento  $\Delta bepC$ ,  $\Delta ugpB$ ,  $\Delta omp25$  y  $\Delta omp25c$ , se clonaron en el vector pGEM T-Easy (**Figura 9**, panel 4). A continuación, cada mezcla de ligación fue introducida por transformación en células competentes de *E. coli* JM109, para la selección de los plásmidos pNVBepCOVL01, pNVSP41OVL1, pNV25OVL1 y pNV25cOVL1. Los insertos presentes en los plásmidos se secuenciaron empleándose los cebadores universales (**Tabla IV**), una reacción de secuenciación con cada uno de ellos, y una tercera con un cebador que hibrida en el inserto amplificado (**Tabla IV**) para comprobar que no se habían introducido mutaciones adicionales no deseadas.

Una vez verificadas las secuencias de los insertos, éstos se subclonaron en las zonas de restricción *SacI* y *SphI* del vector suicida en *Brucella* pCVD-KanD (**Figura 9**, panel 5) y la mezcla de ligación fue introducida en *E. coli* CC118, para la selección de los plásmidos pNVBepCOVL02, pNVSP41OVL2, pNV25OVL2 y pNV25cOVL2. Estos plásmidos, que confieren a la bacteria resistencia a kanamicina y sensibilidad a sacarosa, se emplearon para la inserción de los genes inactivados en el cromosoma de *B. ovis* PA. Los plásmidos y sus características se recogen en la **Tabla V**. El esquema general de la inactivación de los genes por PCR de solapamiento y su clonación en los diferentes plásmidos para la obtención de cepas mutantes, se recoge en **Figura 9**.

#### 4.1.3. Sustitución de los genes silvestres por los inactivados en *B. ovis* PA

Tras la obtención de los plásmidos recombinantes pNVBepCOVL02, pNVSP41OVL2, pNV25OVL2 y pNV25cOVL2, estos se introdujeron en *B. ovis* PA por electroporación (**Apartado 2.9.2**). Las bacterias en las que ocurrió un entrecruzamiento simple entre la secuencia cromosómica y el plásmido a través de una de las dos regiones de ADN adyacentes al gen diana (**Figura 9**, panel 6a), integraron el plásmido en el cromosoma bacteriano. De este modo, los clones recombinantes se seleccionaron mediante su siembra en TSA-YE-HS-Kan y se caracterizaron genotípicamente como se describe en el **Apartado 5**. Las cepas seleccionadas se recogen en la **Tabla VI**.

Tras la integración del plásmido recombinante en el cromosoma, puede ocurrir un segundo proceso de entrecruzamiento simple entre las zonas homólogas próximas existentes en la copia del gen silvestre y la copia del gen inactivado que poseen estas cepas (**Figura 9**, panel 6b). La selección de las bacterias en las que se produjo una segunda recombinación homóloga (**Figura 9**, panel 7) se realizó tras la siembra en placas de TSA-YE-HS suplementadas con sacarosa. Las cepas sensibles a kanamicina y resistentes a sacarosa se seleccionaron

como posibles cepas mutantes o revertientes y se caracterizaron genotípicamente para su diferenciación (**Apartado 5**).

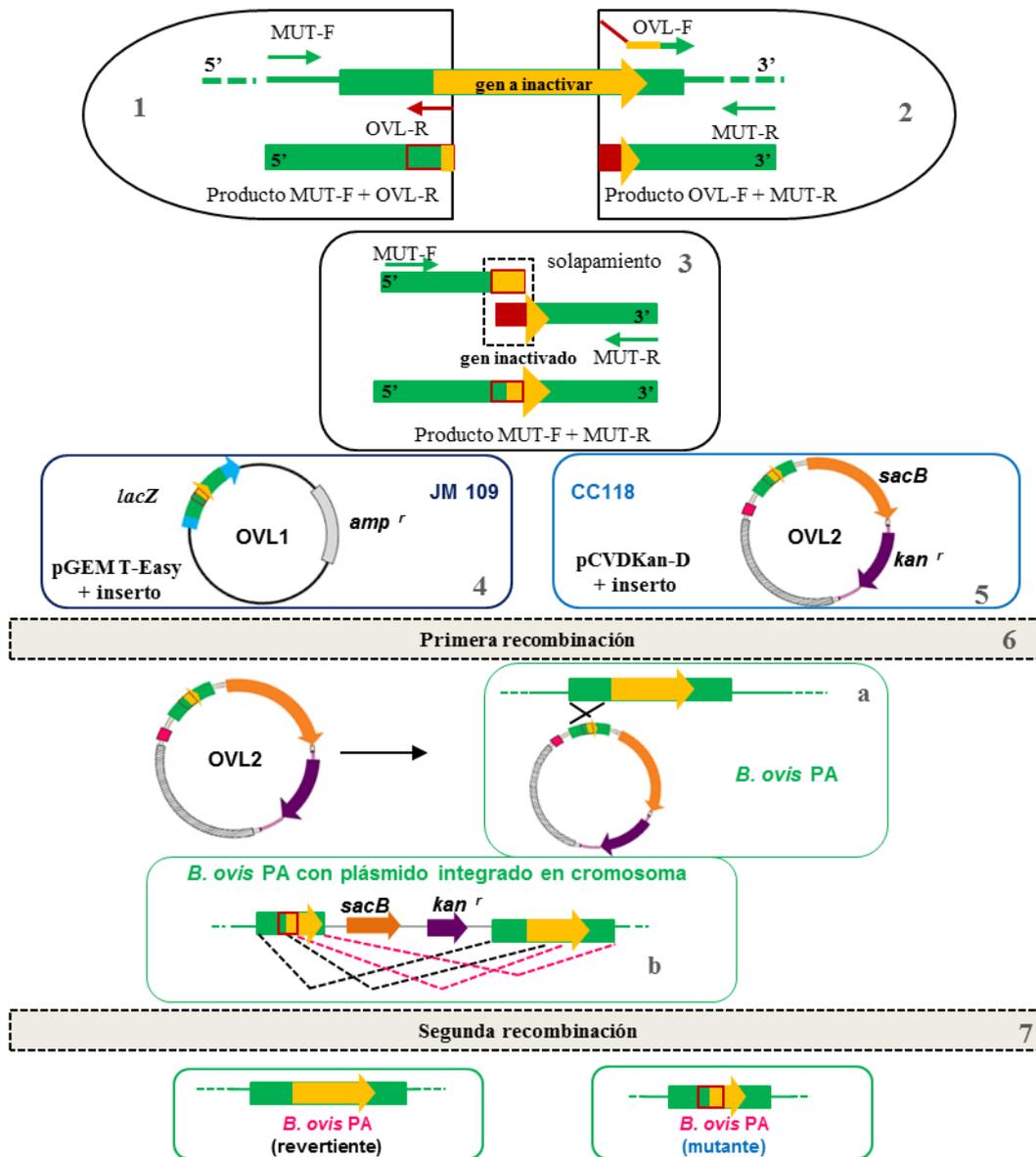
#### 4.2. Obtención de mutantes múltiples

Una vez obtenidos y caracterizados genotípicamente los mutantes simples (**Apartado 5**), éstos y los mutantes de *B. ovis* PA omp10-M, omp19-M y omp31-M obtenidos previamente (Sancho., 2014; Sidhu-Muñoz *et al.*, 2016) se emplearon como base para obtención de mutantes dobles y triples. Para ello, los plásmidos obtenidos en este trabajo (**Tabla IV**) y los plásmidos pNV10OVL2, pNV19OVL2, pPS31OVL02 y pNVcgsOVL03 (Sidhu-Muñoz *et al.*, 2016; Sancho., 2014; Martín-Martín *et al.*, 2012) se introdujeron por electroporación, en distintas combinaciones, en los mutantes mencionados.

La selección de cada cepa con el correspondiente plásmido integrado en el cromosoma, de la cepa mutante y de la cepa revertiente al genotipo empleado como base, se realizó como se describe en el apartado anterior. Las características más relevantes de todas las cepas obtenidas en este trabajo se recogen en la **Tabla VI**.

### 5. Caracterización genotípica de las cepas obtenidas

Para la caracterización genotípica de las cepas obtenidas se amplificó mediante PCR (**Apartado 2.3.**) el gen diana en proceso de mutagénesis empleando los cebadores recogidos en las **Tablas III y IV**. Se realizó una reacción con oligonucleótidos que hibridan en las regiones externas al gen a eliminar (fragmento amplificado de mayor tamaño en el gen silvestre y de menor tamaño en el mutado) y una segunda reacción con uno de los cebadores externos y otro que hibrida en el interior de la región a eliminar (imposibilidad de anillamiento en el caso del gen mutado). El gen diana y las parejas de cebadores empleadas en cada reacción fueron los siguientes: *bepC* (externos: BepCMUT-F + BepCMUT-R; externo/interno: BepCMUT-F + BepC-R4), *ugpB* (externos: SP41Sec + SP41MUT-R2; externo/interno: SP41Sec + MUT-R4); *omp19* (externos: 19MUT-F+19MUT-R; interno/externo: OMP19-F3 + OMP19MUT-R), *omp25* (externos: 25MUTZ-F + 25MUTZ-R; interno/externo: 25MAT + 25MUTZ-R), *omp25c* (externos: 25cdMUT-F + 25cMUT-R; 25cMAT + 25cMUT-R), *cgs* (externos: cgsMUT-F + cgsMUT-R; interno/externo: cgs-F4 + MUT-R) y *omp31* (externos: 31MUT-F + 31MUT-R; interno/externo: 31MAT + 31MUT-R).



**Figura 9.** Esquema de la mutagénesis de *B. ovis* PA mediante introducción de un plásmido portador de un gen de interés inactivado por PCR de solapamiento. Para la inactivación del gen de interés se realizaron dos reacciones de PCR independientes (paneles 1-2) en las que se amplificaron el extremo 5' y 3' del gen a inactivar, empleando en cada una de ellas un cebador externo (panel 1: MUT-F; panel 2: MUT-R) al gen de interés y otro interno (panel 1: OVL-F; panel 2: OVL-R) que hibridan delimitando la zona deleciónar. Debido a la existencia de regiones complementarias entre el cebador interno OVL-F (panel 2: zona de OVL-F marcada en rojo) y el cebador OVL-R (panel 1: flecha roja), tras mezclar los productos 5' y 3' en una tercera reacción de PCR con los cebadores MUT-F y MUT-R (panel 3), se obtuvo el gen deleciónado amplificado. El producto de la PCR de solapamiento se clonó en el vector pGEMT-Easy y se introdujo en *E. coli* JM109 (panel 4). Tras seleccionar el plásmido OVL01 (Amp<sup>r</sup>, selección blanco/azul), el inserto se subclonó en el vector suicida en *Brucella* pCVD-KanD (panel 5). Este producto se introdujo en *E. coli* CC118 y tras seleccionar el plásmido OVL02 (Kan<sup>r</sup>, Sac<sup>s</sup>), se introdujo finalmente en *B. ovis* PA (o en cepas mutantes para la obtención de mutantes múltiples) (panel 6). El plásmido OVL02 integrado en el cromosoma de *B. ovis* PA (panel 6a) por recombinación homóloga (posee copia del gen silvestre y del gen mutado) puede escindirse en una segunda recombinación entre las regiones de homología presentes en él (panel 6b), dando lugar a la pérdida del gen mutante (cepa revertiente, panel 7: líneas punteadas negras) o del gen silvestre (cepa mutante, panel 7: líneas punteadas rosas).

**Tabla V.** Plásmidos construidos para la obtención de mutantes de *B. ovis* PA y para la obtención de cepas portadoras de fusiones de la región promotora del gen *bepC* con el gen *lacZ*.

<b>Plásmidos generados para la obtención de cepas mutantes de <i>B. ovis</i> PA</b>		
<b>Nombre</b>	<b>Genotipo relevante</b>	<b>Descripción</b>
pNVBepCOVL01	$\Delta bepC$ , Amp <sup>r</sup>	Gen <i>bepC</i> de <i>B. ovis</i> PA inactivado por PCR de solapamiento y clonado en pGEM-T Easy
pNVBepCOVL02	$\Delta bepC$ , <i>sacB</i> , Kan <sup>r</sup>	Inserto <i>SphI-SacI</i> de pNVBepCOVL01, clonado en pCVDKan-D.
pNVSP41OVL01	$\Delta ugpB$ , Amp <sup>r</sup>	Gen <i>ugpB</i> de <i>B. ovis</i> PA inactivado por PCR de solapamiento y clonado en pGEM-T Easy
pNVSP41OVL02	$\Delta ugpB$ , <i>sacB</i> , Kan <sup>r</sup>	Inserto <i>SphI-SacI</i> de pNVSP41OVL01, clonado en pCVDKan-D.
pNV25OVL01	$\Delta omp25$ , Amp <sup>r</sup>	Gen <i>omp25</i> de <i>B. ovis</i> PA inactivado por PCR de solapamiento y clonado en pGEM-T Easy
pNV25OVL02	$\Delta omp25$ , <i>sacB</i> , Kan <sup>r</sup>	Inserto <i>SphI-SacI</i> de pNV25OVL01, clonado en pCVDKan-D.
pNV25cOVL01	$\Delta omp25c$ , Amp <sup>r</sup>	Gen <i>omp25c</i> de <i>B. ovis</i> PA inactivado por PCR de solapamiento y clonado en pGEM-T Easy
pNV25cOVL02	$\Delta omp25c$ , <i>sacB</i> , Kan <sup>r</sup>	Inserto <i>SphI-SacI</i> de pNV25cOVL01, clonado en pCVDKan-D
<b>Plásmidos generados para el estudio de la región promotora del gen <i>bepC</i> (fusiones <i>lacZ</i>)</b>		
pRSpbepCPA	Amp <sup>r</sup>	Inserto <i>EcoRI-BamHI</i> de la región promotora del gen <i>bepC</i> de <i>B. ovis</i> PA amplificado por PCR y clonada en pRS415 en fusión con el gen <i>lacZ</i>
pRSpbepC1330	Amp <sup>r</sup>	Inserto <i>EcoRI-BamHI</i> de la región promotora del gen <i>bepC</i> de <i>B. suis</i> 1330 amplificado por PCR y clonada en pRS415 en fusión con el gen <i>lacZ</i>

**Tabla VI.** Cepas modificadas genéticamente generadas en la obtención de cepas mutantes de *B. ovis* PA <sup>(a)</sup> y en la obtención de cepas portadoras de fusiones de la región promotora del gen *bepC* con el gen *lacZ*.

Cepas de <i>B. ovis</i> PA con el plásmido integrado en el cromosoma <sup>b</sup>		
Cepa	Abreviatura	Genotipo respecto al/los gen/es de interés
<i>B. ovis</i> -pNVBepCOVL02-I	bepC-I	<i>bepC</i> ::pNVBepCOVL02
<i>B. ovis</i> -pNVSP410VL02-I	ugpB-I	<i>ugpB</i> ::pNVSP410VL02
<i>B. ovis</i> -pNV25OVL02-I	omp25-I	<i>omp25</i> ::pNV25OVL02
<i>B. ovis</i> -pNV25cOVL02-I	omp25c-I	<i>omp25c</i> ::pNV25cOVL02
Cepas mutantes simples con el gen de interés inactivado y cepas revertientes al genotipo silvestre <sup>c</sup>		
<i>B. ovis</i> -pNVBepCOVL02-M	bepC-M	$\Delta$ <i>bepC</i>
<i>B. ovis</i> -pNVSP410VL02-M	ugpB-M	$\Delta$ <i>ugpB</i>
<i>B. ovis</i> -pNV25OVL02-M	omp25-M	$\Delta$ <i>omp25</i>
<i>B. ovis</i> -pNV25cOVL02-M	omp25c-M	$\Delta$ <i>omp25c</i>
<i>B. ovis</i> -pNVBepCOVL02-R	bepC-R	<i>bepC</i>
<i>B. ovis</i> -pNVSP410VL02-R	ugpB-R	<i>ugpB</i>
<i>B. ovis</i> -pNV25OVL02-R	omp25-R	<i>omp25</i>
<i>B. ovis</i> -pNV25cOVL02-R	omp25c-R	<i>omp25c</i>
Cepas mutantes simples de <i>B. ovis</i> PA con el plásmido integrado en el cromosoma <sup>b,d</sup>		
<i>B. ovis</i> $\Delta$ <i>bepC</i> -pNVSP410VL02-I	bepC/ugpB-I	$\Delta$ <i>bepC</i> , <i>ugpB</i> ::pNVSP410VL02
<i>B. ovis</i> $\Delta$ <i>omp25</i> -pNV25cOVL02-I	omp25/ugpB-I	$\Delta$ <i>omp25</i> , <i>omp25c</i> ::pNV25cOVL02
<i>B. ovis</i> $\Delta$ <i>omp10</i> -pNVSP410VL02-I	omp10/ugpB-I	$\Delta$ <i>omp10</i> , <i>ugpB</i> ::pNVSP410VL02
<i>B. ovis</i> $\Delta$ <i>omp10</i> -pPS31OVL2-I	omp10/omp31-I	$\Delta$ <i>omp10</i> , <i>omp31</i> ::pPS31OVL2
<i>B. ovis</i> $\Delta$ <i>omp10</i> -pNV19OVL02-I	omp10/omp19-I	$\Delta$ <i>omp10</i> , <i>omp19</i> ::pNV19OVL02
<i>B. ovis</i> $\Delta$ <i>omp19</i> -pNV10OVL02-I	omp19/omp10-I	$\Delta$ <i>omp19</i> , <i>omp10</i> ::pNV10OVL02
<i>B. ovis</i> $\Delta$ <i>omp19</i> -pNVSP410VL02-I	omp19/ugpB-I	$\Delta$ <i>omp19</i> , <i>ugpB</i> ::pNVSP410VL02
<i>B. ovis</i> $\Delta$ <i>omp25</i> -pPS31OVL2-I	omp25/omp31-I	$\Delta$ <i>omp25</i> , <i>omp31</i> ::pPS31OVL2
<i>B. ovis</i> $\Delta$ <i>omp25</i> -pNVcgsOVL03-I	omp25/cgs-I	$\Delta$ <i>omp25</i> , <i>cgs</i> ::pNVcgsOVL03
<i>B. ovis</i> $\Delta$ <i>omp31</i> -pNVcgsOVL03-I	omp31/cgs-I	$\Delta$ <i>omp31</i> , <i>cgs</i> ::pNVcgsOVL03
<i>B. ovis</i> $\Delta$ <i>omp31</i> -pNV10OVL02-I	omp31/omp10-I	$\Delta$ <i>omp31</i> , <i>omp10</i> ::pNV10OVL02
<i>B. ovis</i> $\Delta$ <i>omp31</i> -pNV19OVL02-I	omp31/omp19-I	$\Delta$ <i>omp31</i> , <i>omp19</i> ::pNV19OVL02
Cepas mutantes dobles con los genes de interés inactivados <sup>c,d</sup>		
<i>B. ovis</i> $\Delta$ <i>bepC</i> -pNVSP410VL02-M	bepC/ugpB-M	$\Delta$ <i>bepC</i> $\Delta$ <i>ugpB</i>
<i>B. ovis</i> $\Delta$ <i>omp25</i> -pNV25cOVL02-M	omp25/omp25c-M	$\Delta$ <i>omp25</i> $\Delta$ <i>omp25c</i>
<i>B. ovis</i> $\Delta$ <i>omp10</i> -pNVSP410VL02-M	omp10/ugpB-M	$\Delta$ <i>omp10</i> $\Delta$ <i>ugpB</i>
<i>B. ovis</i> $\Delta$ <i>omp10</i> -pPS31OVL2-M	omp10/omp31-M	$\Delta$ <i>omp10</i> $\Delta$ <i>omp31</i>
<i>B. ovis</i> $\Delta$ <i>omp19</i> -pNVSP410VL02-M	omp19/ugpB-M	$\Delta$ <i>omp19</i> $\Delta$ <i>ugpB</i>
<i>B. ovis</i> $\Delta$ <i>omp25</i> -pNVcgsOVL03-M	omp25/cgs-M	$\Delta$ <i>omp25</i> $\Delta$ <i>cgs</i>
<i>B. ovis</i> $\Delta$ <i>omp31</i> -pNVcgsOVL03-M	omp31/cgs-M	$\Delta$ <i>omp31</i> $\Delta$ <i>cgs</i>
<i>B. ovis</i> $\Delta$ <i>omp31</i> -pNV10OVL02-M	omp31/omp10-M	$\Delta$ <i>omp31</i> $\Delta$ <i>omp10</i>
<i>B. ovis</i> $\Delta$ <i>omp31</i> -pNV19OVL02-M	omp31/omp19-M	$\Delta$ <i>omp31</i> $\Delta$ <i>omp19</i>
Cepas mutantes dobles con el plásmidos integrado en el cromosoma <sup>b,d</sup>		
<i>B. ovis</i> $\Delta$ <i>omp10</i> $\Delta$ <i>omp31</i> -pNV25cOVL02-I	10/31/25c-I	$\Delta$ <i>omp10</i> $\Delta$ <i>omp31</i> , <i>omp25c</i> ::pNV25cOVL02
<i>B. ovis</i> $\Delta$ <i>omp31</i> $\Delta$ <i>omp10</i> -pNV25cOVL02-I	31/10/25c-I	$\Delta$ <i>omp31</i> , $\Delta$ <i>omp10</i> , <i>omp25c</i> ::pNV25cOVL02
<i>B. ovis</i> $\Delta$ <i>omp10</i> $\Delta$ <i>ugpB</i> -pPS31OVL2-I	10/ugpB/31-I	$\Delta$ <i>omp10</i> , $\Delta$ <i>ugpB</i> , <i>omp31</i> ::pPS31OVL2
Cepas mutantes triples con los genes de interés inactivados <sup>c,d</sup>		
<i>B. ovis</i> $\Delta$ <i>omp10</i> $\Delta$ <i>omp31</i> -pNV25cOVL02-M	10/31/25c-M	$\Delta$ <i>omp10</i> $\Delta$ <i>omp31</i> $\Delta$ <i>omp25c</i>
<i>B. ovis</i> $\Delta$ <i>omp10</i> $\Delta$ <i>ugpB</i> -pPS31OVL2-M	31/10/25c-M	$\Delta$ <i>omp31</i> $\Delta$ <i>omp10</i> $\Delta$ <i>omp25c</i>
<i>B. ovis</i> $\Delta$ <i>omp31</i> $\Delta$ <i>omp10</i> -pNV25cOVL02-M	10/ugpB/31-M	$\Delta$ <i>omp10</i> $\Delta$ <i>ugpB</i> $\Delta$ <i>omp31</i>
Cepas de <i>E. coli</i> TG1 con plásmidos portadores de fusiones <i>lacZ</i>		
Cepa	Descripción	Fenotipo
<i>E. coli</i> TG1- pRS5pbepCPA	región promotora del gen <i>bepC</i> de <i>B. ovis</i> PA fusionada con <i>lacZ</i>	Amp <sup>r</sup>
<i>E. coli</i> TG1- pRS5pbepC1330	región promotora del gen <i>bepC</i> de <i>B. suis</i> 1330 fusionada con <i>lacZ</i>	Amp <sup>r</sup>

<sup>a</sup> Las cepas *B. ovis*  $\Delta$ *omp10*, *B. ovis*  $\Delta$ *omp19*, *B. ovis*  $\Delta$ *omp31* y los plásmidos pNV10OVL02, pNV19OVL02, pPS31OVL02, pNVcgsOVL03, proceden de trabajos anteriores (Martín-Martín *et al.*, 2012; Sancho, 2014; Sidhu-Muñoz *et al.*, 2016).<sup>b</sup> Las cepas de *B. ovis* con el plásmido integrado en el cromosoma poseen un fenotipo Kan<sup>r</sup>, Sac<sup>s</sup>.<sup>c</sup> Las cepas mutantes de *B. ovis* poseen un fenotipo Kan<sup>r</sup>, Sac<sup>s</sup>.<sup>d</sup> Las cepas obtenidas como revertientes al fenotipo empleado como base en la obtención de mutantes múltiples no se incluyeron en la tabla para facilitar la comprensión de la misma.

## 6. Análisis del crecimiento

A partir de las cepas conservadas en DMSO a  $-80^{\circ}\text{C}$  se realizaron precultivos en placas de TSA-YE-HS que se incubaron durante 44 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera con el 5% de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, de estos precultivos se obtuvieron otros nuevos en las mismas condiciones, a partir de los cuales se prepararon las suspensiones bacterianas empleadas en los diferentes ensayos que se describen a continuación.

A partir de cultivos frescos en TSA-YE-HS obtenidos de la manera expuesta anteriormente, se prepararon suspensiones bacterianas en 3 ml de tampón fosfato salino estéril (PBS:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 mM, KCl 2,7 mM, y NaCl 137 mM) y se ajustó la  $\text{DO}_{600}$  a un valor de 0,2, el cual, en la cepa parental *B. ovis* PA corresponde aproximadamente a  $1 \times 10^9$  UFC/ml. Una vez preparadas las suspensiones de cada una de las cepas, se realizaron seis diluciones decimales seriadas, sembrándose por triplicado 100  $\mu\text{l}$  de cada dilución en medio TSA-YE-HS. Las placas se incubaron durante 7 días a  $37^{\circ}\text{C}$  y con 5% de  $\text{CO}_2$  y, una vez transcurrido el tiempo, se realizaron los recuentos de las colonias obtenidas. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  D.E. ( $n=3$ ) del log UFC/ml en una suspensión de cada cepa con un valor de  $\text{DO}_{600}$  0,2.

## 7. Estudio de las propiedades de la membrana externa

### 7.1. Autoaglutinación en medio líquido

Se prepararon suspensiones de las células en caldo TSB-YE-HS, ajustando a una  $\text{DO}_{600}$  de 0,8. Posteriormente, se depositó 1 ml de cada muestra en una cubeta de espectrofotometría, manteniéndose estáticamente a temperatura ambiente durante 48 h, tiempo durante el cual se registró la evolución de la  $\text{DO}_{600}$  de cada una. Se utilizó como control la cepa parental y los resultados se expresaron como la media  $\pm$  D.E. ( $n=3$ ) de los porcentajes de  $\text{DO}_{600}$ , tomando como referencia el valor de la  $\text{DO}$  inicial de cada cepa (valor del 100%).

### 7.2. Sensibilidad a polimixina B y desoxicolato sódico

Para evaluar la sensibilidad de las distintas cepas al péptido catiónico polimixina B, se siguió el protocolo descrito previamente (Martínez de Tejada *et al.*, 1995) con algunas modificaciones (Caro-Hernández *et al.*, 2007). A partir de cultivos de 44 h de crecimiento en medio sólido TSA-YE-HS se prepararon suspensiones en PBS de  $\text{DO}_{600}$  0,2. La suspensión se diluyó adecuadamente en PBS hasta una concentración bacteriana de  $1 \times 10^4$  UFC/ml. En microplacas estériles de 96 pocillos (VWR) se mezclaron por triplicado 100  $\mu\text{l}$  de cada muestra con 100  $\mu\text{l}$  de PBS (control negativo) o con 100  $\mu\text{l}$  de sulfato de polimixina B (Sigma-Aldrich) 2 mg/ml. De este modo, la concentración final de polimixina B y de células quedó reducida a la mitad (1 mg/ml para la polimixina B y  $0,5 \times 10^4$  UFC/ml para las bacterias). Las placas se incubaron durante 90 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  y en atmósfera con 5%  $\text{CO}_2$ . Transcurrido ese tiempo, 50  $\mu\text{l}$  de cada uno de los pocillos se sembraron por triplicado en placas de TSA-YE-HS, que se incubaron durante 7 días a  $37^{\circ}\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$ . Por último, se realizaron los recuentos de las UFC/placa obtenidas después de este tiempo. Considerando como 100% de supervivencia el número de UFC obtenidas tras la exposición a PBS, se calculó el porcentaje de supervivencia de cada cepa tras la exposición a polimixina B. Los resultados se expresaron como media del porcentaje de supervivencia  $\pm$  D.E. ( $n=3$ ).

La evaluación de la sensibilidad de las distintas cepas al detergente aniónico desoxicolato de sodio (Sigma-Aldrich) se llevó a cabo siguiendo la misma metodología descrita para el ensayo de sensibilidad a polimixina B. En este caso, la concentración final del desoxicolato de sodio por pocillo fue de 0,1 mg/ml.

### 7.3. Sensibilidad a peróxido de hidrógeno

Para evaluar la sensibilidad a peróxido de hidrógeno se siguió el protocolo descrito por Elzer *et al.* en 1994 (Elzer *et al.*, 1994), con pequeñas modificaciones (Caro-Hernández *et al.*, 2007). Para ello, se prepararon

suspensiones bacterianas en PBS a una  $DO_{600}$  de 0,2, se sembraron 100  $\mu$ l de cada una de ellas por triplicado, en placas de TSA-YE-HS y se depositaron 10  $\mu$ l de  $H_2O_2$  al 30% (Sigma Aldrich) sobre un disco de papel Whatman 3MMChr (9 milímetros de diámetro) colocado previamente en el centro de cada placa. Tras 72 horas de incubación, se analizaron los halos de inhibición aparecidos, realizando cuatro medidas de cada placa empleada. Tras calcular el diámetro medio de cada placa, los resultados obtenidos se expresaron como la media  $\pm$  D.E. ( $n=3$ ) del diámetro (en cm) del halo de inhibición.

#### 7.4. Sensibilidad a suero humano no inmune

En la realización de este estudio se empleó sangre de un individuo sin exposición previa a *Brucella spp.* Tras producirse la coagulación de la sangre, las muestras se centrifugaron a 10000 x g durante 10 minutos e, inmediatamente, el suero se procesó como se describe a continuación, siguiendo el protocolo descrito por Corbeil *et al.* en 1988 (Corbeil *et al.*, 1988) con algunas modificaciones (Caro-Hernández *et al.*, 2007).

A partir de cultivos en placa de las cepas mutantes correspondientes, se prepararon suspensiones en PBS de valores de  $DO_{600}$  0,2 y se realizaron diluciones decimales seriadas con el objeto de obtener una concentración bacteriana de  $2 \times 10^4$  UFC/ml. Seguidamente, en pocillos de microplacas estériles de 96 pocillos (VWR), se mezclaron por triplicado 50  $\mu$ l de cada suspensión, con 150  $\mu$ l de suero o con 150  $\mu$ l del mismo suero pero descomplementado a 56 °C durante 30 minutos. Tras 4 horas de exposición a 37°C y atmósfera con 5%  $CO_2$ , se sembraron por duplicado 50  $\mu$ l de cada mezcla en placas de TSA-HS-YE, que se incubaron hasta obtener colonias visibles. Por último, se realizaron los recuentos de las UFC/placa obtenidas y se calcularon los porcentajes de supervivencia observados, tomando como control del 100% de supervivencia el crecimiento observado para cada cepa tras la exposición al suero descomplementado. Los resultados se expresaron como % supervivencia  $\pm$  D.E. ( $n=3$ ).

#### 7.5. Sensibilidad a otros compuestos tóxicos

Como parte de la caracterización de los mutantes simples  $\Delta bepC$  y  $\Delta ugpB$  de *B. ovis* PA se evaluó su sensibilidad a diferentes compuestos. Para ello, se siguió la metodología descrita para la evaluación de la sensibilidad a peróxido de hidrógeno, depositando sobre los discos de papel Whatman 10  $\mu$ l de dodecilsulfato sódico (SDS) (10 mg/ml), bromuro de etidio (BrEt) (5 mg/ml), cristal violeta (CV) (2 mg/ml), acriflavina (2 mg/ml), ampicilina (Amp) (1 mg/ml) y kanamicina (0,1 mg/ml). Tras 72 horas de incubación, se analizaron los halos de inhibición aparecidos, realizando cuatro medidas de cada placa empleada. Tras calcular el diámetro medio de cada placa, los resultados obtenidos se expresaron como la media  $\pm$  D.E. ( $n=3$ ) del diámetro (en cm) del halo de inhibición.

### 8. Estudio de la topología de la superficie bacteriana

El estudio de la topología de la superficie celular de las diferentes cepas analizadas se realizó en el Institut National de la Recherche Agronomique de Nouzilly, Francia. Dicho estudio se realizó mediante la técnica de Elisa indirecto (i-ELISA) con anticuerpos monoclonales (MAbs) frente a diferentes epítomos de antígenos de la envoltura bacteriana: peptidoglucano, lipopolisacárido rugoso, lipoproteínas de ME, proteínas mayoritarias de ME y proteína periplásmica BP26. Para ello se emplearon los procedimientos descritos por Cloeckaert *et al.* en 1993 (Cloeckaert *et al.*, 1993).

Como antígenos se emplearon células de la cepa parental *B. ovis* PA (control) y de las cepas mutantes obtenidas en este trabajo, junto con los mutantes  $\Delta cgs$ ,  $\Delta omp10$ ,  $\Delta omp19$  y  $\Delta omp31$  obtenidos en trabajos anteriores (Martín-Martín *et al.*, 2012; Sancho., 2014; Sidhu-Muñoz *et al.*, 2016). La obtención de antígenos se realizó a partir de cultivos en placa de cada cepa, los cuales se recogieron en 1 ml de agua estéril y se inactivaron

durante 1 h a 65°C. Posteriormente, se realizaron dos lavados de las células con agua estéril, centrifugando 5 minutos a 8000 x g cada vez. A continuación, las suspensiones se ajustaron a una DO<sub>600</sub> de 1 en PBS y se homogenizaron mediante una breve sonicación (10 segundos y 40% amplitud en sonicador Modelo 120, *Sonic Dismembrator*, Fisher). Posteriormente y en placas de 96 pocillos de fondo plano (Maxisorp Nunc Immunoplate, Thermo Scientific), se depositaron 100 µl de cada suspensión por pocillo y por triplicado. Las placas se incubaron durante la noche a temperatura ambiente para tapizar el fondo del pocillo. Al día siguiente, los pocillos se lavaron cinco veces con PBS-Tween 20 (Sigma) al 0,05% (v/v) y se saturaron con una solución de leche desnatada en polvo (Regilait) al 5 % (p/v) en PBS incubando a temperatura ambiente durante 1 h y 30 minutos. Tras este tiempo, los pocillos se lavaron cinco veces con PBS-Tween, se añadieron 100 µl del correspondiente MAb (**Tabla VII**) (sobrenadante del hibridoma diluido 1:2 en PBS-Tween) y se incubó a 37°C durante 1 hora. Los anticuerpos que reaccionaron frente al correspondiente antígeno fueron detectados con anticuerpos secundarios de cabra tipo IgG frente a anticuerpos de ratón, conjugados con peroxidasa de rábano (Bio Rad) (dilución 1:9000). Transcurrida 1 hora de incubación a temperatura ambiente, se realizaron cinco lavados en PBS-Tween y se reveló la actividad enzimática mediante la adición de sustrato TMB-ELISA (Interchim). La reacción se detuvo con una solución de parada basada en HCl 1M (Uptima), después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente en oscuridad. Los resultados se registraron a una longitud de onda de 450 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific) y se expresaron como la media ± D.E. (n=3) del valor de DO<sub>450</sub> obtenido para cada cepa y MAb una vez eliminado el valor registrado para el blanco (tampón de dilución).

**Tabla VII.** Anticuerpos monoclonales empleados en el estudio de la topología de la superficie de mutantes de *B. ovis*.

Especificidad <sup>a</sup>	Nombre	Subclase IgG	Abreviatura	Referencia
Anti PG	A76/03D06/A09	IgG <sub>3</sub>	A09	CloECKaert <i>et al.</i> , 1992
Anti R-LPS	A68/03F03/D05	IgG <sub>2b</sub>	D05	CloECKaert <i>et al.</i> , 1990, 1992; Zygmunt <i>et al.</i> , 1994
Anti Omp2b	A68/15B06/C08	IgG <sub>2a</sub>	C08	CloECKaert <i>et al.</i> , 1990, 1991
Anti Omp10	A68/07G11/C10	IgG <sub>2a</sub>	C10	CloECKaert <i>et al.</i> , 1990, 1991, 1992; Zygmunt <i>et al.</i> , 1994
Anti Omp16	A76/08C03/G03	IgG <sub>2a</sub>	G03	CloECKaert <i>et al.</i> , 1990; Zygmunt <i>et al.</i> , 1994
Anti Omp19	A76/18B02/D06	IgG <sub>2a</sub>	D06	CloECKaert <i>et al.</i> , 1990; Zygmunt <i>et al.</i> , 1994
Anti Omp25	A59/05F01/C09	IgG <sub>2a</sub>	C09	CloECKaert <i>et al.</i> , 1990, 1991, 1992, 1996; Zygmunt <i>et al.</i> , 1994
	A18/13D02/F05	IgG <sub>1</sub>	F05	CloECKaert <i>et al.</i> , 1990, 1991, 1992, 1996
	A76/08H09/A02	IgG <sub>3</sub>	A02	CloECKaert <i>et al.</i> , 1990, 1991, 1992, 1996
Anti BP26	V78/09/B12/B02	IgG <sub>1</sub>	B02	Seco-Mediavilla <i>et al.</i> , 1996
	V78/02E08/F03	IgG <sub>2a</sub>	F03	CloECKaert <i>et al.</i> , 1996; Seco-Mediavilla <i>et al.</i> , 1996
	V78/04D01/A10	IgG <sub>1</sub>	A10	Debbbarh <i>et al.</i> , 1996
	V78B04G07H05	IgG <sub>2a</sub>	H05	Debbbarh <i>et al.</i> , 1996
Anti Omp31	A59/10F09/G10	IgG <sub>2a</sub>	G10	CloECKaert <i>et al.</i> , 1990, 1992

<sup>a</sup> Epítomos analizados: PG (peptidoglucano); R-LPS (lipopolisacárido rugoso); Omp2b (proteína minoritaria de ME); Omp10, Omp16, Omp19 (lipoproteínas de ME); Omp25, Omp31 (proteínas mayoritarias de ME) y BP26 (proteína periplásmica).

## 9. Estudio del comportamiento en líneas celulares de cepas mutantes de *B. ovis* PA

En este trabajo se llevaron a cabo ensayos de penetración y supervivencia de cepas mutantes en dos tipos de líneas celulares fagocíticas: i) profesionales: macrófagos J774A.1 (DSMZ ACC170) provenientes de un sarcoma reticular murino (hembra BALB/c) y ii) no profesionales: células epiteliales HeLa (ATCC CCL-2™) procedentes de un adenocarcinoma cervical humano.

### 9.1. Medios y condiciones de cultivo

Las líneas celulares empleadas en este trabajo fueron cultivadas de manera rutinaria a 37°C, en atmósfera con elevada humedad y al 5% de CO<sub>2</sub>, en placas de cultivo celular individuales de 20 mm de altura 100 mm de diámetro (VWR). El medio de cultivo empleado fue el Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco-Life Technologies), suplementado con suero bovino fetal (FBS, Gibco-Life Technologies) al 10% (DMEM-FBS). Para el mantenimiento de los cultivos, las células se diluyeron en medio fresco cuando la densidad celular alcanzaba el 75 % de la placa. Para realizar los subcultivos, en primer lugar, las células se lavaron una vez con PBS, para la línea HeLa, o TEN (Tris-HCl 40 mM, EDTA-Na<sup>2+</sup> 1 mM y NaCl 150 mM, a pH 7,5) para los macrófagos. A continuación, las células se desprendieron de la placa mediante la aplicación de 1 ml una solución de tripsina-EDTA al 25% (Gibco-BRL) para las primeras (incubación durante 5 minutos a 37°C) o mediante raspado (*Cell Scrapper*, Nunc), en el caso de los macrófagos. Posteriormente, tras ser resuspendidas, se diluyeron adecuadamente en el medio de cultivo, para ser distribuidas en nuevas placas de cultivo celular. El seguimiento de los cultivos se realizó con un microscopio invertido CK2 OLYMPUS y el control de viabilidad de los mismos se llevó a cabo mediante tinción de con azul tripano (Merck) al 0,4% (p/v) en PBS y recuento en cámara Neubauer.

### 9.2. Macrófagos J774.A1

Para el análisis de la penetración y supervivencia de los mutantes en los macrófagos murinos, éstos se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en microplacas estériles de 96 pocillos (VWR), a una concentración de  $2 \times 10^4$  células/pocillo. Posteriormente, se llevó a cabo la preparación de inóculos de la cepa parental *B. ovis* PA y de los mutantes, ajustando las bacterias a  $4 \times 10^6$  UFC/pocillo. Para ello, se prepararon suspensiones con una DO<sub>600</sub> de 0,2 en PBS de cada cepa, las cuales se diluyeron a la concentración deseada en DMEM-FBS, considerando los resultados obtenidos en el estudio del crecimiento en medio sólido de cada cepa (**Apartados 1.1. y 2.1. de Resultados**). La concentración de los inóculos bacterianos se verificó de forma retrospectiva, mediante la dilución adecuada de los mismos en PBS y siembra por triplicado en placas de TSA-YE-HS.

Los macrófagos se infectaron con 100 µl de los inóculos y se incubaron durante 2 horas (tiempo de penetración) a 37°C y atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo y para eliminar las bacterias extracelulares, los macrófagos se lavaron dos veces con 300 µl medio de cultivo y se incubaron de nuevo con 300 µl de medio suplementado con gentamicina (Sigma-Aldrich) (50 µg/ml). Transcurrida una hora de incubación en presencia del antibiótico (t=0), tres pocillos de cada cepa se lavaron tres veces con 400 µl con medio de cultivo para eliminar los restos de gentamicina. A continuación, los macrófagos se lisaron mediante incubación con 200 µl agua estéril durante 20 minutos. Posteriormente, se sembraron, en placas de TSA-YE-HS, diluciones decimales en PBS de los lisados obtenidos. Las placas se incubaron a 37°C, en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> durante 7 días para realizar el recuento de bacterias intracelulares. Para los pocillos restantes, el medio de cultivo se reemplazó por medio suplementado con gentamicina a una concentración de 20 µg/ml y los recuentos de UFC intracelulares se realizaron de la manera previamente descrita, a los tiempos de 20 y 44 horas post

infección (p.i.). Los resultados se expresaron como media  $\pm$  D.E. del logaritmo de las UFC/pocillo de los tres pocillos empleados para cada cepa y tiempo de análisis.

### 9.3. Células epiteliales HeLa

Los ensayos de penetración y supervivencia de los mutantes en células HeLa fueron llevados a cabo como se describen en el apartado anterior, empleando en este caso una densidad de  $1,5 \times 10^4$  células/pocillo que fueron infectadas con  $8 \times 10^6$  UFC /pocillo de cada cepa de *B. ovis* analizada.

### 9.4. Microscopía de fluorescencia

Las líneas celulares empleadas para analizar por microscopía fueron cultivadas en placas de 24 pocillos de cultivo celular (VWR) conteniendo un cubreobjetos circular de 12 mm (Fisher). Los ensayos de infección se realizaron empleando las mismas condiciones y metodología que lo previamente descrito para los ensayos de infección de cultivos de macrófagos J774A.1 y células epiteliales HeLa. Para estos ensayos se mantuvo la misma proporción de células y bacterias que en los realizados en placas de 96 pocillos. Para ello se realizó la conversión correspondiente del número de células y bacterias, teniendo en cuenta para el cálculo la superficie del pocillo en los tipos de placas de cultivo celular. En el protocolo de inmunofluorescencia, tras la infección de las células, todas las incubaciones se llevaron a temperatura ambiente, según se describe seguidamente.

A los tiempos p.i. establecidos, se retiró el medio de cultivo con gentamicina, los cubreobjetos se pasaron a una nueva placa de 24 pocillos y tras tres lavados con 1 ml de PBS, las células se fijaron durante 10 minutos con 300  $\mu$ l de paraformaldehído al 5 % (p/v) en PBS (Fisher). Posteriormente, se realizaron otros tres lavados con PBS en frío y las células se permeabilizaron con saponina al 0,5 % (p/v) en PBS durante 10 minutos. Se eliminó el exceso de saponina lavando con PBS en las mismas condiciones y se saturó con 500  $\mu$ l de HS (Gibco-BRL) al 10% (v/v) durante 30 minutos. A continuación, se incubó 1 hora con los anticuerpos primarios correspondientes diluidos en HS al 5% (v/v) en PBS. Los anticuerpos empleados fueron IgG de conejo con especificidad frente a la proteína a la proteína 1 asociada a la membrana de lisosomas (Lamp-1) (*rabbit IgG anti-LAMP1*, Sigma) (dilución 1:200). También se empleó como anticuerpo primario, el MAb A68/03F03/D05 (IgG de ratón) específico frente al R-LPS de *Brucella* (dilución 1:5000) (Cloeckert *et al.*, 1990). Tras ese tiempo, los pocillos se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios diluidos 1:500 en HS al 5% durante 1 hora. Los anticuerpos secundarios tipo IgG conjugados con fluoróforo empleados fueron: de cabra frente IgG de conejo (rojo) (*Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor® 594*, Invitrogen) y de cabra frente a IgG de ratón (verde) (*Goat anti-mouse Alexa Fluor® 488*, Invitrogen). Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados con PBS y se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos utilizando *ProLong® Diamond Antifade Mountant with DAPI* como protector de la fluorescencia.

Las imágenes han sido adquiridas empleando un Microscopio Confocal mediante escaneo por láser modelo TCS SP5, fabricado por la empresa Leica Microsystems CMS GmbH. Para la adquisición y posterior tratamiento de las imágenes se ha empleado el software LAS AF.

## 10. Estudios *in vivo* en modelo murino

### 10.1. Procedimientos generales de experimentación animal

Los ensayos que se llevaron a cabo con las diferentes cepas de *Brucella* en modelo animal fueron diseñados de acuerdo con la normativa nacional y europea referente al uso de animales para experimentación y otros fines científicos (RD 53/2013 y UE 2010/63). En los procedimientos de experimentación animal se emplearon ratones hembra de la raza BALB/c (Charles River, Francia) de 6-7 semanas de vida, que fueron adquiridos con una semana de antelación al inicio de los experimentos. Los animales fueron acomodados en las instalaciones del

Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca (n° de registro PAE SA-001) y distribuidos en jaulas adecuadas, con agua y alimento *ad libitum*.

Las inoculaciones se llevaron a cabo por vía intraperitoneal (IP), en un volumen de 0,2 ml y utilizando como vehículo PBS. Las preparaciones de los inóculos se realizaron partiendo de cultivos en placa de cada cepa, tras 44 horas de incubación, y realizando suspensiones bacterianas que se ajustaron a una DO<sub>600</sub> de 0,2. Estas suspensiones se diluyeron adecuadamente en PBS estéril hasta la dosis deseada. La determinación de las dosis exactas inoculadas se realizó de forma retrospectiva, mediante siembra, por triplicado, de 100 µl de una dilución adecuada con la que esperar entre 30-300 UFC en placas de TSA-YE-HS.

La extracción de muestras de sangre se realizó mediante punción del seno venoso submandibular y los bazo de los animales se extrajeron en una cabina de seguridad biológica. Cada órgano se pesó y homogenizó individualmente en una bolsa de *Stomacher*® 80 *BIOMASTER* (Seward), con un volumen de PBS 9 veces el peso del bazo (dilución 1:10 (p/v)). A partir de esa dilución inicial, se realizaron diluciones decimales y se sembraron por triplicado de 100 µl de cada una de ellas en placas de TSA-YE-HS. Tras su incubación a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>, se seleccionaron las placas con 30-300 UFC. La identidad de los aislamientos del bazo se confirmó en cada intervalo analizado, mediante análisis por PCR de los aislados. Los resultados se expresaron como media ± D.E. del log UFC/bazo de los animales analizados en cada grupo y tiempo de muestreo.

## 10.2. Análisis de la virulencia

Dentro del estudio de la implicación en la virulencia de *B. ovis* PA de los genes *bepC* y *ugpB*, se realizó un análisis de la capacidad de colonización esplénica de los mutantes  $\Delta b e p C$  y  $\Delta u g p B$  a las semanas 3 y 7 posteriores a la inoculación de los ratones con una dosis de  $2 \times 10^5$  UFC/ratón ( $n=5$ ). Para el análisis preliminar de la virulencia del panel de mutantes de *B. ovis* PA obtenidos, se evaluó su colonización esplénica a las semanas 3 y 7 posteriores a la inoculación de los ratones ( $n=2$ ) con una dosis de  $10^6$  UFC/ratón en base a estudios previos realizados con mutantes en genes de proteínas mayoritarias de la ME de *B. ovis* PA (Caro-Hernández *et al.*, 2007).

La preparación de los inóculos bacterianos y la determinación de las dosis exactas inoculadas se realizó como se describe en el **Apartado 10.1**. Como control se empleó la cepa parental virulenta *B. ovis* PA, inoculada en las mismas condiciones que las cepas a evaluar. A las semanas 3 y 7 p.i., se determinó el número de bacterias viables (UFC/bazo) de 5 o 2 animales por cada grupo de muestreo (en función del experimento). Los niveles de infección esplénica se expresaron como la media ± D.E. ( $n=5$  o 2) del log UFC/bazo obtenido en cada grupo de animales y tiempo analizado.

## 10.3. Evaluación de la utilidad de los mutantes $\Delta o m p 3 1 \Delta c g s$ , $\Delta o m p 1 0 \Delta o m p 3 1 \Delta o m p 2 5 c$ y $\Delta o m p 1 0 \Delta u g p B \Delta o m p 3 1$ de *B. ovis* PA como vacunas vivas atenuadas

### 10.3.1. Persistencia

La colonización esplénica y persistencia *in vivo* de las cepas mutantes se evaluó mediante la determinación del número de bacterias viables en el bazo de los animales a las semanas 1, 3, 5, 7 y 11 p.i. Para ello, las cepas se inocularon por vía IP a una dosis de  $1 \times 10^8$  UFC/ratón, dosis habitualmente empleada para el estudio de las cepas atenuadas como vacunas (Sancho *et al.*, 2014) en un volumen de 0,2 ml y empleando como control la cepa parental *B. ovis* PA inoculada en las mismas condiciones y un grupo no inmunizado inoculado con PBS. Para llevarlo a cabo, se prepararon las suspensiones de cada cepa a evaluar y se determinaron las dosis exactas como se describe en el **Apartado 10.1**. En cada tiempo de muestreo se determinaron recuentos de UFC/bazo y se tomaron muestras de sangre para evaluar los niveles de anticuerpos en suero (**Apartado 10.3.2.**) de cinco animales por grupo a analizar. Los niveles de infección esplénica se expresaron como la media ± D.E.

( $n=5$ ) de los log UFC/bazo obtenidos en cada grupo de animales y tiempo analizado. Para cada grupo experimental también se calculó la media  $\pm$  D.E. ( $n=5$ ) del peso del bazo (gramos).

### 10.3.2. Evolución de los anticuerpos IgG frente a *B. ovis* PA en suero

Las muestras de sangre tomadas se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 8 horas. Una vez producida la coagulación, se centrifugaron a  $1000 \times g$  durante 5 minutos y se recogió el suero resultante. Los niveles totales de anticuerpos séricos de la clase IgG capaces de reaccionar con células enteras de *B. ovis* PA se analizaron mediante i-ELISA (Vizcaíno *et al.*, 2001). Adicionalmente, en los animales inoculados con el triple mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  empleados en el análisis de la respuesta inmune celular *in vitro* (**Apartado 10.3.3**), se analizaron también las subclases de anticuerpos IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> e IgG<sub>2b</sub>. Para ello, se realizaron diluciones seriadas de los sueros de los ratones y se incubaron con células enteras de *B. ovis* PA, inactivadas por calor y fijadas a placas de ELISA (100  $\mu$ l de una suspensión en PBS a una DO<sub>600</sub> de 1). La reacción antígeno-anticuerpo se detectó con anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón (*Anti-mouse IgG (Fc-specific)-Peroxidase*, Sigma-Aldrich), para el análisis de los niveles totales de IgG, o anti-IgG<sub>1</sub>, anti-IgG<sub>2a</sub> y anti-IgG<sub>2b</sub> (*Goat-Antimouse anti-IgG<sub>1</sub>, anti-IgG<sub>2a</sub>, anti-IgG<sub>2b</sub> -HRP*, Santa Cruz Biotechnology), conjugados con peroxidasa diluidos 1:4000 y una solución de ABTS como sustrato para la peroxidasa. Los resultados se expresaron como el logaritmo del título de anticuerpos, considerando el título como el inverso de aquella dilución donde el valor de absorbancia a 405 nm ( $A_{405nm}$ ) registrado fue el doble que el registrado en el control negativo (tampón de dilución).

### 10.3.3. Detección de citocinas producidas por esplenocitos murinos en una segunda estimulación *ex vivo* con *B. ovis* PA

Este estudio se llevó a cabo con 3 grupos de ratones ( $n=5$ ) que fueron inmunizados con una dosis de  $1 \times 10^8$  UFC/ratón del mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  de *B. ovis* PA, una dosis de  $1 \times 10^5$  UFC/ratón de la cepa vacunal de referencia *B. melitensis* Rev1 o con PBS (grupo control negativo no inmunizado). Todas las inoculaciones se realizaron en un volumen de 0,2 ml por vía IP. Transcurridas 7 semanas desde de la inmunización, momento que coincide con la realización de la infección experimental en la evaluación de la eficacia protectora a medio plazo (**Apartado 10.3.4**), se llevó a cabo la obtención de un cultivo primario de esplenocitos de cada uno de los ratones que forman parte del experimento (Fernández-Lago *et al.*, 2005). Para ello, cada bazo se homogenizó en 5 ml de medio DMEM (Gibco). A continuación, los homogenizados se centrifugaron durante 5 minutos a  $400 \times g$  y el sedimento obtenido se resuspendió en 10 ml de tampón de lisis de eritrocitos (cloruro de amonio 154 mM, bicarbonato potásico 10 mM y EDTA Na<sup>2+</sup> 0,082 mM), manteniéndolo en hielo durante 5 minutos. Posteriormente, se lavó dos veces con 10 ml de medio completo (RPMI 1640, SBF al 10%, L-glutamina 4 mM, piruvato Sódico 1 mM, 2-mercaptoetanol 0,05 mM, Gibco). Tras el último lavado, las células se resuspendieron en 1 ml de medio completo suplementado con 100  $\mu$ g/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich). Se determinó la viabilidad de las células mediante tinción con azul de tripano (Merck) al 0,4% (p/v) en PBS y se resuspendieron en medio completo con gentamicina para obtener una concentración de  $4 \times 10^5$  células/ml.

Los esplenocitos de cada bazo fueron distribuidos en 6 pocillos en placas de cultivo celular Nunc de 24 pocillos, a una densidad de  $4 \times 10^5$  células/pocillo. Seguidamente, las células se estimularon *in vitro*, por duplicado, con *B. ovis* PA ( $1 \times 10^8$  UFC/pocillo, inactivadas a 65°C durante 50 minutos), Concanavalina A (10  $\mu$ g/pocillo) o con medio completo. Posteriormente, las placas se incubaron durante 72 horas a 37°C, en atmósfera húmeda y en presencia del 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo de incubación, los sobrenadantes de cada pocillo se recogieron, tras centrifugar a  $1400 \times g$  durante 5 minutos el contenido de cada uno, y se conservaron a -80°C hasta el momento de analizar la producción de IL2, IL4, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL10 e IL12p40.

La detección de las citocinas se realizó mediante la técnica de ELISA en sándwich comerciales BD OptEIA™: Set Mouse IL2, Set Mouse IL4, Mouse TNF ELISA Set II, Set Mouse IFN $\gamma$  (AN-18), Set Mouse IL10 y Set Mouse IL12 (p40), siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante. El límite de detección de la técnica para cada citocina fue de: 3,1 pg/ml de IL2, 7,8 pg/ml de IL4, 31,3 pg/ml de IL 10, 15,6 pg/ml de IL-12p40 y 3,1 pg/ml de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ .

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  D.E. ( $n=5$ ) de los ng de citocina por pocillo (1 ml de sobrenadante).

#### **10.3.4. Protección frente a una infección experimental por *B. ovis***

En los ensayos de protección se establecieron dos grupos de ratones: i) grupo inmunizado con el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  de *B. ovis* PA ( $1 \times 10^8$  UFC/ratón,  $n=15$ ) y ii) no inmunizado, inoculado con PBS (grupo control negativo,  $n=15$ ). Todas las inmunizaciones se realizaron por vía IP en un volumen de 0,2 ml y las dosis exactas se calcularon retrospectivamente, mediante siembra por triplicado de 100  $\mu$ l en TSA-YE-HS de los inóculos diluidos adecuadamente para la obtención de un número de 30-300 UFC/placa. La infección experimental de los ratones inmunizados se realizó, bien a la semana 7 o bien a la semana 11 post inmunización, con  $2 \times 10^5$  UFC/ratón de la cepa virulenta *B. ovis* PA (0,2 ml/ratón en PBS). La dosis infectiva exacta se determinó de la manera descrita en el **Apartado 10.1**. Como control de vacuna eficaz se usó un grupo de cinco ratones inmunizados con Rev1 ( $1 \times 10^5$  UFC/ratón) e infectados a la semana 7 post vacunación.

Los recuentos de UFC/bazo de *B. ovis* PA en los animales inmunizados se realizaron 3 semanas después de la correspondiente infección experimental. La diferenciación de la cepa infectiva y las cepas vacunales residuales, en el caso de obtenerse recuentos, se llevó a cabo de diferente modo en función de la cepa vacunal empleada. Así, el recuento de las UFC/bazo de *B. ovis* PA, en los animales inmunizados con la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1, cepa resistente a estreptomicina, se realizó mediante el cálculo de la diferencia entre las UFC/placa crecidas en medio TSA-YE-HS (crecimiento de cepa vacunal e infectiva) y las obtenidas en el mismo medio suplementado con estreptomicina (crecimiento de la cepa vacunal Rev1). La diferenciación para el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  se llevó a cabo mediante amplificación por PCR de las regiones de los genes inactivados. Los cebadores empleados se encuentran descritos en el **Apartado 5**.

Los resultados del experimento de protección se expresaron como la media  $\pm$  D.E. ( $n=5$ ) del log UFC/bazo de *B. ovis* PA.

### **11. Métodos estadísticos empleados**

Las comparaciones estadísticas entre diferentes grupos se llevaron a cabo mediante el test de mínimas diferencias protegidas de Fisher (PLSD) (Statview), considerándose significativas aquellas diferencias que presentaron valores de  $p \leq 0,05$ .

# **Resultados**



## 1. Construcción, caracterización y evaluación de la virulencia de los mutantes de *B. ovis* PA en los genes *bepC* y *ugpB*

Uno de los objetivos del presente trabajo ha sido el de evaluar la implicación en la virulencia de *B. ovis* PA del gen *bepC*, que codifica una proteína homóloga a TolC, y del gen *ugpB*, correspondiente a la proteína SP41, descrita como adhesina en *B. suis*. Ambas proteínas se han asociado con la virulencia de *B. suis* 1330, *in vitro* y/o *in vivo* (Posadas *et al.*, 2007; Castañeda-Roldán *et al.*, 2006). Para abordar este objetivo, se llevó a cabo la construcción de mutantes simples de *B. ovis* PA en ambos genes que se evaluaron mediante una serie de ensayos, cuyos resultados se recogen a continuación.

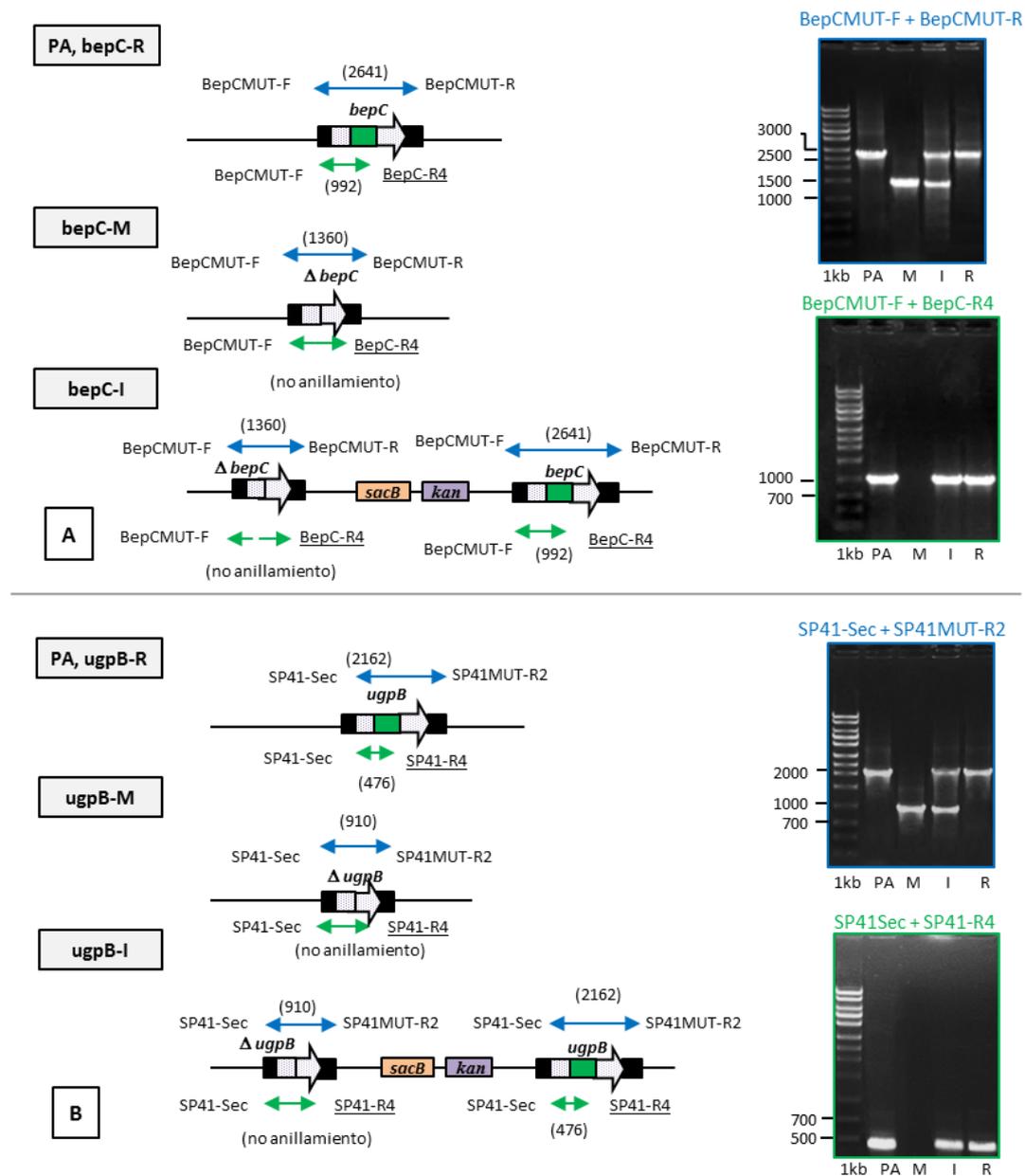
### 1.1. Obtención de los mutantes $\Delta bepC$ y $\Delta ugpB$ .

La metodología empleada en la construcción y obtención de mutantes de *B. ovis* PA se detalla en el **Apartado 4** de Materiales y Métodos. Como resultado de la electroporación de *B. ovis* PA con los plásmidos recombinantes pNVBepCOVL02 y pNVSP41OVL02, se obtuvieron cepas con los plásmidos integrados en el cromosoma bacteriano (entrecruzamiento simple). Los clones resultantes (**Tabla VI**), son portadores de una copia mutada y una copia silvestre del gen *bepC* (cepa bepC-I) y *ugpB* (cepa ugpB-I). Además, son resistentes a kanamicina ( $Kan^r$ ) y sensibles a sacarosa ( $Sac^s$ ). Tras cultivar las cepas obtenidas en medio suplementado con sacarosa, se seleccionaron las bacterias que habían experimentado un segundo entrecruzamiento simple conducente a la pérdida del plásmido pCVD-KanD (portador de los genes *sacB* y  $kan^r$ ). Como resultado se obtuvieron la cepa mutante (abreviada como “gen”-M) y la revertiente al genotipo silvestre (“gen”-R) en cada caso.

El genotipo de cada una de las cepas obtenidas se confirmó, inicialmente, mediante la amplificación por PCR de los loci correspondientes. Para ello se realizaron dos reacciones (**Apartado 5** de Materiales y Métodos): una empleando dos cebadores externos al gen de interés (BepCMUT-F+BepCMUT-R / SP41Sec+SP41MUT-R2) y otra reacción con uno de los cebadores externos (**Tabla III**) y otro interno a la región a eliminar (**Tabla IV**) (BepCMUT-F+BepC-R4 / SP41Sec+SP41-R4). Los resultados de las electroforesis de los productos de PCR obtenidos en la verificación de las cepas mutantes  $\Delta bepC$  y  $\Delta ugpB$  (abreviadas como M), cepas con el plásmido integrado en el cromosoma (I) y cepas revertientes (R) correspondientes, junto con la cepa parental *B. ovis* PA (PA), se recogen en la **Figura 10**.

Para cada uno de los genes implicados en el proceso de mutación se obtuvieron los resultados esperados tomando como referencia el genoma publicado de *B. ovis* 63/290 (ATCC25840; nº acceso al cromosoma I y II, respectivamente: NC\_009505 y NC\_009504). Así, en la reacción de PCR con cebadores externos, representada en la **Figura 10**, las cepas revertientes mostraron una banda amplificada del mismo tamaño que la cepa parental, las cepas mutantes una banda de tamaño inferior y las cepas con el plásmido integrado, las dos bandas correspondientes al gen entero y al gen inactivado. Además, según lo esperado, en la reacción con un cebador externo a la región delecionada y un cebador interno, no se obtuvo amplificación en las cepas mutantes (imposibilidad de anillamiento del cebador interno al gen inactivado), pero sí en las cepas revertientes, en las cepas con el plásmido integrado y en la cepa parental (reacción de PCR representada por color verde en la **Figura 10**).

Respecto al gen *bepC* (**Figura 10A**), empleando los cebadores externos BepCMUT-F y BepCMUT-R se observó, según lo esperado, una única banda de 2641 pb en la cepa parental *B. ovis* PA y en la cepa bepC-R (**Figura 10A**, gel azul, carriles PA y M). En el mutante  $\Delta bepC$  se observó una banda de 1360 pb y en la cepa con el plásmido integrado, un perfil de doble banda, una de 2641 pb y otra de 992 pb (**Figura 10A**, gel azul, carriles M e I). Tras la amplificación de las cepas con los cebadores BepCMUT-F+BepC-R4 (externo+interno), según lo esperado, se observó la ausencia de banda en el mutante (**Figura 10A**, gel verde, carril M) y en el resto de cepas, un perfil de banda único de tamaño 992 pb.



**Figura 10. Verificación genotípica de *B. ovis*-pNVBepCOVL02-M ( $\Delta bepC$ ) y *B. ovis*-pNVSP41OVL02-M ( $\Delta ugpB$ ) mediante PCR.** Esquema del genotipo relativo al gen *bepC* (A) y al gen *ugpB* (B) que presentan la cepa parental (PA), las cepas mutantes *bepC*-M y *ugpB*-M (M), las cepas con el plásmido integrado *bepC*-I y *ugpB*-I (I) y las cepas revertientes *bepC*-R y *ugpB*-R (R). **A.** Resultados obtenidos en la amplificación por PCR del locus *bepC* en las cepas PA, M, I y R con dos parejas de cebadores: BepCMUT-F + BepCMUT-R (flechas y letras azules) y BepCMUT-F + BepC-R4 (flechas y letras verdes) (subrayado el cebador interno a la zona delecionada del gen *bepC*). **B.** Resultados obtenidos en la amplificación por PCR del locus *ugpB* en las cepas PA, M, I y R con dos parejas de cebadores: SP41Sec y SP41MUT-R2 (flechas y letras azules) y SP41Sec + SP41-R4 (flechas y letras verdes) (subrayado cebador interno de la zona delecionada del gen *ugpB*). Los carriles 1kb corresponden al patrón de ADN *ExACTgene* 1 kb de Fisher.

En el caso del gen *ugpB* (**Figura 10B**), empleando los cebadores externos SP41Sec y SP41MUT-R2 se observó un perfil de banda única de 2162 pb en las cepas PA y *ugpB*-R (**Figura 10B**, gel azul, carriles PA y M). En el mutante  $\Delta$ *ugpB* se observó una banda de 910 pb y en la cepa con el plásmido integrado, dos bandas, una de 2162 y otra de 910 pb (**Figura 10B**, gel azul, carriles M e I). Tras la amplificación de las cepas con los cebadores SP41Sec y SP41-R4 (externo+interno) se observó la ausencia de banda en el mutante (**Figura 10B**, gel verde, carril M) y un perfil de una banda de 476 pb en los carriles del resto de cepas. Estos resultados coinciden con lo esperado para el genotipo de cada una de las cepas.

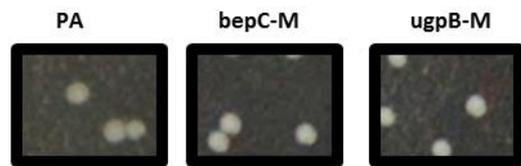
La correcta delección de los genes *bepC* y *ugpB* se confirmó mediante la secuenciación de las regiones implicadas en los procesos de recombinación. Para ello, se realizaron reacciones de PCR con los cebadores BepC-F2+BepC-R2, para el gen *bepC*, y SP41-F2+SP41-R2, para el gen *ugpB* (**Tabla IV**). La secuenciación de las regiones cromosómicas amplificadas proporcionó los resultados esperados, no observándose modificaciones no deseadas en la secuencia nucleotídica (datos no mostrados).

Para evaluar el crecimiento en medio sólido que presentaba cada una de las cepas mutantes. Para ello, se realizaron recuentos de UFC/ml en placas de TSA-YE-HS, a partir de suspensiones bacterianas de DO<sub>600</sub> 0,2 (**Apartado 6** de Materiales y Métodos). No se observaron diferencias en el crecimiento de los mutantes  $\Delta$ *bepC* y  $\Delta$ *ugpB*, cuyos recuentos de UFC/ml (**Tabla VIII**) y tamaño de colonia tras 6 días de incubación (**Figura 11**) fueron similares a los obtenidos en la cepa parental *B. ovis* PA.

**Tabla VIII.** Recuentos de UFC/ml de una suspensión en PBS de DO<sub>600</sub> 0,2 de *B. ovis* PA y los mutantes  $\Delta$ *bepC* y  $\Delta$ *ugpB* obtenidos en este trabajo.

Cepas	Log UFC/ml media $\pm$ D.E.(n=3)
PA	9,09 $\pm$ 0,04
<i>bepC</i> -M	9,10 $\pm$ 0,05
<i>ugpB</i> -M	9,11 $\pm$ 0,04

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre cepas (test PLSD).



**Figura 11.** Colonias de *B. ovis* PA y de los mutantes  $\Delta$ *bepC* y  $\Delta$ *ugpB* derivados. Se muestran las colonias obtenidas en medio TSA-YE-HS tras 6 días de incubación a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

## 1.2. Estudio de las propiedades de la membrana externa de los mutantes $\Delta$ *bepC* y $\Delta$ *ugpB*

Con el fin de comprobar si la inactivación de los genes *bepC* y *ugpB* causaba alteraciones en la ME de las cepas mutantes que pudieran repercutir en la virulencia de la bacteria, se llevaron a cabo una serie de ensayos que permiten evaluar propiedades relacionadas con la ME.

### 1.2.1. Capacidad de autoaglutinación

La capacidad de autoaglutinación es una característica de algunas cepas de *Brucella*, cuyas células, cuando están suspendidas en medio líquido, se unen entre sí y tienden a aglutinar en el fondo del tubo de ensayo. En este experimento (**Apartado 7.1.** de Materiales y Métodos) se emplearon suspensiones bacterianas con una DO<sub>600</sub> inicial de 0,8 (considerada como el 100% de DO<sub>600</sub> para cada cepa) y se fueron analizando las variaciones que sufría este valor a lo largo del tiempo en incubación estática de las suspensiones.

Tanto el mutante  $\Delta$ *bepC*, como el  $\Delta$ *ugpB* mostraron un comportamiento similar al observado con la cepa parental manteniéndose las células en suspensión hasta el final del experimento (48 horas) (**Figura 12**).

### 1.2.2. Evaluación de la sensibilidad a compuestos antimicrobianos

La ME de *Brucella* presenta una peculiar composición química que confiere a la bacteria una serie de propiedades protectoras tanto frente a mecanismos bactericidas que tienen lugar dentro de las células fagocíticas, como frente a mecanismos extracelulares. Además, la ME posee una elevada hidrofobicidad (Moriyón & López-Goñi., 1998) que la hace permeable y por tanto, susceptible a compuestos hidrofóbicos a los que normalmente son impermeables otras bacterias Gram negativas que poseen sistemas implicados en su expulsión (Martínez de Tejada & Moriyón., 1993; Velasco *et al.*, 2000). La presencia y/o eficiencia de los sistemas de transporte de compuestos tóxicos en *B. ovis* está levemente explorada en comparación con los estudios en especies lisas. En este contexto, por un lado, se quiso evaluar si resistencia al efecto bactericida de ciertos compuestos, como modelo de agentes relacionados con los mecanismos de defensa del hospedador a los que *Brucella* es naturalmente resistente, se veía alterada tras la inactivación de los genes *bepC* y *ugpB*. Por otro lado, se analizó la sensibilidad de ambos mutantes de *B. ovis* a un conjunto de tóxicos en base a estudios de sensibilidad realizados con el mutante  $\Delta bepC$  1330 que presenta una mayor sensibilidad a estas moléculas que la correspondiente cepa parental (Posadas *et al.*, 2007).

Debido a que *Brucella* es menos sensible que otras bacterias Gram negativas a gran variedad de péptidos catiónicos, así como al sistema del complemento y posee mecanismos que le ayudan a protegerse de los intermediarios de oxígeno producidos en la explosión oxidativa en los macrófagos, se determinaron las tasas de supervivencia que presentaban las cepas tras ser expuestas durante 80 minutos a suero no inmune, polimixina B (1 mg/ml) y desoxicolato sódico (0,1 mg/ml). También se determinó la sensibilidad al peróxido de hidrógeno (30%), dodecilsulfato sódico (10 mg/ml), bromuro de etidio (5 mg/ml), cristal violeta y acriflavina (2 mg/ml), ampicilina (1 mg/ml) y kanamicina (0,1 mg/ml), mediante la medida del diámetro del halo de inhibición (**Apartados 7.2.- 7.5.** de Materiales y Métodos).

Como puede observarse en la **Tabla IX**, *B. ovis* PA mostró un porcentaje de supervivencia a la exposición a polimixina B del  $71,25 \pm 5,30$  % y al desoxicolato sódico del  $84,89 \pm 9,52$  %. Los mutantes  $\Delta bepC$ ,  $\Delta ugpB$  se comportaron de manera similar, sin diferencias significativas tras la exposición a dichos compuestos. Así mismo, no se observaron diferencias en la sensibilidad a suero humano no inmune por parte de las cepas. Respecto a los ensayos realizados con discos de difusión, tampoco se observaron diferencias significativas entre las cepas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bromuro de etidio, cristal violeta, acriflavina, ampicilina o kanamicina. Sin embargo, se observó un leve aumento en el diámetro del halo de inhibición, en comparación con *B. ovis* PA, en el mutante  $\Delta bepC$  en la exposición a SDS.

### 1.2.3. Topología de la superficie de los mutantes $\Delta bepC$ y $\Delta ugpB$

Como parte de la caracterización de los mutantes  $\Delta bepC$  y  $\Delta ugpB$  de *B. ovis* PA, y como medio de comprobar las posibles modificaciones de la ME, se analizaron diferentes epítomos de la envoltura bacteriana, mediante i-ELISA con anticuerpos monoclonales (MAbs). Para ello, se empleó un panel de MAbs frente a OMPs, a la proteína periplásmica BP26, a R-LPS y a PG, al que se expusieron ambas cepas mutantes (representados en barras de colores) y *B. ovis* PA (barras negras) (**Apartado 8** de Materiales y Métodos).

En este análisis no se observaron diferencias entre el perfil de reactividad de la cepa parental y el de los mutantes  $\Delta bepC$  y  $\Delta ugpB$  para los diferentes epítomos analizados (**Figura 13**). Tanto en *B. ovis* PA como en ambos mutantes, se observaron valores de DO<sub>450</sub> de entre 1-2 para el MAb A09 (anti PG) y el MAb B02 (anti BP26), y valores más elevados (DO<sub>450</sub> aproximadamente de 4) para los MAbs G10 (anti Omp31) y D05 (anti R-LPS).

Tabla IX. Sensibilidad a diferentes agentes de los mutantes  $\Delta bepC$ ,  $\Delta ugpB$  y revertientes de *B. ovis* PA.

Cepas de <i>B. ovis</i>	% de supervivencia a la exposición a			Diámetro del halo de inhibición (cm)						
	polimixina B (1 mg/ml)	desoxicolato (0,1 mg/ml)	suero humano NI <sup>a</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	SDS (10 mg/ml)	BrEt (5 mg/ml)	CV (2 mg/ml)	Acriflavina (2 mg/ml)	Amp (1 mg/ml)	Kan (0,1 mg/ml)
<i>B. ovis</i> PA	71,25 ± 5,30	84,89 ± 9,52	87,11 ± 5,21	4,96 ± 0,09	2,15 ± 0,04	2,63 ± 0,22	2,93 ± 0,17	2,85 ± 0,13	2,60 ± 0,09	2,70 ± 0,12
bepC-M	77,61 ± 2,96	87,38 ± 1,41	84,62 ± 1,41	4,90 ± 0,07	2,39 ± 0,06 <sup>c</sup>	2,88 ± 0,19	2,68 ± 0,05	2,85 ± 0,13	2,64 ± 0,09	2,55 ± 0,06
bepC-R	ND	ND	ND	ND	2,21 ± 0,04	ND	ND	ND	ND	ND
ugpB-M	78,65 ± 11,06	93,97 ± 3,42	75,97 ± 11,58	4,92 ± 0,04	2,13 ± 0,13	2,43 ± 0,22	2,88 ± 0,13	2,68 ± 0,25	2,74 ± 0,08	2,55 ± 0,10
ugpB-R	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Se muestran los porcentajes de supervivencia de cada cepa tras su exposición a polimixina B y desoxicolato sódico durante 80 minutos y a suero humano no inmune<sup>a</sup> (4 horas). El valor 100 % de supervivencia se calculó en cada cepa a partir de las UFC/placa obtenido en incubaciones llevadas a cabo paralelamente en PBS sin agente. Así mismo, se recoge la media del diámetro del halo de inhibición producido por acción de diversos agentes: peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dodecilsulfato sódico (SDS), bromuro de etidio (BrEt), cristal violeta (CV), ampicilina (Amp) y kanamicina (Kan). Simbología: <sup>c</sup> P<0,01, indican diferencias estadísticamente significativas entre el mutante y *B. ovis* PA. Las cepas revertientes (R) no mostraron diferencias significativas con la cepa parental. ND: No determinado. Los datos muestran la media ± DE de tres ensayos independientes realizados en las mismas condiciones.

Figura 12. Autoaglutinación en medio líquido de los mutantes  $\Delta bepC$  y  $\Delta ugpB$  de *B. ovis* PA obtenidos en este trabajo. Se muestra el seguimiento de la DO<sub>600</sub> de suspensiones bacterianas estáticas en TSB-YE-HIS a lo largo de 48 horas, con valores iniciales de 0,8 (100% DO<sub>600</sub>) para cada una de ellas. Se representan la media ± DE de tres ensayos independientes en las mismas condiciones.

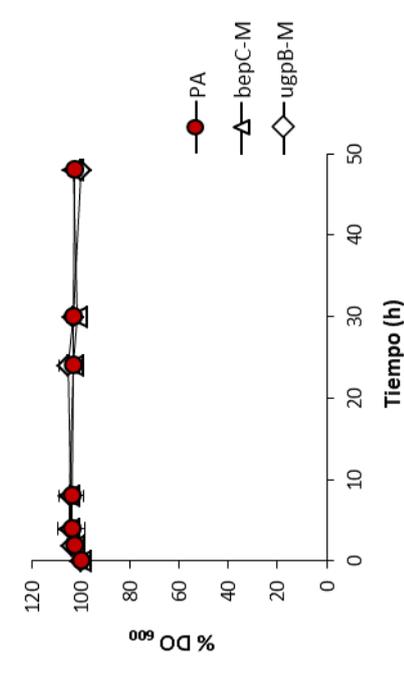
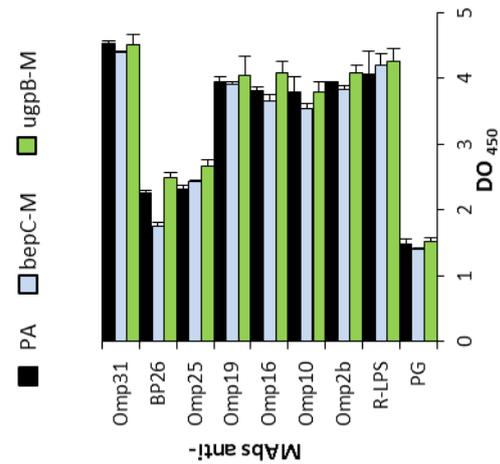


Figura 13. Topología de la superficie bacteriana de los mutantes  $\Delta bepC$  y  $\Delta ugpB$  obtenidos en este trabajo mediante HELISA con MAbis frente a distintas Omps, proteína periplásmica BP26, lipopolisacárido rugoso (R-LPS) y peptidoglicano (PG). Se representa la reactividad de cada MAb con células inactivadas y sonicates de *B. ovis* PA (negro) y de los mutantes bepC-M (azul) y ugpB-M (verde). Los resultados se expresan como la media de la DO<sub>450</sub> ± DE de tres pocillos, tras eliminar el valor del blanco (tanpón de dilución). En la Tabla VII y en la parte superior de la Figura 22 se recoge el nombre del MAb utilizado para cada epítipo.

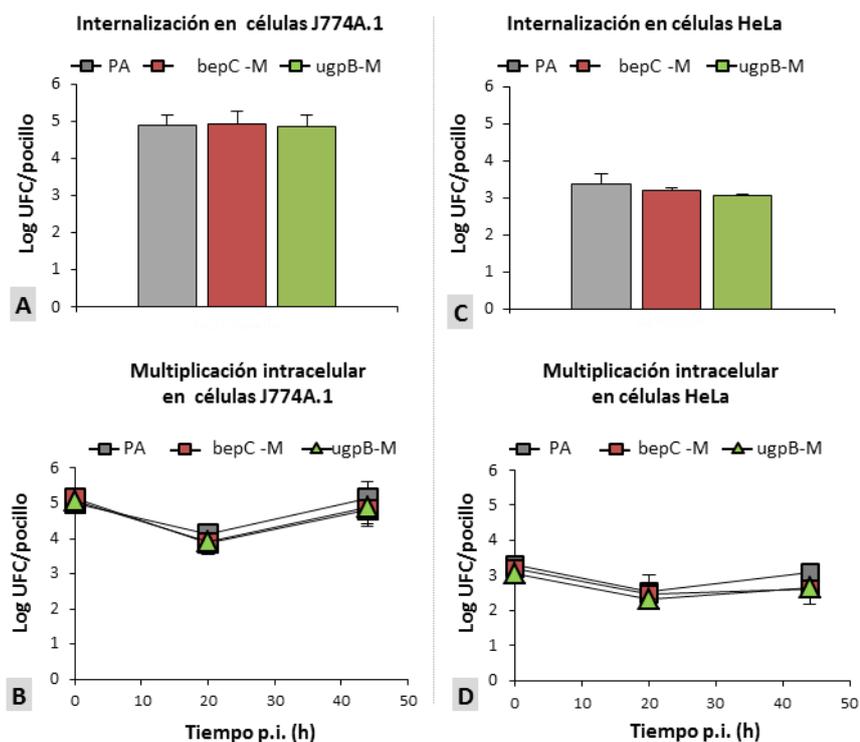


### 1.3. Ensayos de virulencia en modelos celulares de infección de los mutantes $\Delta bepC$ y $\Delta ugpB$

Se realizaron ensayos de infección *in vitro* de células fagocíticas profesionales (macrófagos murinos J774A.1) y no profesionales (células epiteliales humanas HeLa) con los mutantes  $\Delta bepC$  y  $\Delta ugpB$  de *B. ovis* PA para evaluar su capacidad de infección, supervivencia y multiplicación intracelular, debido a que estudios realizados con los correspondientes mutantes de *B. suis* mostraron una atenuación en su virulencia *in vitro* y/o *in vivo* (Castañeda-Roldán *et al.*, 2006; Posadas *et al.*, 2007). Los ensayos se realizaron empleando las condiciones experimentales que se recogen en el **Apartado 9** de Materiales y Métodos, inoculando los cultivos de macrófagos murinos J774.A1 y de células epiteliales HeLa a una densidad de  $2 \times 10^4$  células y  $1,5 \times 10^4$  células por pocillo, respectivamente. Las células se infectaron con  $4 \times 10^6$  UFC y  $8 \times 10^6$  UFC por pocillo de las distintas cepas bacterianas, respectivamente. Los resultados expuestos a continuación son representativos de tres ensayos repetidos en las mismas condiciones, en los que se obtuvieron resultados similares.

Al analizar la capacidad de internalización de cada mutante en macrófagos murinos (**Figura 14A**) se observó que la cepa parental *B. ovis* PA alcanzó niveles de UFC de aproximadamente 5 Log en el primer tiempo de muestreo (**Figura 14B**). A continuación, sus niveles intracelulares disminuyeron en un orden de 1,5 Log UFC a las 20 horas p.i., consiguiendo a partir de ahí multiplicarse hasta alcanzar a las 44 horas p.i. niveles de infección muy similares a los mostrados al inicio. Se observaron resultados muy similares en los mutantes  $\Delta bepC$  y  $\Delta ugpB$ , los cuales no mostraron diferencias significativas con la cepa parental en su perfil de multiplicación intracelular en macrófagos.

En células HeLa (**Figura 14C**) se observó una menor penetración de *B. ovis* PA y ninguna diferencia entre los mutantes y la cepa parental en su capacidad de internalización con unos niveles intracelulares de UFC del orden de 3,5 Log, muy similares a los observados en ambos mutantes. También a partir de este momento, tanto la cepa parental como los mutantes mostraron un un perfil de infección en células HeLa muy similar, con un descenso pequeño de UFC a las 20 horas p.i. y un ligero incremento en los recuentos hasta el final del experimento a 44 h p.i. (**Figura 14D**).



**Figura 14.** Análisis de la internalización (A y C) y (B-D) cinética de multiplicación intracelular en macrófagos murinos J774A.1 y células HeLa de *B. ovis* PA y los mutantes  $\Delta bepC$  y  $\Delta ugpB$  obtenidos en este trabajo. Los cultivos confluentes de macrófagos murinos J774A.1 ( $2 \times 10^4$  células/pocillo) o células HeLa ( $1,5 \times 10^4$  células/pocillo) se incubaron durante 2 horas con suspensiones de *B. ovis* PA y los mutantes  $\Delta bepC$  (rojo) y  $\Delta ugpB$  (verde) ( $4 \times 10^6$  UFC en macrófagos o  $8 \times 10^6$  UFC/pocillo en células HeLa). A. Transcurrido el tiempo de penetración, las células se incubaron 1 hora en medio suplementado con gentamicina ( $t=0$ ), se lisaron y se realizaron recuentos de UFC en placa. B. Cinética de multiplicación intracelular de las distintas cepas tras lisar las células en las mismas condiciones a distintos tiempos p.i. Se representa la media  $\pm$  DE ( $n=3$ ) del logaritmo de UFC intracelulares viables por pocillo obtenidas (recuento en placa).

#### 1.4. Evaluación de la virulencia de los mutantes $\Delta bepC$ y $\Delta ugpB$ en modelo murino.

Se evaluó la capacidad de colonización en ratones BALB/c de los mutantes  $\Delta bepC$  y  $\Delta ugpB$  mediante el recuento de bacterias en el bazo a las semanas 3 y 7 posteriores a la infección intraperitoneal con una dosis de  $2 \times 10^5$  UFC/ratón. Estos tiempos de análisis corresponden con el máximo de infección esplénica (fase aguda de infección) y el final de la fase crónica de la infección de la cepa parental *B. ovis* PA en ratón (Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2012). La metodología empleada para los estudios de virulencia en ratón se detalla en el **Apartado 10.2.** de Materiales y Métodos.

No se observaron diferencias significativas en el nivel de colonización esplénica, ni en el tamaño de los bazos, de los animales inoculados con las cepas  $\Delta bepC$  y  $\Delta ugpB$  respecto a los inoculados con la cepa parental. Tanto *B. ovis* PA como los mutantes presentaron recuentos de aproximadamente 7 Log de UFC/bazo a las 3 semanas p.i. Alcanzada la semana 7 p.i. se observó una disminución en los niveles esplénicos de aproximadamente 1 Log. Por último, todos los animales presentaron bazos de peso similar a ambos tiempos p.i. (**Tabla X**).

**Tabla X.** Colonización esplénica de *B. ovis* PA y los mutantes  $\Delta bepC$  y  $\Delta ugpB$  derivados, en ratones BALB/c inoculados vía IP a una dosis de  $2 \times 10^5$  UFC/ratón.

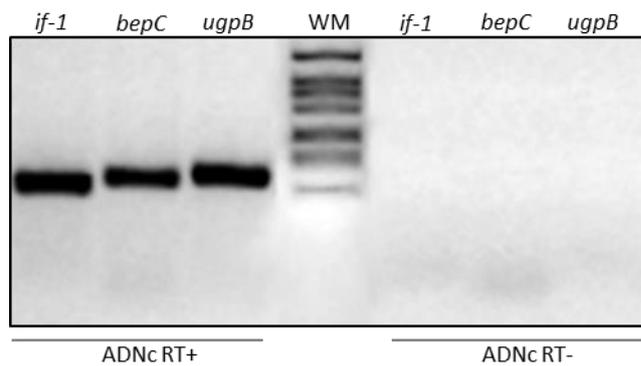
Cepa	Log UFC/bazo (media $\pm$ DE)		peso de bazos (g) (media $\pm$ DE)	
	semana 3 p.i.	semana 7 p.i.	semana 3 p.i.	semana 7 p.i.
<i>B. ovis</i> PA	6,90 $\pm$ 0,16	5,74 $\pm$ 0,59	0,167 $\pm$ 0,02	0,170 $\pm$ 0,05
bepC-M	7,05 $\pm$ 0,43	5,78 $\pm$ 0,68	0,173 $\pm$ 0,05	0,224 $\pm$ 0,09
ugpB-M	6,86 $\pm$ 0,73	5,94 $\pm$ 0,14	0,166 $\pm$ 0,07	0,204 $\pm$ 0,04

Se muestran los niveles de infección esplénica en ratones BALB/c obtenidos a las semanas 3 y 7 p.i., expresados como la media  $\pm$  DE ( $n=5$ ) del Log UFC/bazo, junto con el peso de los bazos (expresado en gramos) de los ratones infectados con cada una de las cepas por vía IP.

#### 1.5. Análisis de la transcripción de los genes *bepC* y *ugpB* en *B. ovis* PA

Teniendo en cuenta las diferencias entre los resultados obtenidos con los mutantes  $\Delta bepC$  y  $\Delta ugpB$  de *B. ovis* y los mismos mutantes de *B. suis* (Castañeda-Roldán *et al.*, 2006; Posadas *et al.*, 2007), se llevó a cabo el análisis de la transcripción de ambos genes en *B. ovis* PA mediante RT-PCR a punto final, con los cebadores y condiciones que se detallan en el **Apartado 2.3.** de Materiales y Métodos.

Tras la amplificación mediante PCR del ADNc correspondiente, se confirmó que los genes *bepC* y *ugpB* se transcriben en *B. ovis* PA (**Figura 15**). Así, en las condiciones y técnica empleada, se observó tanto el transcrito de estos genes, como el del control de expresión constitutivo. Adicionalmente, se amplificaron los genes *bepC* y *ugpB* de *B. ovis* PA mediante PCR y se secuenciaron para compararlos con las secuencias correspondientes del genoma publicado de *B. ovis* 63/290, puesto que fueron las que se emplearon en este trabajo en el diseño de cebadores y verificación de las cepas recombinantes. En la comparación entre las secuencias correspondientes de *B. ovis* PA y *B. ovis* 63/290, se obtuvo, según lo esperado, un elevado grado de conservación entre ambas cepas. En concreto, se observó un único nucleótido de diferencia en el gen *ugpB*, conducente a la sustitución de un aminoácido (datos no mostrados). También se llevaron a cabo comparaciones entre las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de *B. ovis* PA con las secuencias publicadas del genoma de *B. suis* 1330. En este análisis se observó en la región intergénica tanto de *bepC* como de *ugpB* de *B. ovis* PA, una diferencia de uno y dos nucleótidos, respectivamente, respecto a la secuencia de *B. suis* 1330. La comparación de la secuencia de aminoácidos de las proteínas BepC y SP41 de *B. ovis* PA mostró, respectivamente, uno y cinco aminoácidos de diferencia respecto a la secuencia publicada de las correspondientes proteínas de *B. suis* 1330.



**Figura 15.** Evaluación de la expresión de los genes *bepC* y *ugpB* de *B. ovis* PA mediante RT-PCR (tomada y modificada de Silhu-Munoz *et al.*, 2016). Se muestra la imagen invertida de la original correspondiente a un mismo gel de agarosa al 2% en el que se visualizan los resultados de las reacciones de PCR tras la síntesis del ADNc con retrotranscriptasa (RT+) de cada gen. En la parte derecha de la figura se muestra el resultado obtenido en reacciones realizadas en paralelo sin enzima (RT-) como control de la ausencia de ADN cromosómico en las muestras de ARN. Como referencia endógena de expresión constitutiva se amplificó el gen de la proteína IF-1. WM: marcador de peso molecular de ADN VI de Roche.

### 1.6. Análisis de la fuerza de la región promotora del gen *bepC* de *B. ovis*

La ausencia de atenuación en la virulencia del mutante  $\Delta bepC$  de *B. ovis* PA (Tabla X), así como su comportamiento similar al de la cepa parental en los ensayos de sensibilidad a distintos compuestos (Tabla IX), contrasta con los resultados previamente obtenidos para el mutante de *B. suis* 1330 (Posadas *et al.*, 2007). Para evaluar si estas diferencias entre cepas podrían estar relacionadas con distintos niveles de transcripción del gen *bepC*, y considerando que se detectó una diferencia de un nucleótido en la hipotética región promotora del gen entre *B. suis* 1330 y *B. ovis* PA (Apartado 1.5. de Resultados), se decidió evaluar la fuerza de los promotores *bepC* en las dos cepas de *Brucella*. Para ello se construyeron fusiones del gen *lacZ* con las secuencias promotoras hipotéticas del gen *bepC* de *B. ovis* PA y de *B. suis* 1330 (como control) y se clonaron en el plásmido pRS415 (Apartado 3.1. de Materiales y Métodos).

Como resultado de la electroporación de *E. coli* TG1 con los plásmidos recombinantes pRSpbepCPA y pRSpbepC1330, se obtuvieron las cepas TG1 portadoras de los mismos. La secuenciación de las regiones promotoras fusionadas, amplificadas por PCR con el cebador universal del plásmido pRS415 y el cebador pEcoRipBru-F (hibridación en el extremo 5' de la región clonada) (Tabla III y IV) proporcionó los resultados esperados, sin observarse modificaciones no deseadas en la secuencia nucleotídica, respecto a las secuencias publicadas del gen *bepC* para *B. ovis* 63/290 y *B. suis* 1330 (BOV\_0938 y BR\_0945, respectivamente). El resultado del alineamiento de las secuencias obtenidas para cada fusión se recoge en la Figura 16. En ella se puede observar, en color marrón, como la secuencia nucleotídica de las regiones promotoras de *B. ovis* PA y *B. suis* 1330 son prácticamente idénticas, con un solo nucleótido de diferencia entre ambas especies; Guanina en PA y Adenina en 1330, localizado a una distancia de 7 nucleótidos (dirección 5'-3') de la caja reguladora -10. Este nucleótido de diferencia a nivel de la región promotora de *B. ovis* PA está presente en todos los genomas que se encuentran disponibles de esta especie (datos no mostrados).

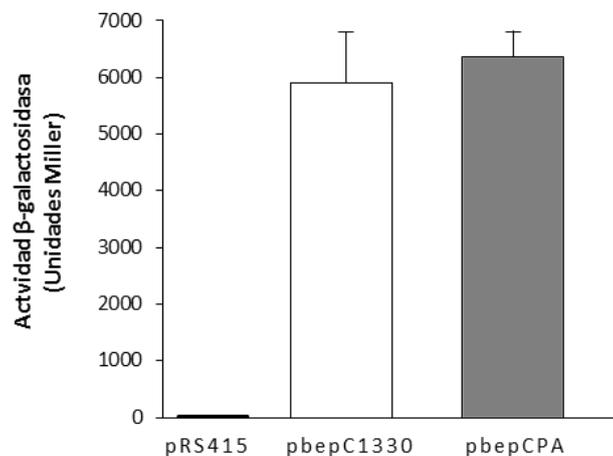
mutación	caja reguladora - 10	sitio BamHI	sitio unión ribosoma lacZ	lacZ
fusión_pbepC1330	CTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCG			60
fusión_pbepCPA	CTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCG			60
*****				
fusión_pbepC1330	GAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCGCCATAAACTGCCAGGAATGGGGATCGGAATTCGCAC			120
fusión_pbepCPA	GAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCGCCATAAACTGCCAGGAATGGGGATCGGAATTCGCAC			120
*****				
fusión_pbepC1330	CCTATGATGTTATTTTCATCGAAGGTGCAGTTGATTTTCGTCGCCGGACGTTCTGTTCAATC			180
fusión_pbepCPA	CCTATGATGTTATTTTCATCGAAGGTGCAGTTGATTTTCGTCGCCGGACGTTCTGTTCAATC			180
*****				
fusión_pbepC1330	AGCTCAAGGAAGGCGGTTCGCCTGGTTGCGGTGCGAAGGCCGTGGAATGCGGGCGTTGCGC			240
fusión_pbepCPA	AGCTCAAGGAAGGCGGTTCGCCTGGTTGCGGTGCGAAGGCCGTGGAATGCGGGCGTTGCGC			240
*****				
fusión_pbepC1330	GTCTTTACGTCAAGGAAAGCGGCGTGGCTTCCGGGCGTACCGTTTTCAATGCAGCGATCA			300
fusión_pbepCPA	GTCTTTACGTCAAGGAAAGCGGCGTGGCTTCCGGGCGTACCGTTTTCAATGCAGCGATCA			300
*****				
fusión_pbepC1330	AACCGTCCCGGTTTCGAGTGTGAAGAGCAGTTCGAATTTAATTCGGGAATTCGGTACA			360
fusión_pbepCPA	AACCGTCCCGGTTTCGAGTGTGAAGAGCAGTTCGAATTTAATTCGGGAATTCGGTACA			360
*****				
fusión_pbepC1330	ATTCTGCAACGTTGTGAAATTTGTTTGTGAATGCGGGCTTGGCGACAATGGAAATGACCC			420
fusión_pbepCPA	ATTCTGCAACGTTGTGAAATTTGTTTGTGAATGCGGGCTTGGCGACAATGGAAATGACCC			420
*****				
fusión_pbepC1330	GGTTTACGGGTTACTAAATTTCCCGAACTGGTTCGGTTCGATGATGGATTTCGTTGGATCCG			480
fusión_pbepCPA	GGTTTACGGGTTACTAAATTTCCCGAACTGGTTCGGTTCGATGATGGATTTCGTTGGATCCG			480
*****				
fusión_pbepC1330	ACAACCGATGAAAGCGGCGACGCGCAGTTAATCCCACAGCCGCCAGTTCGGCTGGCGGCA			540
fusión_pbepCPA	ACAACCGATGAAAGCGGCGACGCGCAGTTAATCCCACAGCCGCCAGTTCGGCTGGCGGCA			540
*****				
fusión_pbepC1330	TTTAACTTTCTTTATCACACAAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCG			600
fusión_pbepCPA	TTTAACTTTCTTTATCACACAAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCG			600
*****				
fusión_pbepC1330	TCGTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCGCGTTACCCAACCTAATCGCCTGCAG			660
fusión_pbepCPA	TCGTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCGCGTTACCCAACCTAATCGCCTGCAG			660
*****				



Figura 16. Representación del alineamiento de las secuencias nucleotídicas correspondientes a la fusión del gen *lacZ* con las regiones promotoras del gen *bepC* de *B. suis* 1330 y *B. ovis* PA, flanqueadas por los sitios de restricción *EcoRI* y *BamHI* y clonadas en el plásmido pRS415. Secuencias provenientes de los plásmidos pRSpbepC1330 y pRSpbepCPA de cepas de *E. coli* TG1 portadoras de los mismos. En la parte superior de la figura se indica la simbología de los distintos elementos presentes entre el extremo 5' y el 3' de las regiones promotoras de *bepC* de *B. suis* 1330 (pbepC1330) y *B. ovis* PA (pbepCPA) clonadas (en marrón verdoso). En la parte inferior se muestra una representación esquemática de las fusiones realizadas.

Una vez verificadas las secuencias de las fusiones, se midió la hidrólisis del sustrato cromogénico ONPG (*o*-nitrofenol) por parte la enzima  $\beta$ -galactosidasa regulada por los promotores fusionados en los plásmidos pRSpbepCPA y pRSbepC1330. Esta actividad enzimática (expresada en Unidades de Miller, UM) se utilizó como medida de la fuerza de los promotores de *B. ovis* PA y *B. suis* 1330 (**Apartado 3.2.** de Materiales y Métodos).

En la **Figura 17** se recogen las UM de actividad  $\beta$ -galactosidasa producidas por las diferentes construcciones. La cepa de *E. coli* portadora del plásmido pRS415 vacío, según lo esperado, no mostró actividad  $\beta$ -galactosidasa, mientras que la actividad mostrada por las cepas portadoras de las fusiones alcanzó, en ambos casos, niveles de aproximadamente 6000 UM, no observándose por tanto, diferencias significativas entre la fuerza del promotor de *bepC* de *B. ovis* PA y de *B. suis* 1330 en las condiciones empleadas.



**Figura 17. Actividad  $\beta$ -galactosidasa (Unidades Miller) de las cepas de *E. coli* TG1 portadoras de fusiones *lacZ* con las regiones promotoras hipotéticas del gen *bepC* de *B. suis* 1330 (pbepC1330) y *B. ovis* PA (pbepCPA) clonadas en el plásmido pRS415.** Se representa la media  $\pm$  DE de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en Unidades de Miller mostrada por cepas de *E. coli* TG1 portadoras del plásmido pRS415 vacío (pRS415, control negativo), plásmido pRSpbepC1330 y pRSpbepCPA en tres ensayos independientes.

## 2. Construcción, caracterización y evaluación preliminar de la virulencia de un panel de mutantes múltiples en genes relacionados con la membrana externa

La ausencia de atenuación de los mutantes  $\Delta$ *bepC* y  $\Delta$ *ugpB* de *B. ovis* PA se suma a resultados obtenidos previamente con mutantes de la misma cepa para otros genes relacionados con la ME (Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2012; Sancho *et al.*, 2014; Sidhu-Muñoz *et al.*, 2016), algunos de los cuales sí presentan atenuación en cepas lisas de *Brucella*. Con el objetivo de profundizar en el conocimiento de las particularidades de la ME de *B. ovis* y de la relevancia de sus componentes para la virulencia, así como de desarrollar una vacuna atenuada, que de ser posible permia la diferenciación serológica entre animales vacunados e infectados, se construyó un panel de mutantes múltiples con combinaciones de distintos genes que se mencionan a continuación.

Por una parte, se incluyó como mutación preferente la del gen *omp31*, que codifica una OMP mayoritaria y que, además, se ha descrito como un antígeno prometedor para el diagnóstico de infecciones causadas por *B. ovis* (Kittelberger *et al.*, 1998; Vizcaíno *et al.*, 2001). Otra de las mutaciones preferentemente incluidas fue la del gen *cgs*, implicado en la síntesis de C $\beta$ G (Iñón de Iannino *et al.*, 1998; Briones *et al.*, 2001). El mutante  $\Delta$ *cgs* de *B. ovis* PA previamente construido presentó una baja colonización esplénica en ratón cuando se inoculó por vía IP a una dosis de  $10^6$  UFC/ratón (Martín-Martín *et al.*, 2012), pero cuando se inoculó a una dosis de  $10^8$  UFC/ratón presentó una curva de multiplicación esplénica similar a la de la cepa parental en la dosis inferior de  $10^6$  UFC/ratón (Sancho., 2014). Otros genes diana de interés fueron los genes *omp25* y *omp25c* (Martín-Martín *et al.*, 2009) que también codifican OMPs mayoritarias en *B. ovis* PA. Los mutantes disponibles para estos genes, y que no estaban atenuados en ratón, se habían obtenido por reemplazamiento con “*cassette*” de resistencia a kanamicina (Caro-Hernández *et al.*, 2007), por lo que en este trabajo se han construido siguiendo la metodología

descrita en el **Apartado 4.1.** de Materiales y Métodos) para poder establecer adecuadamente las comparaciones entre los distintos mutantes. Se incluyen también en la mutagénesis múltiple, los genes *omp10* y *omp19*, que codifican dos lipoproteínas de ME (Tibor *et al.*, 1999) y los genes *bepC* y *ugpB*.

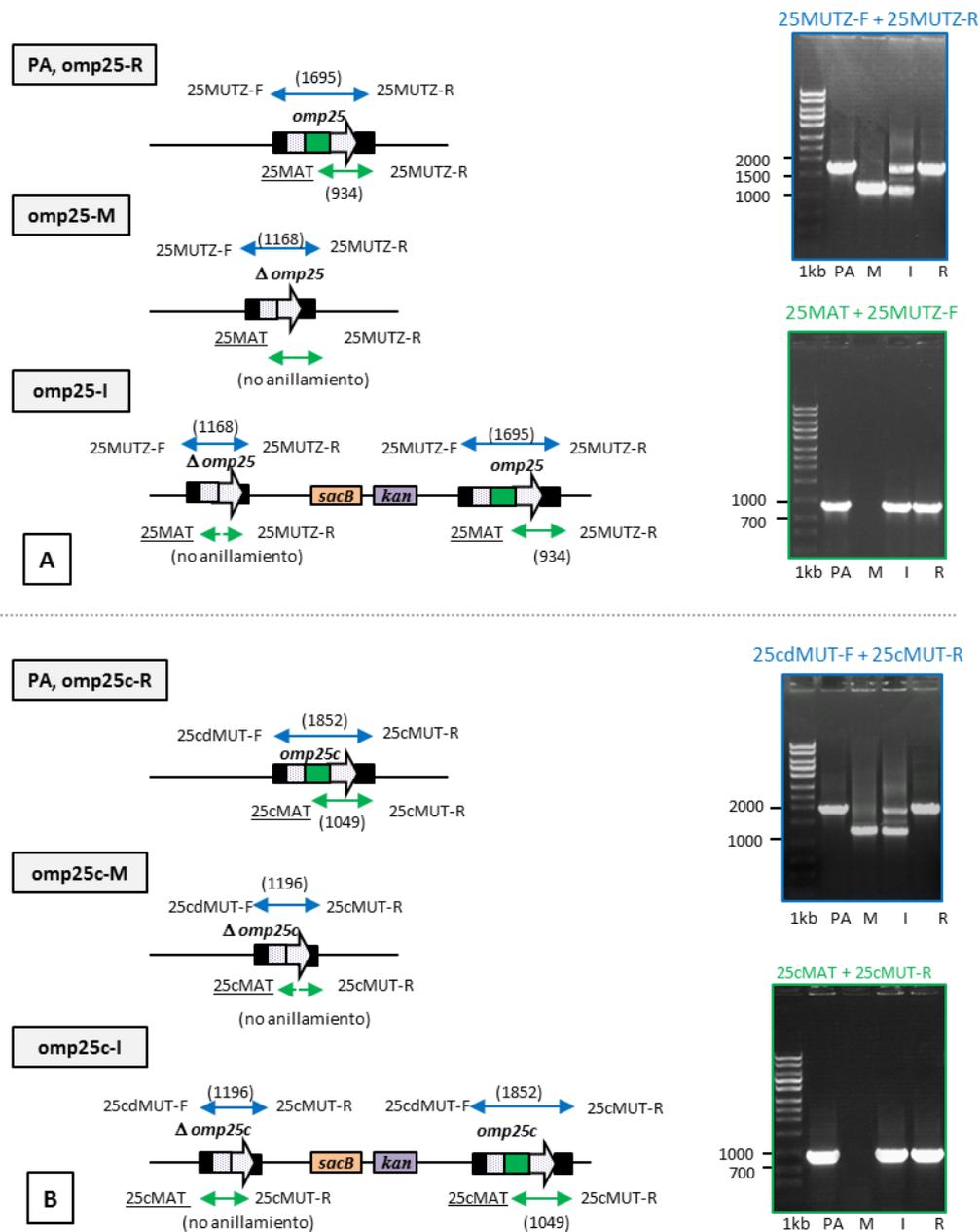
### 2.1. Obtención del panel de mutantes.

Por un lado, se construyeron los plásmidos pNV25OVL02 y pNV25cOVL02 con los que se electroporó la cepa parental *B. ovis* PA. Tras el primer entrecruzamiento simple se obtuvieron las cepas *omp25*-I y *omp25c*-I (**Tabla VI**), portadoras de una copia mutada y otra silvestre del gen *omp25* y *omp25c*, respectivamente. El segundo entrecruzamiento dio lugar a las cepas mutantes  $\Delta omp25$  y  $\Delta omp25c$ , junto con las correspondientes cepas revertidas al genotipo silvestre. Dichos mutantes y plásmidos se emplearon como base para la obtención de mutantes múltiples que incluyeran inactivaciones en los genes *omp25* y *omp25c*. La delección de dichos genes se verificó en cada uno de los mutantes mediante la amplificación por PCR de los loci correspondientes en dos reacciones paralelas i) empleando cebadores externos al gen de interés y ii) una reacción con uno de los cebadores externos (**Tabla III**) y otro interno a la región a eliminar (**Tabla IV**).

Los resultados de las electroforesis de los productos de PCR obtenidos en la verificación de los mutantes  $\Delta omp25$  y  $\Delta omp25c$  (M), las cepas con el plásmido integrado en el cromosoma (I) y cepas revertientes (R) correspondientes, junto con la cepa parental *B. ovis* PA (PA), se recogen en las **Figura 18**. Para cada uno de los genes implicados en el proceso de mutación se obtuvieron los resultados esperados, tomando como referencia el genoma publicado de *B. ovis* 63/290. En la verificación de la inactivación del gen *omp25*, empleando la combinación 25MUTZ-F/25MUTZ-R se obtuvo una banda única de 1695 pb en *B. ovis* PA y la cepa *omp25*-R, una de 1168 pb en el mutante *omp25*-M, mientras que en la cepa *omp25*-I se obtuvo una banda de 1695pb y otra de 1168 pb (**Figura 18A**, gel azul). La amplificación con los cebadores 25MAT y 25MUTZ-R resultó en una banda amplificada de 934 pb para las cepas *B. ovis* PA, *omp25*-I y *omp25*-R. Como era de esperar, no se obtuvo amplificación en la cepa mutante *omp25*-M (**Figura 18A**, gel verde).

Respecto al gen *omp25c* las bandas amplificadas con la combinación 25cdMUT-F/25cMUT-R fueron de 1852 pb en *B. ovis* PA y la cepa *omp25c*-R; en el mutante *omp25c*-M el tamaño observado fue de 1196 pb y en la cepa *omp25c*-I se visualizaron dos bandas, de los tamaños observados en PA/R y *omp25c*-M (**Figura 18B**, gel azul). Como era de esperar, la combinación de cebadores 25cMAT/25cMUT-R no amplificó en el mutante *omp25c*-M, mientras que en el resto de cepas se observó una banda amplificada de 1049 pb (**Figura 18**, gel verde). Todos estos resultados coinciden con lo esperado según se representan en los apartados A y B de la **Figura 18**. La delección de los genes *omp25* y *omp25c* en los mutantes generados se confirmó mediante la realización de reacciones de PCR con los cebadores 25A-F+25MUTZ-R y 25cd-F2+25c-R2, respectivamente. La secuenciación de las regiones cromosómicas amplificadas proporcionó los resultados esperados, no observándose modificaciones no deseadas en la secuencia nucleotídica.

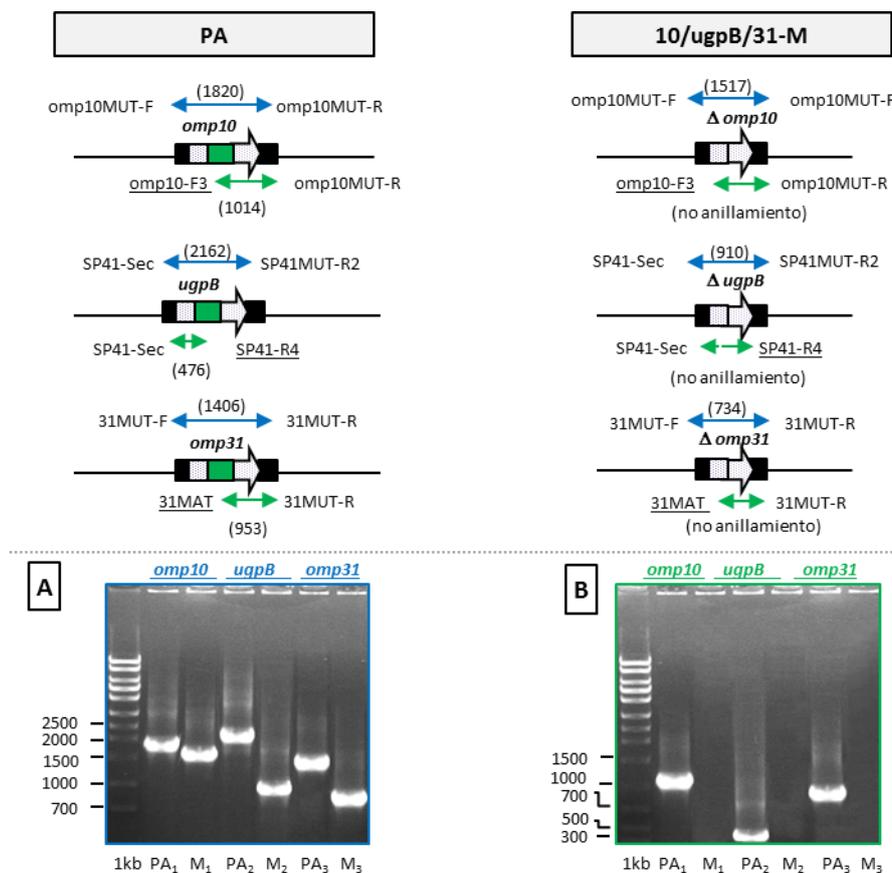
Por otro lado, se construyeron mutantes múltiples en genes relacionados con la ME de *Brucella*. Para la obtención de dichos mutantes se emplearon los plásmidos pNVSP41OVL02, pNV10OVL02, pNV19OVL02, pNV25cOVL02, pPS31OVL02 y pNVcgsOVL03, con los que se transformaron, en diferentes combinaciones, mutantes en OMPs de *B. ovis* PA obtenidos en este trabajo y otros disponibles en nuestro laboratorio. Se decidió inactivar simultáneamente los genes de las lipoproteínas *Omp10* y *Omp19*, empleando para ello como base el mutante  $\Delta omp19$  y el mutante  $\Delta omp10$ , respectivamente. Tras obtenerse las cepas *omp10/omp19*-I y *omp19/omp10*-I (**Tabla VI**), el segundo entrecruzamiento siempre dio lugar al genotipo inicial del mutante simple, no consiguiéndose obtener ningún mutante doble en ambos genes. También de manera simultánea, se decidió delecionar los genes de las proteínas mayoritarias *Omp25* y *Omp31*. Tras múltiples intentos, no fue posible conseguir el reemplazamiento del gen *omp31* en el mutante  $\Delta omp25$  ya que en el segundo entrecruzamiento siempre se obtuvo la reversión al mutante simple inicial.



**Figura 18. Verificación genotípica de *B. ovis*-pNV25OVL02-M ( $\Delta omp25$ ) y *B. ovis*-pNV25cOVL02-M ( $\Delta omp25c$ ) mediante PCR.** Esquema del genotipo relativo a los genes *omp25* y *omp25c* que presentan la cepa parental (PA), las cepas mutantes *omp25*-M y *omp25c*-M (M), las cepas con el plásmido integrado *omp25*-I y *omp25c*-I (I) y las cepas revertientes *omp25*-R y *omp25c*-R (R). **A.** Resultados obtenidos en la amplificación por PCR del locus *omp25* en las cepas PA, M, I y R con dos parejas de cebadores: 25MUTZ-F + 25MUTZ-R (flechas y letras azules) y 25MAT + 25MUTZ-R (flechas y letras verdes) (subrayado cebador interno a la zona delecionada del gen *omp25*). **B.** Resultados obtenidos en la amplificación por PCR del locus *omp25c* en las cepas PA, M, I y R con dos parejas de cebadores: 25cdMUT-F y 25cdMUT-R (flechas y letras azules) y 25cMAT + 25cdMUT-R (flechas y letras verdes) (subrayado cebador interno a la zona delecionada del gen *omp25c*). Los carriles denominados 1kb corresponden al patrón de ADN *ExACTgene* 1 kb de Fisher.

Como mutantes doble se obtuvieron las cepas  $\Delta bepC\Delta ugpB$ ,  $\Delta omp25\Delta omp25c$ ,  $\Delta omp25\Delta cgs$ ,  $\Delta omp31\Delta cgs$ ,  $\Delta omp10\Delta ugpB$ ,  $\Delta omp19\Delta ugpB$ ,  $\Delta omp10\Delta omp31$ ,  $\Delta omp31\Delta omp10$ ,  $\Delta omp31\Delta omp19$ ,  $\Delta omp31\Delta bepC$  y  $\Delta omp31\Delta ugpB$ . Los mutantes triples obtenidos fueron  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$ ,  $\Delta omp31\Delta omp10\Delta omp25c$  y  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ . Las características más relevantes de las cepas obtenidas se recogen en la **Tabla VI**.

La delección de los genes en cada uno de los mutantes múltiples obtenidos se confirmó mediante la amplificación por PCR de los loci correspondientes, en dos reacciones paralelas (**Apartado 5** de Materiales y Métodos); una empleando dos cebadores externos al gen de interés y otra reacción con uno de los cebadores externos (**Tabla III**) y otro interno a la región a eliminar (**Tabla IV**). A modo de ejemplo representativo de la verificación realizada en los diferentes mutantes múltiples, se recogen los resultados de las electroforesis de los productos de PCR obtenidos con el mutante triple  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  (**Figura 19**).



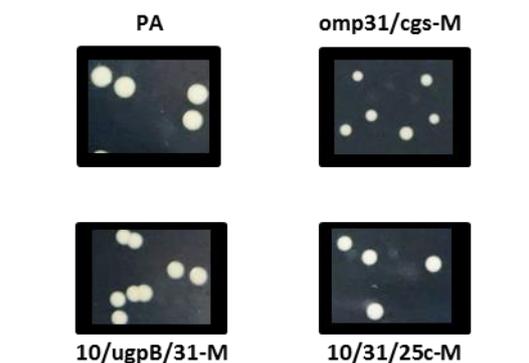
**Figura 19. Verificación genotípica del mutante triple  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  de *B. ovis* PA mediante PCR.** Esquema del genotipo relativo a los genes *omp10*, *ugpB* y *omp31* que presentan la cepa parental (PA) y la cepa mutante 10/ugpB/31-M (M). **A.** Resultados obtenidos en la amplificación por PCR de los loci correspondientes con una pareja de cebadores que hibridan en regiones externas al gen a eliminar (flechas y letras azules): 1) locus *omp10* (omp10MUT-F+omp10MUT-R), 2) locus *ugpB* (SP41-Sec+SP41MUT-R2), 3) locus *omp31* (31MUT-F+31MUT-R). **B.** Resultados obtenidos en la amplificación por PCR de los locus correspondientes con una pareja de cebadores que incluyen uno externo y otro que hibrida en el interior de la región a eliminar (subrayado) (flechas y letras verdes): locus *omp10* (omp10-F3+omp10MUT-R), locus *ugpB* (SP41-Sec+SP41-R4), locus *omp31* (31MAT+31MUT-R). Los canales denominados 1kb corresponden al patrón de ADN *ExACTgene* 1 kb de Fisher.

Tras las reacciones de amplificación de los genes *omp10*, *ugpB* y *omp31*, en *B. ovis* PA (PA) y en el mutante triple (M), se obtuvieron los resultados esperados. Así, tras la amplificación del gen *omp10* con los cebadores *omp10MUT-F+omp10MUT-R* se obtuvo una banda única de 1820 pb en la cepa parental y otra de menor tamaño, 1517 pb, en el mutante (**Figura 19A**, carriles PA<sub>1</sub>, M<sub>1</sub>). De manera similar, la amplificación del gen *ugpB* con los cebadores *SP41-Sec+SP41MUT-R2* en la cepa parental y en el mutante resultó en un tamaño de banda de 2162 pb y otro de 910 pb, respectivamente (**Figura 19A**, carriles PA<sub>2</sub>, M<sub>2</sub>). Respecto a la amplificación del gen *omp31* con los cebadores *31MUT-F+31MUT-R*, los tamaños observados en PA/M fueron de 1406 y 734 pb (**Figura 19A**, carriles PA<sub>3</sub>, M<sub>3</sub>). Como era de esperar, el empleo de la combinación de cebadores que incluía la zona interna de los genes diana no produjo ningún producto de amplificación en el mutante (**Figura 19B**, carriles M<sub>1, 2, 3</sub>) y en la cepa parental se observó un perfil de banda única (**Figura 19B**, carriles PA<sub>1, 2, 3</sub>). En concreto, la amplificación de los loci *omp10* (*omp10-F3+omp10MUT-R*), *ugpB* (*SP41-Sec+SP41-R4*) y *omp31* (*31MAT+31MUT-R*) resultó en la cepa parental, en una banda para cada locus de tamaño 1014, 476 y 953 pb, respectivamente (**Figura 19B**, carriles PA<sub>1, 2, 3</sub>). Todos estos resultados coinciden con la referencia tomada del genoma publicado de *B. ovis* 63/290 (ATCC 25840).

Una vez confirmada la correcta delección de los genes en las cepas obtenidas, se determinaron las UFC/ml que presentaban suspensiones bacterianas de DO<sub>600</sub> 0,2 de cada mutante (**Tabla XI**). Dicha relación se tuvo en cuenta en la preparación de inóculos bacterianos en los experimentos *in vivo* e *in vitro*.

No se observaron diferencias en el crecimiento de los mutantes simples  $\Delta omp25$ ,  $\Delta omp25c$ , ni en el mutante doble  $\Delta bepC\Delta ugpB$  respecto a los recuentos de UFC/ml obtenidos en la cepa parental. Los recuentos de UFC/ml fueron significativamente menores a los de *B. ovis* PA en el resto de cepas, aunque en los mutantes  $\Delta omp10\Delta ugpB$  y  $\Delta omp19\Delta ugpB$  las diferencias no fueron drásticas (**Tabla XI**). Sin embargo, las colonias de estas dos cepas empezaron a visualizarse a partir de las 72 horas de incubación, lo que supone un retraso de 24 horas respecto a *B. ovis* PA, obteniéndose colonias de tamaño ligeramente inferior (evaluado a los 6 días de incubación), siendo este comportamiento similar al de los mutantes  $\Delta omp10$  y  $\Delta omp19$  (Sidhu-Muñoz *et al.*, 2016). El doble mutante  $\Delta omp25\Delta omp25c$  mostró recuentos significativamente inferiores a los de la cepa parental y también diferencias significativas respecto al mutante simple inicial  $\Delta omp25$  ( $p < 0,012$ ). En cambio, los mutantes dobles  $\Delta omp10\Delta omp31$ ,  $\Delta omp31\Delta omp19$ ,  $\Delta omp31\Delta bepC$ ,  $\Delta omp31\Delta ugpB$  y el mutante triple  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  mostraron un crecimiento en medio sólido similar al mutante simple  $\Delta omp31$ . Las mayores diferencias de UFC/ml se observaron en las cepas  $\Delta omp25\Delta cgs$ ,  $\Delta omp31\Delta cgs$ ,  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  y  $\Delta omp31\Delta omp10\Delta omp25c$  (aproximadamente  $3 \times 10^8$  UFC/ml) respecto a la cepa parental (aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC/ml). También se observó un retraso en la aparición de las colonias en todos los mutantes múltiples, visualizándose en el caso de mutantes  $\Delta omp31\Delta cgs$ ,  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$ ,  $\Delta omp31\Delta omp10\Delta omp25c$  y  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  a partir de las 96 horas de incubación, lo cual supone un retraso de 48 horas con respecto a la cepa parental.

En la **Figura 20** se muestran las colonias de los mutantes  $\Delta omp31\Delta cgs$ ,  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  y  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ , tras 6 días de incubación, como ejemplo representativo de las diferencias observadas en el crecimiento en medio sólido de las cepas obtenidas en este trabajo.



**Figura 20.** Colonias de *B. ovis* PA y de los mutantes  $\Delta omp31\Delta cgs$ ,  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  derivados. Se muestran las colonias obtenidas en medio TSA-YE-HS tras 6 días de incubación a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

**Tabla XI.** Recuentos de UFC/ml de una suspensión en PBS de DO<sub>600</sub> 0,2 de *B. ovis* PA y los mutantes obtenidos en este trabajo.

Cepas	Log UFC/ml media ± DE(n=3)
PA	9,09 ± 0,04
omp10-M	8,84 ± 0,04 <sup>c</sup>
omp19-M	8,92 ± 0,05 <sup>c</sup>
omp31-M	8,80 ± 0,10 <sup>b</sup>
cgs-M	8,88 ± 0,08 <sup>c</sup>
bepC/ugpB-M	9,10 ± 0,05
omp25-M	9,08 ± 0,07
omp25c-M	9,05 ± 0,01
omp25/omp25c-M	8,82 ± 0,06 <sup>b</sup>
omp10/omp31-M	8,79 ± 0,07 <sup>a</sup>
omp10/ugpB-M	8,91 ± 0,06 <sup>c</sup>
omp19/ugpB-M	8,88 ± 0,03 <sup>c</sup>
omp31/omp19-M	8,78 ± 0,04 <sup>a</sup>
omp25/cgs-M	8,56 ± 0,06 <sup>a</sup>
omp31/cgs-M	8,49 ± 0,09 <sup>a</sup>
omp31/bepC-M	8,80 ± 0,04 <sup>b</sup>
omp31/ugpB-M	8,82 ± 0,06 <sup>b</sup>
10/31/25c-M	8,49 ± 0,04 <sup>a</sup>
31/10/25c-M	8,39 ± 0,03 <sup>a</sup>
10/ugpB/31-M	8,76 ± 0,18 <sup>a</sup>

Comparaciones estadísticamente significativas con la cepa parental (PA) mediante el test PLSD: <sup>a</sup> $P \leq 0,0005$ ; <sup>b</sup> $P \leq 0,005$ ; <sup>c</sup> $P \leq 0,05$

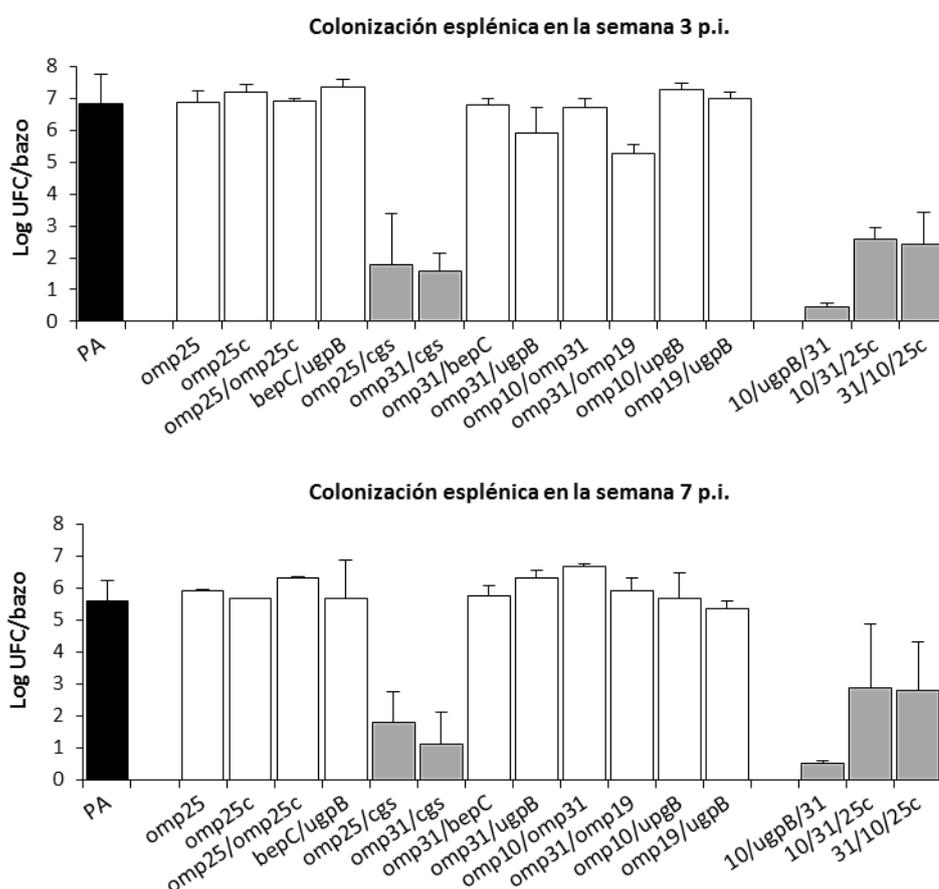
## 2.2. Evaluación preliminar de la virulencia en modelo murino

Con el objetivo de seleccionar cepas atenuadas para posteriores análisis encaminados a evaluar su potencial como vacunas, se llevó a cabo un cribado preliminar del panel de mutantes en base a su virulencia *in vivo*. Las cepas se inocularon a una dosis de  $1 \times 10^6$  UFC/ratón considerando estudios previos realizados con mutantes en proteínas mayoritarias de la ME de *B. ovis* (Caro-Hernández *et al.*, 2007; Sancho., 2014), y se analizó su colonización esplénica a las semanas 3 y 7 p.i. (**Apartado 10.2.** de Materiales y Métodos). Estos tiempos se corresponden con el de la fase aguda y la fase crónica de la infección, respectivamente, para la cepa parental *B. ovis* PA en ratón. Para la preparación de las dosis se tuvieron en cuenta las diferencias observadas en los recuentos de UFC de las distintas cepas para la misma DO<sub>600</sub> (**Tabla XI**).

En experimentos de virulencia previamente realizados (dosis de inoculación  $10^6$  UFC/ratón), se observó una marcada atenuación para el mutante  $\Delta cgs$  de *B. ovis* PA a las semanas 3 y 7 p.i (Martín-Martín *et al.*, 2012) mientras que los mutantes simples  $\Delta omp31$ ,  $\Delta omp10$  y  $\Delta omp19$  mostraron niveles de infección esplénica similares a los de la cepa parental en estos mismos puntos de muestreo (Sancho., 2014; Sidhu-Muñoz *et al.*, 2016). Los mutantes múltiples con el gen *cgs* delecionado ( $\Delta omp25\Delta cgs$  y  $\Delta omp31\Delta cgs$ ), como era de esperar, mostraron una elevada atenuación (**Figura 21**), similar a la observada anteriormente para el mutante simple  $\Delta cgs$  (Martín-Martín *et al.*, 2012). Los mutantes simples no polares  $\Delta omp25$  y  $\Delta omp25c$ , mostraron una colonización esplénica similar a la cepa parental (**Figura 21**) y a los mutantes  $\Delta omp25c$  y  $\Delta omp25c$  obtenido anteriormente por reemplazamiento con un *cassette* Kan<sup>r</sup> (Caro-Hernández *et al.*, 2007). Tampoco el doble mutante

$\Delta omp25\Delta omp25c$ , que carece de dos OMPs mayoritarias en *B. ovis* PA (Martín-Martín *et al.*, 2009), mostró atenuación en las condiciones analizadas (Figura 21). Resultados similares se obtuvieron con el doble mutante  $\Delta bepC\Delta ugpB$  y dobles mutantes para el gen *omp31*, que codifica una OMP mayoritaria, en combinación con *bepC*, *ugpB* o los genes *omp10* y *omp19* que codifican dos lipoproteínas de ME. La delección combinada de *ugpB* con *omp10* o con *omp19* tampoco condujo a una disminución de la virulencia de *B. ovis* PA (Figura 21).

Como se observa en la Figura 21, transcurridas 3 semanas p.i. los animales inoculados con los mutantes,  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  y  $\Delta omp31\Delta omp10\Delta omp25c$ , que tienen delecionados los mismos genes en distinto orden, mostraron recuentos esplénicos marcadamente inferiores a los obtenidos con *B. ovis* PA. Las diferencias observadas fueron superiores a 4 Log de infección. A la semana 7 p.i., la colonización esplénica de los mutantes  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  y  $\Delta omp31\Delta omp10\Delta omp25c$  fue inferior a la de *B. ovis* PA pero más irregular que la observada a la semana 3 p.i. Una marcada atenuación se observó en el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ , cuya presencia en el bazo no se detectó en ninguno de los tiempos analizados.



**Figura 21.** Análisis preliminar de la virulencia en ratones BALB/c del panel de mutantes (simples y múltiples) en genes relacionados con la ME de *B. ovis* PA obtenidos en este trabajo. Se muestran los niveles de infección esplénica a las semanas 3 y 7 p.i., expresados como la media  $\pm$  DE ( $n=2$ ) del Log UFC/bazo de los ratones infectados con cada una de las cepas vía por IP a una dosis de  $10^6$  UFC/ratón. Simbología: Cepa parental virulenta *B. ovis* PA (PA, barras negras); diferencia con PA de 0-2 Log de UFC/bazo (barras blancas); diferencia con PA de 2-6 Log UF/bazo (barras grises).

### 2.3. Caracterización topológica de la superficie celular mediante ELISA indirecto con anticuerpos monoclonales

Teniendo en cuenta los resultados preliminares de virulencia en ratón de los distintos mutantes y el interés para un mejor conocimiento de la envuelta celular se realizó un estudio de la topología de la superficie bacteriana empleando un panel de MAbs (**Tabla VII**) específicos frente a distintos componentes de la ME y del periplasma de *Brucella*. Para ello se empleó la técnica de i-ELISA (**Apartado 8** de Materiales y Métodos) con los mutantes simples  $\Delta omp10$ ,  $\Delta omp19$ ,  $\Delta omp25$ ,  $\Delta omp25c$ ,  $\Delta omp31$ ,  $\Delta cgs$  y los mutantes múltiples  $\Delta omp25\Delta omp25c$ ,  $omp25\Delta cgs$ ,  $\Delta omp31\Delta cgs$ ,  $\Delta omp31\Delta omp19$ ,  $\Delta omp10\Delta ugpb\Delta omp31$ ,  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  y  $\Delta omp31\Delta omp10omp25c$ . A continuación se describen los resultados más significativos de la caracterización realizada.

En primer lugar, no se observaron, diferencias respecto a la cepa parental, en la reactividad de los anticuerpos frente a R-LPS o PG en ninguna de las cepas analizadas (**Figuras 22-24**). Además, según lo esperado, el patrón de reactividad en los mutantes analizados fue coherente con las inactivaciones realizadas (en el caso de disponibilidad de MAbs). Concretamente en las cepas  $\Delta omp25$ ,  $\Delta omp25\Delta cgs$  y  $\Delta omp25\Delta omp25c$  se observó una reactividad del MAb F05 (anti-Omp25) similar a la del correspondiente blanco (tampón de dilución) y un patrón de reactividad similar al de la cepa parental para el resto de epítomos analizados (**Figura 22**). También se observó una reactividad similar al blanco para los MAbs C10 (anti-Omp10), D06 (anti-Omp19) y G10 (anti-Omp31) con los mutantes en los que se inactivaron los genes *omp10*, *omp19* y *omp31*, respectivamente (**Figuras 23-24**). En el mutante  $\Delta cgs$ , al igual que en el doble mutante  $\Delta bepC\Delta ugpb$  (datos no mostrados), se observó un perfil de reactividad similar al de la cepa parental frente a los epítomos analizados (**Figura 23**).

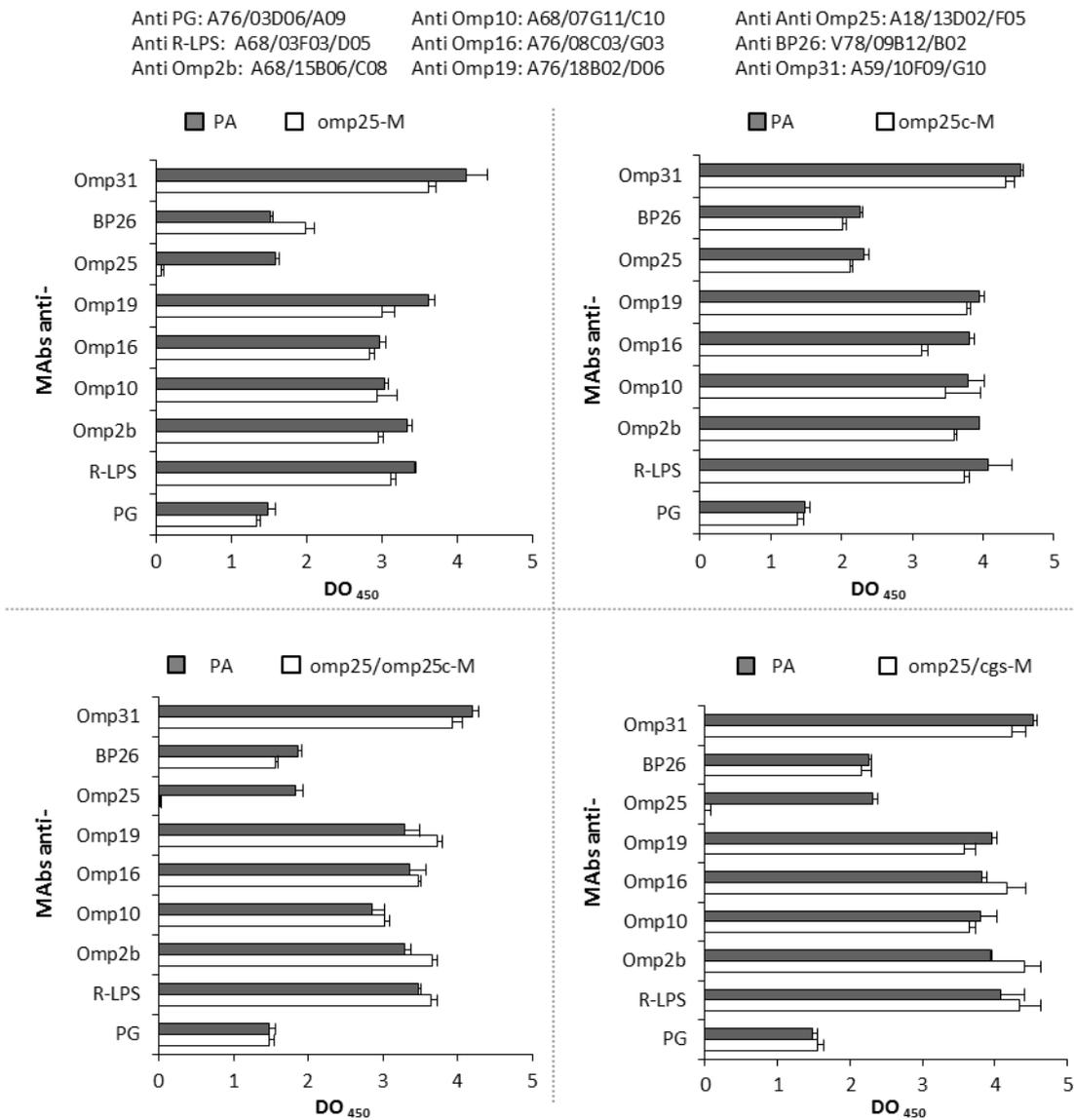
En este análisis se evidenciaron, además, diferencias en el patrón de reactividad frente a epítomos de proteínas no implicadas en el proceso de mutagénesis. Así, tanto en el mutante  $\Delta omp31$  como en los mutantes múltiples con el gen *omp31* delecionado ( $\Delta omp10\Delta ugpb\Delta omp31$ ,  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$ ,  $\Delta omp31cgs$  y  $\Delta omp31\Delta omp19$ ), se observó una mayor reactividad del MAb F05 (anti-Omp25), registrándose valores de  $DO_{450}$  de aproximadamente el doble de los observados en *B. ovis* PA para el mismo anticuerpo (**Figura 23-24**). Junto a este hecho, se evidenció una mayor reactividad del MAb B02 (anti-BP26) en el mutante  $\Delta omp31\Delta omp19$  (**Figura 24 C**) y en el mutante simple  $\Delta omp19$  (**Figura 24 B**). En cambio, esto no se observó en el mutante simple  $\Delta omp10$ , cuyo perfil fue similar al de la cepa parental respecto al resto de epítomos no incluidos en la inactivación (**Figura 24 A**). El mutante  $\Delta omp31\Delta omp10\Delta omp25c$ , como era de esperar, mostró un perfil de reactividad idéntico al mutante  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  (**Figura 23 E**) en todos los epítomos analizados (datos no mostrados).

A la vista de los resultados observados se decidió exponer a las correspondientes cepas portadoras de la inactivación en el gen *omp31* a un panel de distintos MAbs anti-Omp25 y a las que portaban la inactivación en el gen *omp19*, a un panel de MAbs anti-BP26.

Según se detalla en la **Figura 25**, tras la exposición de las cepas mutantes a la selección de MAbs mencionada, se confirmaron las diferencias anteriormente observadas. Así, en el análisis con los anticuerpos anti-Omp25, de nuevo se observó una reactividad superior con el MAb F05 en el mutante  $\Delta omp31$  y aquellos derivados de esta inactivación (**Figura 25 A**), respecto a la cepa parental. La reactividad registrada con el MAb C09 fue también más elevada en todos ellos y las mayores diferencias se observaron con el MAb A02. Éste mostró un claro incremento de reactividad con los mutantes analizados mientras que fue el menos reactivo con *B. ovis* PA.

Por otro lado, el mapeo con los MAbs específicos frente a la proteína periplásmica BP26 (**Figura 25 B**) volvió a evidenciar una mayor intensidad de la reacción del MAb B02 con los mutantes  $\Delta omp19$  y  $\Delta omp31\Delta omp19$ . Además, se registraron valores de DO superiores a los observados en *B. ovis* PA, con los

MAbs A10, H05 y F03 en estas mismas cepas. No se observaron grandes diferencias de la reactividad entre los MAbs anti-BP26 empleados.

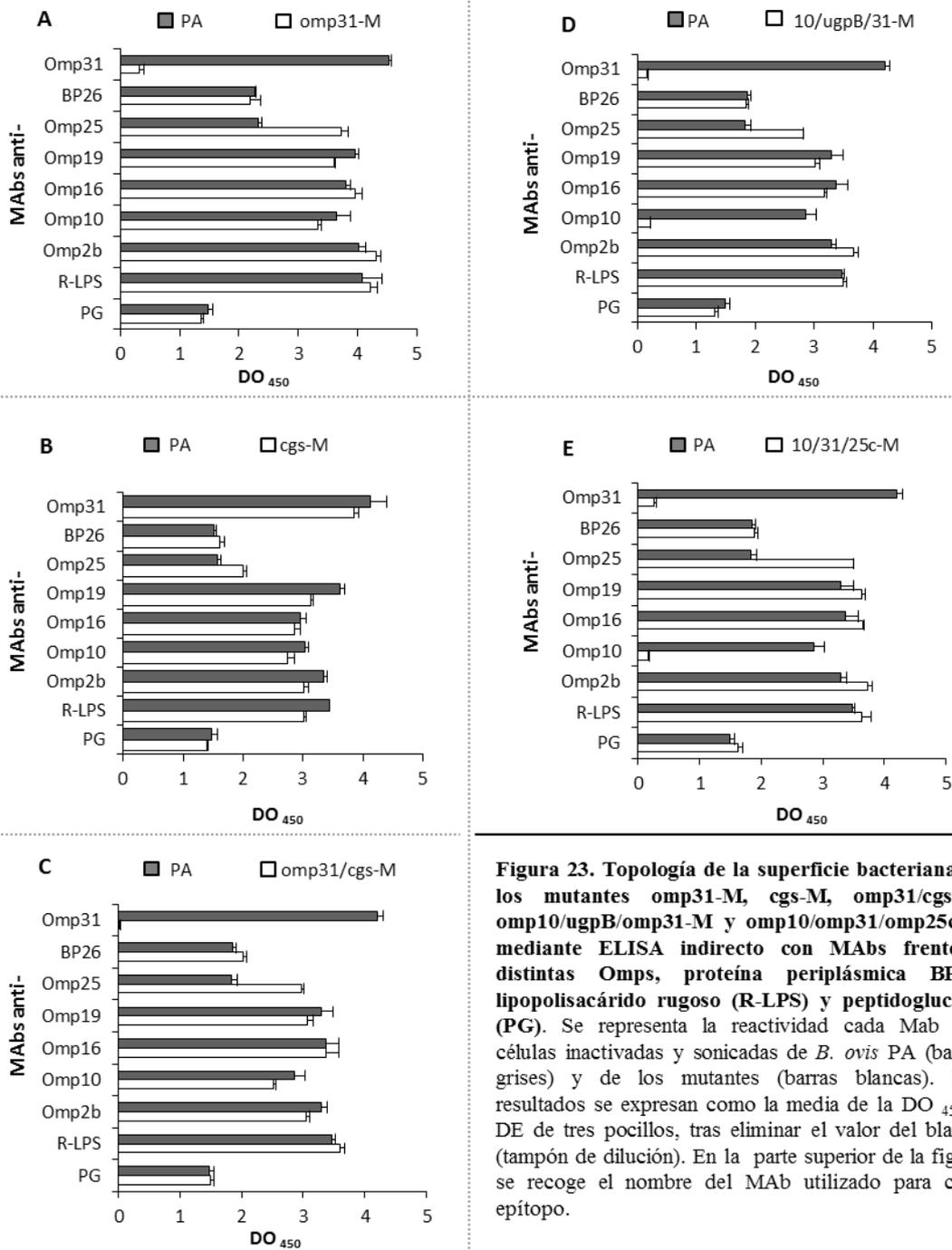


**Figura 22.** Topología de la superficie bacteriana de los mutantes *omp25-M*, *omp25c-M*, *omp25/omp25c-M* y *omp25/cgs-M* mediante i-ELISA con MAbs frente a distintas Omps, proteína periplásmica BP26, lipopolisacárido rugoso (R-LPS) y peptidoglucano (PG). Se representa la reactividad cada MAb con células inactivadas y sonicadas de *B. ovis* PA (barras grises) y los mutantes correspondientes (barras blancas). Los resultados se expresan como la media de la  $DO_{450} \pm DE$  de tres pocillos, tras eliminar el valor del blanco (tampón de dilución). En la parte superior de la figura se recoge el nombre del MAb utilizado para cada epítipo.

Anti PG: A76/03D06/A09  
 Anti R-LPS: A68/03F03/D05  
 Anti Omp2b: A68/15B06/C08

Anti Omp10: A68/07G11/C10  
 Anti Omp16: A76/08C03/G03  
 Anti Omp19: A76/18B02/D06

Anti Anti Omp25: A18/13D02/F05  
 Anti BP26: V78/09B12/B02  
 Anti Omp31: A59/10F09/G10

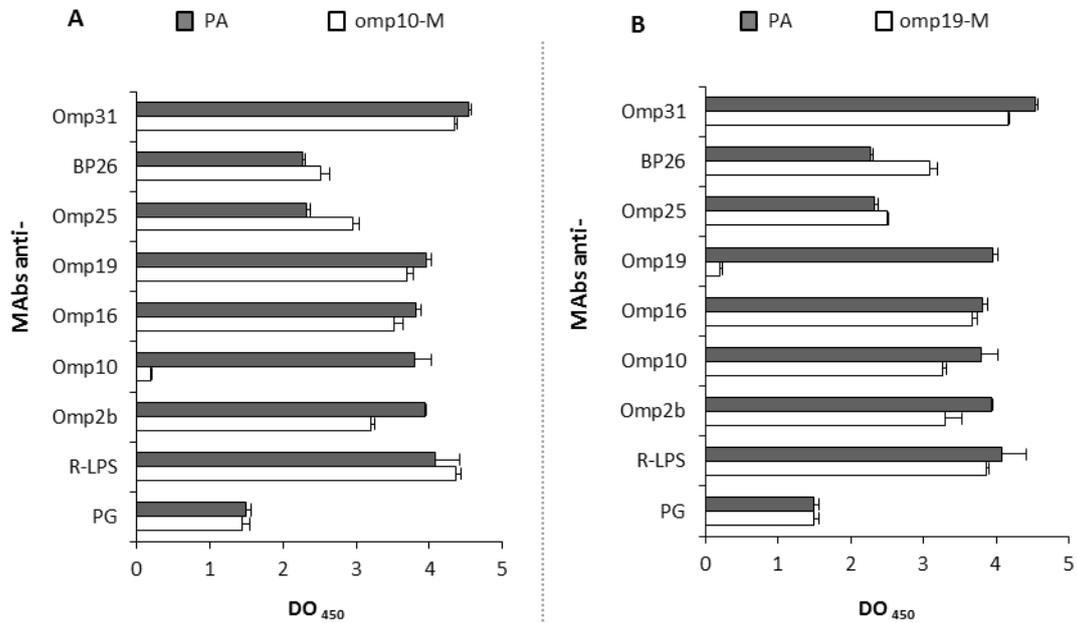


**Figura 23. Topología de la superficie bacteriana de los mutantes omp31-M, cgs-M, omp31/cgs-M, omp10/ugpB/omp31-M y omp10/omp31/omp25c-M mediante ELISA indirecto con MABs frente a distintas Omps, proteína periplásmica BP26, lipopolisacárido rugoso (R-LPS) y peptidoglucano (PG). Se representa la reactividad cada Mab con células inactivadas y sonicadas de *B. ovis* PA (barras grises) y de los mutantes (barras blancas). Los resultados se expresan como la media de la DO<sub>450</sub> ± DE de tres pocillos, tras eliminar el valor del blanco (tampón de dilución). En la parte superior de la figura se recoge el nombre del MAB utilizado para cada epítipo.**

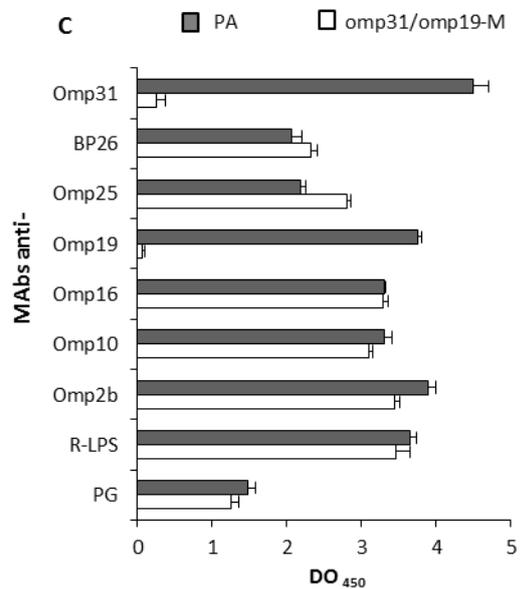
Anti PG: A76/03D06/A09  
 Anti R-LPS: A68/03F03/D05  
 Anti Omp2b: A68/15B06/C08

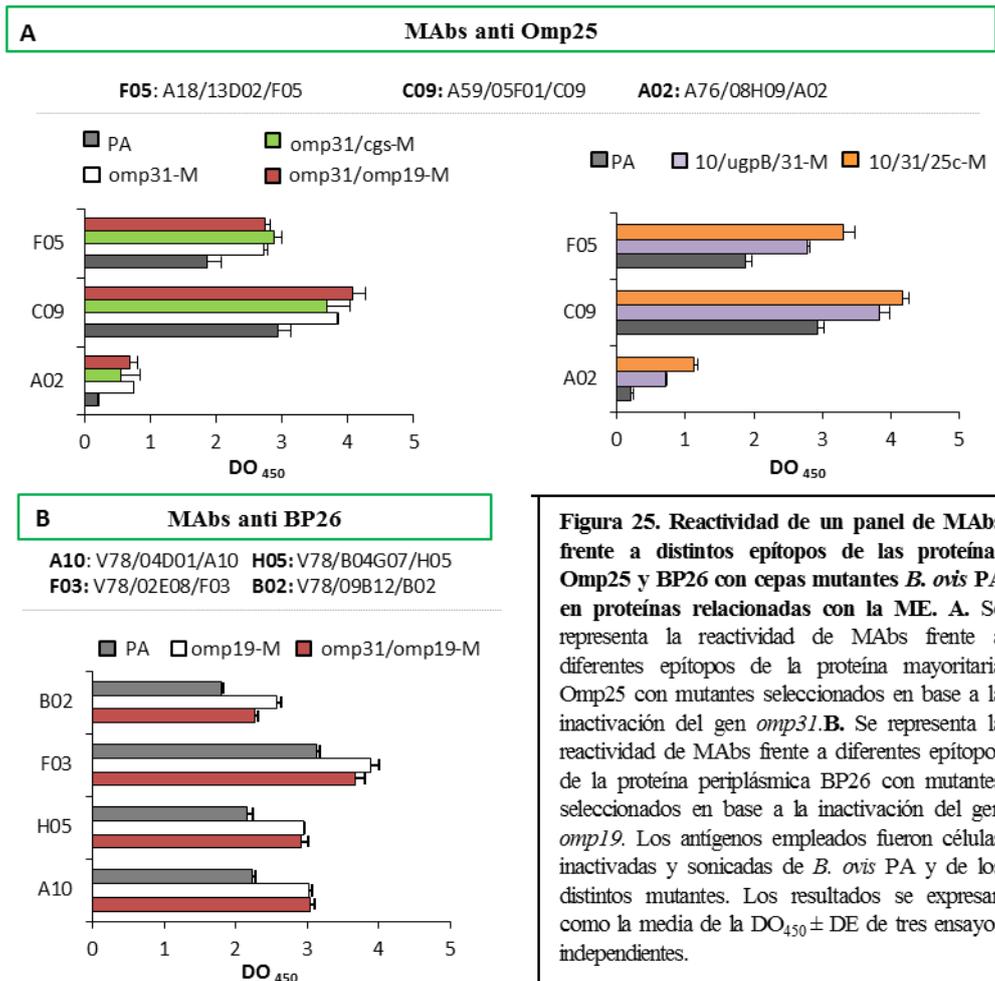
Anti Omp10: A68/07G11/C10  
 Anti Omp16: A76/08C03/G03  
 Anti Omp19: A76/18B02/D06

Anti Anti Omp25: A18/13D02/F05  
 Anti BP26: V78/09B12/B02  
 Anti Omp31: A59/10F09/G10



**Figura 24. Topología de la superficie bacteriana de los mutantes omp10-M, omp19-M y omp31/omp19-M, mediante ELISA indirecto con MABs frente a distintas Omps, proteína periplásmica BP26, lipopolisacárido rugoso (R-LPS) y peptidoglucano (PG).** Se representa la reactividad cada MAB con células inactivadas y sonicadas de *B. ovis* PA (barras grises) y de los mutantes (barras blancas). Los resultados se expresan como la media de la DO<sub>450</sub> ± DE de tres pocillos, tras eliminar el valor del blanco (tampón de dilución). En la parte superior de la figura se recoge el nombre del MAB utilizado para cada epítipo.





### 3. Estudio de las propiedades de la ME y de la virulencia en modelos celulares y en ratón de los mutantes seleccionados tras la caracterización preliminar

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el cribado preliminar y la predominancia de la mutación en el gen *omp31*, como marcaje serológico diferencial de posibles cepas vacunales, se seleccionaron los mutantes  $\Delta omp31\Delta cgs$  y  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$ , para caracterizarlos tanto *in vitro* como *in vivo* y así poder evaluar con mayor precisión su grado/perfil de atenuación y distintas propiedades relacionadas con la ME. Junto con ellos y con el fin de poder realizar comparaciones entre cepas que nos ayudaran a comprender su comportamiento, se llevaron a cabo una serie de ensayos en los que se incluyeron mutantes de la colección generada y otros disponibles en nuestro laboratorio.

#### 3.1. Propiedades de la membrana externa

Se analizó la capacidad de autoaglutinación en medio líquido y la sensibilidad de las cepas a agentes antimicrobianos empleados de manera común en la evaluación de alteraciones relacionadas con las propiedades de la ME de *Brucella*. De este modo se pretendió analizar si la atenuación observada *in vivo* podría estar relacionada con la introducción de modificaciones en la ME de las diferentes cepas. Los ensayos se realizaron tal y como se detalla en el **Apartado 7** de Materiales y Métodos.

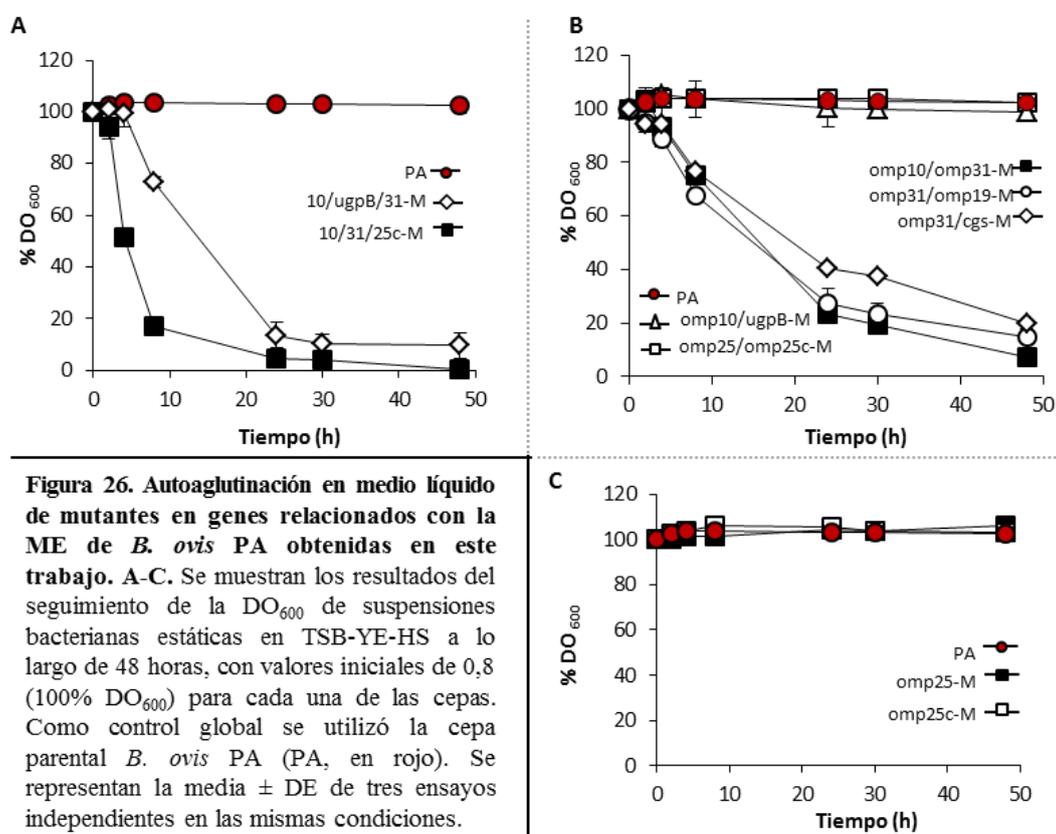
### 3.1.1. Capacidad de autoaglutinación

Para la realización de dicho estudio se prepararon suspensiones de cada cepa en medio líquido a una  $DO_{600}$  de 0,8 y posteriormente, en incubación estática, se fueron analizando las variaciones que sufría este valor de  $DO_{600}$  a distintos tiempos (**Apartado 7.1.** de Materiales y Métodos).

En este ensayo se observó, en comparación con *B. ovis* PA, una marcada capacidad de autoaglutinación en los mutantes con el gen *omp31* inactivado. Este comportamiento fue coherente con lo descrito en trabajos previos para el mutante  $\Delta omp31$  de *B. ovis* PA (Sancho., 2014). La capacidad de autoaglutinación más marcada se observó en los mutantes triples  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31 omp25c$  (**Figura 26 A**). Concretamente, éste último alcanzó los mayores niveles de sedimentación entre las cepas analizadas, registrándose valores de  $DO_{600}$  inferiores a los de *B. ovis* PA a las 2 horas en cultivo estático y valores aproximadamente del 50 % a las 4 horas. Transcurridas 48 horas esta cepa había aglutinado completamente en el fondo del tubo, con un valor del 0,69 % de  $DO_{600}$ . Esta disminución de la D.O. fue más marcada que la observada para el mutante doble  $\Delta omp10\Delta omp31$  (**Figura 26 B**). En el caso del triple mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  se registraron valores de D.O. aproximados del 72% a las 8 horas y del 15% a las 24 horas. En cambio, el mutante doble  $\Delta omp10\Delta ugpB$  se mantuvo en suspensión a lo largo del tiempo (**Figura 26 B**). Los mutantes simples  $\Delta omp31$  y  $\Delta cgs$  presentaron un perfil de sedimentación similar al del doble mutante  $\Delta omp31\Delta cgs$  y no se muestran en la figura.

Los mutantes  $\Delta omp10\Delta omp31$  y  $\Delta omp31\Delta omp19$  mostraron una marcada capacidad de sedimentación, observándose en ambas cepas valores D.O. similares a lo largo del tiempo (**Figura 26 B**).

Por último, los mutantes  $\Delta omp25$ ,  $\Delta omp25c$  y el doble mutante  $\Delta omp25\Delta omp25c$  se mantuvieron en suspensión de manera similar a *B. ovis* PA durante todo el experimento (**Figura 26 C**).



### 3.1.2. Sensibilidad a polimixina B, desoxicolato de sodio y peróxido de hidrógeno

Se realizaron varios ensayos encaminados a evaluar si la capacidad de resistencia al efecto bactericida de ciertos compuestos se veía alterada en las cepas mutantes. Se analizó la sensibilidad que mostraban las bacterias al péptido catiónico polimixina B y a desoxicolato de sodio (detergente aniónico). Para ello, se determinaron las tasas de supervivencia que presentaban los mutantes tras ser expuestos 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. En ambos casos, se consideró como 100% de supervivencia el recuento de UFC obtenido tras la incubación de cada cepa en presencia de PBS durante el mismo periodo de tiempo (**Apartados 7.2.** de Materiales y Métodos).

Como puede observarse en la **Tabla XII**, los mutantes simples  $\Delta omp10$ ,  $\Delta omp25$  y  $\Delta omp25c$  mostraron una sensibilidad a polimixina B, desoxicolato de sodio y a peróxido de hidrógeno similar a la de la cepa parental, sin diferencias estadísticamente significativas. En el caso del mutante simple  $\Delta omp31$  se observó una sensibilidad a polimixina B (% de supervivencia del  $26,50 \pm 1,38$ ) superior a la mostrada por *B. ovis* PA (% de supervivencia del  $71,25 \pm 5,30$ ) y no se observaron diferencias respecto a ésta tras la exposición del mutante al resto de compuestos. Dentro del grupo de los mutantes múltiples se observó una sensibilidad a polimixina B significativamente superior a la de *B. ovis* PA para todos ellos. Así, el mutante doble  $\Delta omp10\Delta ugpB$  presentó un porcentaje de supervivencia del  $56,30 \pm 8,48\%$ , el cual fue significativamente superior al del mutante simple  $\Delta omp10$  ( $P \leq 0,005$ ). La sensibilidad del mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB$  fue también mayor a la observada para el mutante simple  $\Delta ugpB$  (Apartado 1.2.2. de Resultados, **Tabla IX**). El resto de mutantes múltiples mostraron porcentajes de supervivencia inferiores al 26 % tras la exposición a polimixina B. En contraste a lo observado en los mutantes  $\Delta omp25$  y  $\Delta omp25c$ , el doble mutante en ambos genes fue significativamente más sensible que *B. ovis* PA a este péptido ( $P \leq 0,0005$ ), observándose una tasa de supervivencia del  $26,40 \pm 6,93\%$ . Los mutantes dobles  $\Delta omp10\Delta omp31$  y  $\Delta omp31\Delta omp19$  mostraron una sensibilidad a polimixina B similar a la del mutante simple  $\Delta omp31$ . Para el mutante  $\Delta omp31\Delta cgs$  se observó un porcentaje de supervivencia del  $20,64 \pm 2,42\%$ , siendo éste inferior al de los mutantes simples  $\Delta omp31$  y  $\Delta cgs$  ( $P \leq 0,0005$ ). La cepa que presentó la mayor mortalidad en polimixina B fue el mutante triple  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$ . Tan sólo un  $4,21 \pm 4,28\%$  de las células de esta bacteria fueron capaces de crecer tras la exposición al agente, presentando, además, una sensibilidad superior a la del correspondiente mutante doble  $\Delta omp10\Delta omp31$  ( $P \leq 0,0005$ ). Por último, el mutante triple  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  mostró un porcentaje de supervivencia ( $30,55 \pm 7,94\%$ ) significativamente inferior al de *B. ovis* PA y al del doble mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB$  ( $P \leq 0,0005$ ).

Respecto a la sensibilidad a desoxicolato de sodio el porcentaje de supervivencia mostrado por *B. ovis* PA fue del  $88,89 \pm 7,49\%$  y en los mutantes obtenidos no se observaron grandes diferencias en términos generales (**Tabla XII**). Tan sólo la tasa de supervivencia de los mutantes  $\Delta omp31\Delta omp19$  y  $\Delta omp31\Delta cgs$  ( $73,65 \pm 9,27\%$  y  $46,39 \pm 14,32\%$ , respectivamente) fue estadísticamente inferior a la de la cepa parental ( $P \leq 0,005$  y  $P \leq 0,0005$ , respectivamente), siendo el último también más sensible que el mutante simple  $\Delta omp31$  ( $P \leq 0,005$ ).

Para continuar con el estudio de la integridad de la ME de las cepas mutantes de *B. ovis* PA, se determinó su sensibilidad al peróxido de hidrógeno, compuesto producido en la explosión células fagocíticas y empleado por estas como mecanismo bactericida. A tal efecto, se extendieron 100  $\mu$ l de una suspensión en PBS de cada cepa a una  $DO_{600}$  de 0,2 en placas de TSA-YE-HS y, posteriormente, en cada una de ellas se depositó un disco de papel Whatman impregnado con 10  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno al 30%. Transcurridas 72 horas de incubación, se midieron los diámetros de los halos de inhibición generados y se calculó para cada cepa la media  $\pm$  DE de los valores obtenidos provenientes de tres placas independientes (**Apartado 7.3.** de Materiales y Métodos).

En este análisis se observó que los mutantes simples y el doble mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB$  se comportaron como *B. ovis* PA, con halos de inhibición de diámetros comprendidos entre 4,85-5,03 cm (**Tabla XII**). El resto de las cepas mostró una sensibilidad a peróxido de hidrógeno superior a la de *B. ovis* PA. Así, al contrario de lo observado en los mutantes simples en los genes *omp25* y *omp25c*, el mutante doble  $\Delta omp25\Delta omp25c$  mostró

una sensibilidad significativamente superior a la cepa parental ( $P \leq 0,005$ ). El doble mutante  $\Delta omp10\Delta omp31$  mostró una sensibilidad a este agente oxidante superior tanto a la de *B. ovis* PA, como a la del mutante simple  $\Delta omp10$  ( $P \leq 0,005$ ). En el caso del mutante  $\Delta omp31\Delta omp19$  se observó una sensibilidad similar a la del mutante simple  $\Delta omp31$ . Los mutantes triples  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  y  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  presentaron una marcada sensibilidad a peróxido de hidrógeno, significativamente superior a la cepa parental ( $P \leq 0,0005$  y  $P \leq 0,005$ , respectivamente). A su vez, la sensibilidad del mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  fue superior a la del correspondiente mutante doble ( $P \leq 0,005$ ). Por último, la cepa recombinante que presentó mayor sensibilidad a peróxido de hidrógeno fue el mutante  $\Delta omp31\Delta cgs$ . Ésta presentó un halo de inhibición de  $5,75 \pm 0,11$  cm de diámetro medio, superior al de *B. ovis* PA, como al de los mutantes simples  $\Delta omp31$  y  $\Delta cgs$ .

**Tabla XII.** Sensibilidad a la exposición a polimixina B, desoxicolato sódico y peróxido de hidrógeno de cepas mutantes de *B. ovis* PA en genes relacionados con la ME.

Cepas	% de supervivencia bacteriana a la exposición a		Diámetro del halo de inhibición (cm) $H_2O_2$
	polimixina B	desoxicolato sódico	
<i>B. ovis</i> PA	71,25 ± 5,30	88,89 ± 7,49	4,85 ± 0,14
<b>Mutantes simples</b>			
omp10-M <sup>1</sup>	73,14 ± 10,92	85,28 ± 4,65	4,85 ± 0,02
omp31-M <sup>2</sup>	26,50 ± 1,38 <sup>a</sup>	78,14 ± 4,22	5,18 ± 0,12
omp25-M <sup>3</sup>	67,52 ± 8,57	94,53 ± 3,86	5,01 ± 0,11
omp25c-M	72,58 ± 7,55	88,71 ± 7,96	5,03 ± 0,12
cgs-M	68,71 ± 9,50	68,71 ± 9,50	5,06 ± 0,06
<b>Mutantes dobles</b>			
omp25/omp25c-M	26,40 ± 6,93 <sup>a,(a3)</sup>	90,36 ± 11,87	5,22 ± 0,04 <sup>b</sup>
omp10/ugpB-M <sup>4</sup>	56,30 ± 8,48 <sup>c(c1)</sup>	79,11 ± 9,99	5,08 ± 0,21
omp10/omp31-M <sup>5</sup>	29,07 ± 9,33 <sup>a,(a1)</sup>	78,72 ± 7,91	5,41 ± 0,04 <sup>a(b1)</sup>
omp31/omp19-M	24,80 ± 4,64 <sup>a</sup>	73,65 ± 9,27 <sup>c</sup>	5,13 ± 0,15 <sup>c</sup>
omp31/cgs-M	20,64 ± 2,42 <sup>a</sup>	46,39 ± 14,32 <sup>b,(b2)</sup>	5,75 ± 0,11 <sup>a(b2)</sup>
<b>Mutantes triples</b>			
10/31/25c-M	4,21 ± 4,28 <sup>a,(a5)</sup>	79,58 ± 6,25	5,35 ± 0,25 <sup>a</sup>
10/ugpB/31-M	30,55 ± 7,94 <sup>a,(a4)</sup>	91,80 ± 5,41	5,26 ± 0,14 <sup>b(c4)</sup>

Se muestran la media ± DE ( $n=3$ ) de los porcentajes de supervivencia de cada cepa tras su exposición a polimixina B (1 mg/ml) y desoxicolato sódico (0,1 mg/ml) durante 80 minutos. El valor 100 % de supervivencia se calculó en cada cepa a partir de las UFC/placa obtenidas en incubaciones llevadas a cabo paralelamente en PBS sin agente. Así mismo, se recoge la media del diámetro del halo de inhibición producido por acción del peróxido de hidrógeno. Simbología: <sup>a</sup> $P \leq 0,0005$ ; <sup>b</sup> $P \leq 0,005$ ; <sup>c</sup> $P \leq 0,05$ , indican diferencias estadísticamente significativas entre el mutante y *B. ovis* PA o, entre paréntesis, las diferencias con el mutante empleado en la comparación (correspondencia entre números).

### 3.1.3. Sensibilidad a suero no inmune

También se analizó la supervivencia que presentaban las cepas mutantes tras su exposición durante 4 horas a suero humano no inmune. En este caso, el 100 % de supervivencia se calculó teniendo en cuenta las UFC/placa obtenidas tras incubar cada cepa en el mismo suero después de ser descomplementado durante 30 minutos a 56 °C (**Apartado 7.4.** de Materiales y Métodos).

Los porcentajes de supervivencia al suero no inmune que se obtuvieron en las cepas analizadas resultaron muy similares al mostrado por la cepa parental, con valores del 80-95 % (**Tabla XIII**). Sólo el mutante simple  $\Delta cgs$ , el mutante doble  $\Delta omp31\Delta cgs$  y el mutante triple  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  mostraron una mayor tasa de mortalidad tras la exposición al suero no inmune. El mutante doble  $\Delta omp31\Delta cgs$  mostró una sensibilidad similar

a la del mutante simple  $\Delta cgs$ . En el caso el mutante triple  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  sólo el  $34,13 \pm 18,65$  % de las células creció tras la exposición al suero ( $P \leq 0,0005$ ) (Tabla XIII).

**Tabla XIII.** Sensibilidad al suero humano no inmune de cepas mutantes en genes relacionados con la ME de *B. ovis* PA.

Cepas	% de supervivencia bacteriana a la exposición a suero humano NI <sup>(*)</sup>
<i>B. ovis</i> PA	87,11 ± 5,21
<b>Mutantes simples</b>	
omp10-M	86,29 ± 9,63
omp31M	80,47 ± 11,20
omp25-M	86,73 ± 4,99
omp25c-M	91,00 ± 10,56
cgs-M	68,00 ± 14,42 <sup>c</sup>
<b>Mutantes dobles</b>	
omp25/omp25c-M	83,80 ± 2,52
omp10/ugpB-M	84,27 ± 7,22
omp10/omp31-M <sup>1</sup>	95,27 ± 8,39
omp31/omp19-M	89,60 ± 21,97
omp31/cgs-M	69,83 ± 6,08 <sup>c</sup>
<b>Mutantes triples</b>	
10/31/25c-M	34,13 ± 18,65 <sup>a, (a1)</sup>
10/ugpB/31-M	75,73 ± 7,94

(\*) NI: No inmune. Se muestra la media ± D.E. ( $n=3$ ) de los porcentajes de supervivencia de cada cepa tras su exposición a suero humano NI durante 4 horas. El valor del 100 % de supervivencia fue el obtenido tras la incubación de cada una de ellas con suero humano NI descomplementado. Simbología: <sup>a</sup> $P \leq 0,0005$ ; <sup>c</sup> $P \leq 0,05$ , indican diferencias estadísticamente significativas entre el mutante y *B. ovis* PA o, entre paréntesis, las diferencias con el mutante empleado en la comparación (correspondencia entre números).

### 3.2. Ensayos de virulencia en modelos celulares de infección

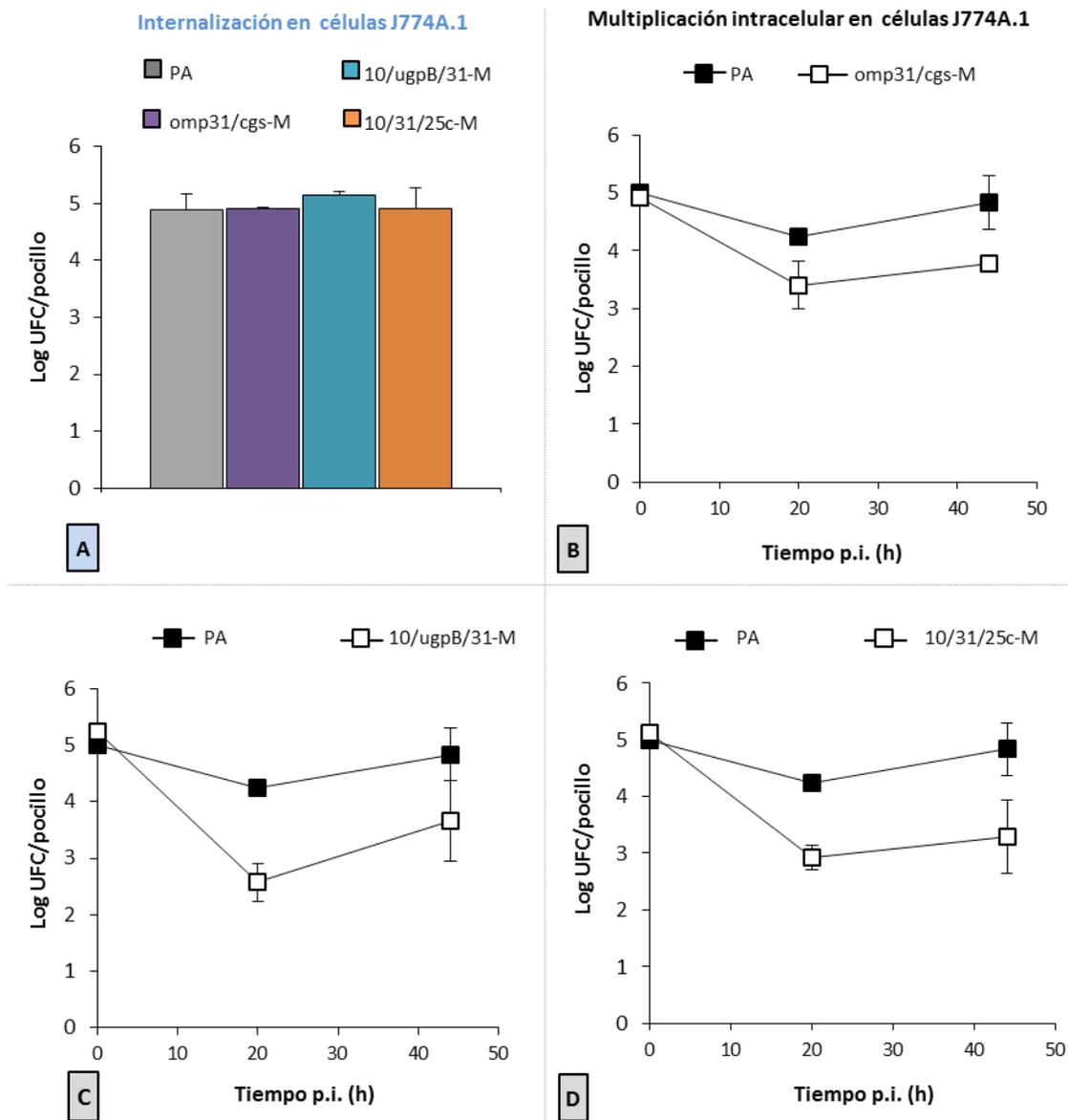
Como parte de la caracterización de los mutantes  $\Delta omp31\Delta cgs$ ,  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  se analizó su capacidad de infección y la cinética de multiplicación intracelular en macrófagos murinos J774A.1 y células HeLa. Para ello, se emplearon cultivos con  $2 \times 10^4$  células de macrófagos murinos y de  $1,5 \times 10^4$  células HeLa, los cuales se incubaron con  $4 \times 10^6$  UFC y  $8 \times 10^6$  UFC, respectivamente, de las distintas cepas. Transcurrido el tiempo de penetración y tras la eliminación de bacterias extracelulares, se lisaron los cultivos a distintos tiempos p.i. y se realizaron recuentos en placa de las UFC/pocillo obtenidas de las distintas cepas. Las condiciones detalladas de los ensayos en ambas líneas celulares se recogen en el **Apartado 9** de Materiales y Métodos. Los resultados expuestos a continuación son representativos de al menos 3 ensayos repetidos en las mismas condiciones, en los que se obtuvieron resultados similares.

### 3.2.1. Comportamiento en macrófagos J774.A1

En las condiciones empleadas, los mutantes  $\Delta omp31\Delta cgs$ ,  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  mostraron una capacidad de internalización en macrófagos murinos similar a la de la cepa parental (**Figura 27 A**), alcanzándose niveles de UFC de aproximadamente 5 Log en el primer tiempo de muestreo. En cambio, al analizar el perfil de multiplicación intracelular de cada cepa se observaron diferencias respecto al comportamiento mostrado por *B. ovis* PA. Los niveles intracelulares de *B. ovis* PA disminuyeron en un orden de 0,8 Log UFC a las 20 h p.i., consiguiendo a partir de ahí multiplicarse hasta alcanzar a las 44 h p.i. niveles de infección muy similares a los mostrados al inicio. Los tres mutantes presentaron una reducción de los recuentos intracelulares a las 20 horas p.i. más acusados que en *B. ovis* PA. Sin embargo, a partir de ese momento los tres fueron capaces de sobrevivir e incrementar el número de UFC intracelulares, aunque los recuentos obtenidos a las 44 horas p.i. fueron del orden de 1-1,5 Log UFC inferiores a los obtenidos con la cepa parental (**Figura 27 B-D**).

El comportamiento intracelular en macrófagos J774.A1 de los mutantes  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  se visualizó también por microscopía confocal de inmunofluorescencia en comparación con la cepa parental *B. ovis* PA y el mutante *virB2* obtenido anteriormente y que presenta graves defectos de supervivencia intracelular en esta línea celular (Martín-Martín *et al.*, 2012). Las distintas cepas de *B. ovis* se marcaron, como se describe en el **Apartado 9.4.** de Materiales y Métodos, con un MAb anti R-LPS (color verde en este trabajo). Un segundo tipo de marcaje realizado fue el de la proteína Lamp-1 (proteína de membrana de lisosomas) (color rojo en este trabajo) que suele presentar colocalización con cepas de *Brucella* que no se multiplican en células fagocíticas (Celli *et al.*, 2003; Macedo *et al.*, 2015).

Coincidiendo con los resultados obtenidos en el análisis de la supervivencia y multiplicación intracelular de las cepas de *B. ovis* en macrófagos (**Figura 27**), se observó una colonización inicial de los mutantes  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  (**Figura 28C**) y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  (**Figura 28D**) similar a la de la cepa parental *B. ovis* PA (**Figura 28A**). En los macrófagos infectados con ésta, al contrario de lo observado en los infectados con el mutante  $\Delta virB2$  (**Figura 28 B**), no se observó una colocalización generalizada de las vacuolas con el marcador Lamp-1 a lo largo del tiempo (**Figura 28A**). Todas las cepas mostraron cierta colocalización con el marcador Lamp-1 (la colocalización de la bacteria con Lamp-1 se detecta en amarillo) a partir de las 20 h p.i., siendo esta más frecuente en el caso del mutante  $\Delta virB2$  (**Figura 28**). Sin embargo, mientras que la mayoría de bacterias del mutante  $\Delta virB2$  mantuvo la asociación con Lamp-1 a las 44 h p.i. (**Figura 28 B**), tanto la cepa parental como los mutantes  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  fueron capaces de multiplicarse de manera importante en algunos macrófagos J774.A1, aunque en distinto grado, evitando la asociación con Lamp-1. Así, aproximadamente un 10 % de los macrófagos se observaron cargados de *B. ovis* PA a las 44 h p.i. (**Figura 28 A** y datos no mostrados) mientras que el porcentaje de este tipo de macrófagos fue de aproximadamente el 3% en el caso de los mutantes  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  (**Figura 28 C-D** y datos no mostrados).



**Figura 27.** Análisis de la internalización (A) y (B-D) cinética de multiplicación intracelular en macrófagos murinos J774A.1 de *B. ovis* PA y de los mutantes  $\Delta omp31\Delta cgs$ ,  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  obtenidos en este trabajo. Los cultivos confluentes de macrófagos murinos J774A.1 ( $2 \times 10^4$  células/pocillo) se incubaron durante 2 horas con suspensiones de *B. ovis* PA y de las cepas mutantes ( $4 \times 10^6$  UFC/pocillo). A. Transcurrido el tiempo de penetración, las células se incubaron 1 hora en medio suplementado con gentamicina, se lisaron y se realizaron recuentos de UFC en placa. B-D. Cinética de multiplicación intracelular de las distintas cepas tras lisar las células en las mismas condiciones a distintos tiempos p.i. Se representa la media  $\pm$  D.E. ( $n=3$ ) del logaritmo de UFC intracelulares viables por pocillo obtenidas (recuento en placa).

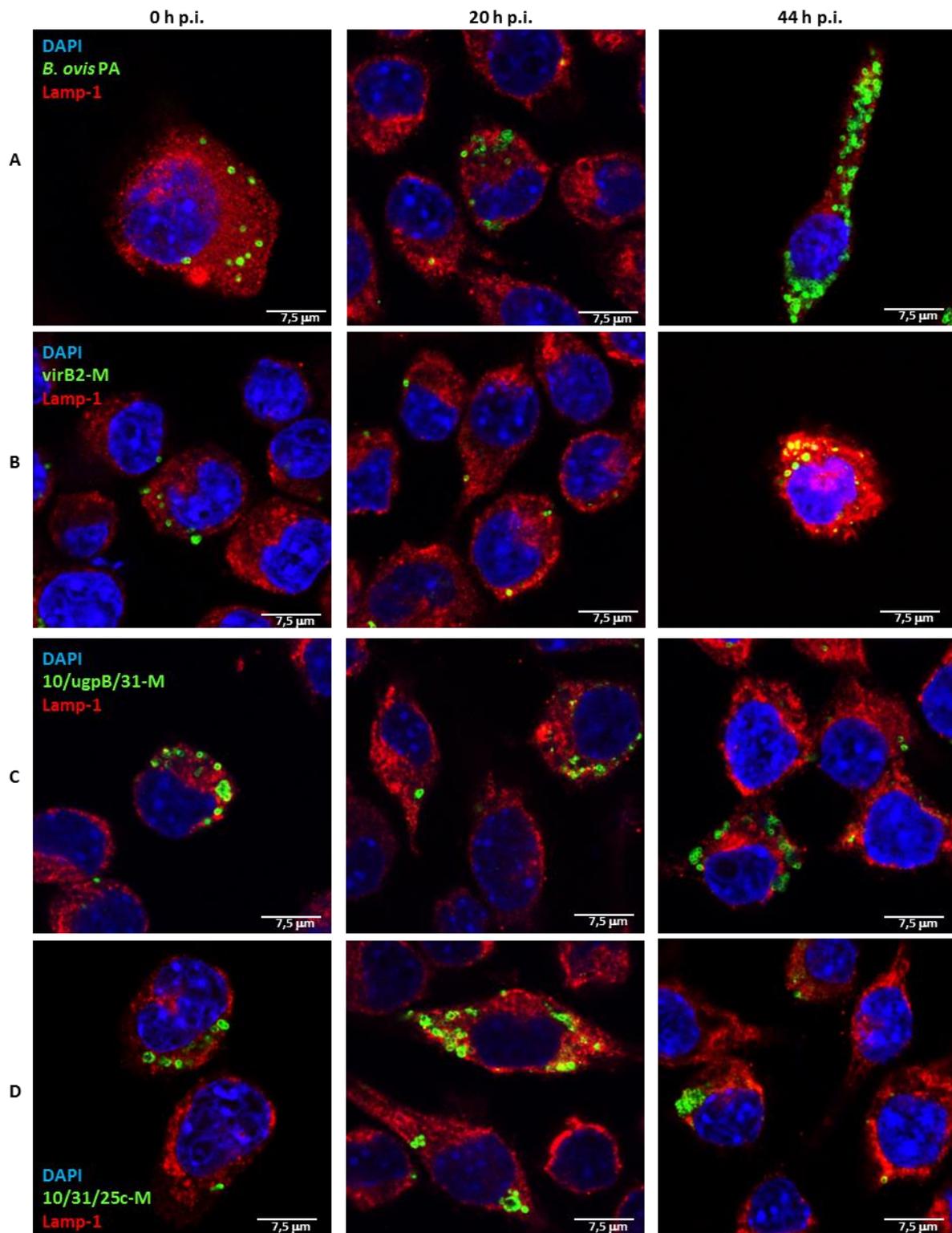


Figura 28. Colonización intracelular de *B. ovnis* PA y los mutantes derivados  $\Delta virB2$ ,  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  en macrófagos murinos J774A.1. Imágenes representativas de microscopía confocal de macrófagos murinos expresando Lamp-1 (proteína de membrana de lisosomas) (rojo) transcurridas 0, 20 y 44 h de la infección con *B. ovnis* PA (fila A) o con las cepas mutantes (marcaje con MAb D05 anti R-LPS) (verde) (filas B-D).

### 3.2.2. Comportamiento en células epiteliales HeLa

En primer lugar, se analizó la capacidad de internalización en células HeLa que presentaban los mutantes  $\Delta omp31\Delta cgs$ ,  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$ , observándose diferencias significativas respecto al comportamiento de la cepa parental (**Figura 29 A**). En concreto, los mutantes  $\Delta omp31\Delta cgs$  y  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  mostraron niveles de UFC intracelulares del orden de 1 Log superiores a los de *B. ovis* PA ( $P \leq 0,0001$ ). En cambio, el mutante  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  presentó una capacidad de invasión en células HeLa del orden de 1,5 Log inferior a la de la cepa parental ( $P \leq 0,0001$ ).

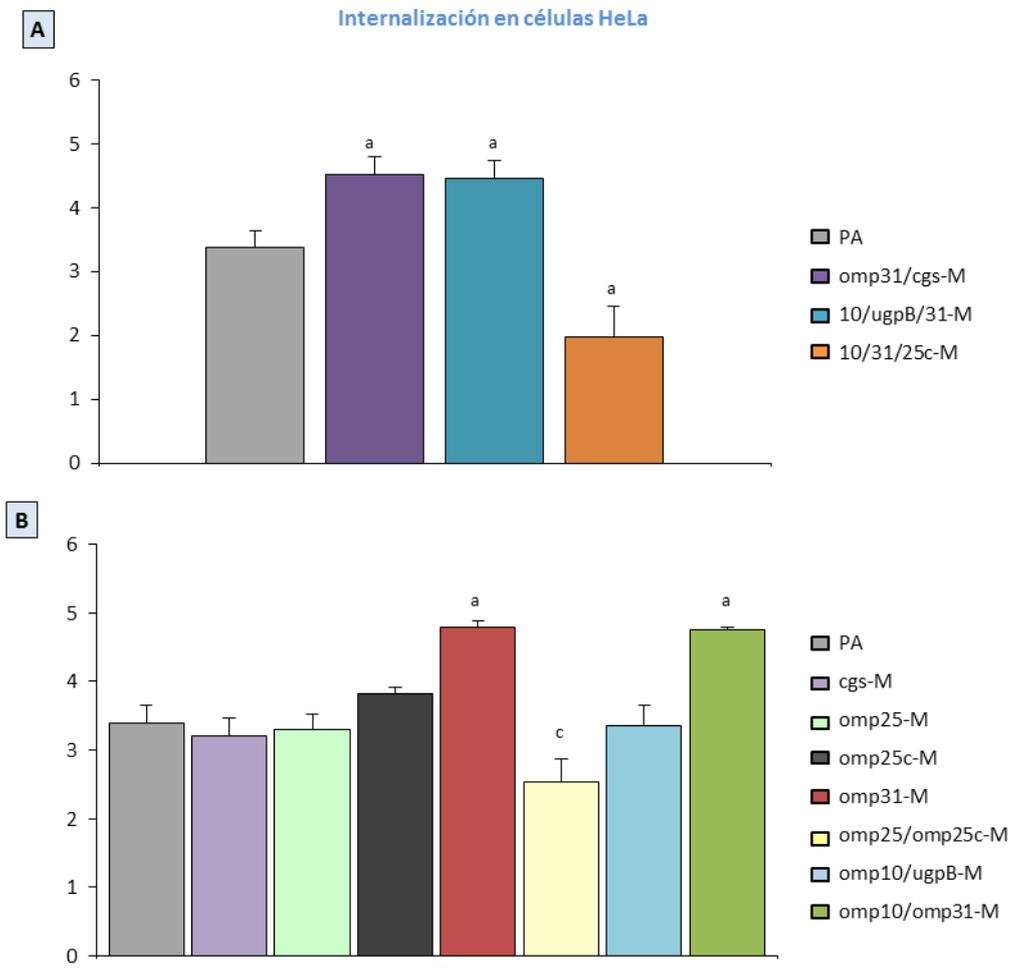
En base a las diferencias observadas, se analizaron en segundo lugar los mutantes simples y dobles correspondientes (**Figura 29 B**). El mutante simple  $\Delta omp31$  mostró niveles de UFC intracelulares de aproximadamente 1 Log superiores a los observados para la cepa parental y el mutante simple  $\Delta cgs$  se comportó como *B. ovis* PA. Un comportamiento similar al mutante simple  $\Delta omp31$  se observó también en el mutante  $\Delta omp10\Delta omp31$  mientras que la capacidad de invasión de los mutantes simples  $\Delta omp25$  y  $\Delta omp25c$  fue similar a la de la cepa parental. En cambio, la capacidad de internalización del doble mutante  $\Delta omp25\Delta omp25c$  fue del orden de 1 Log inferior a la de *B. ovis* PA ( $P \leq 0,005$ ). Por último, los niveles intracelulares del mutante doble  $\Delta omp10\Delta ugpB$  fueron similares a los de la cepa parental (**Figura 29 B**), al igual que lo descrito para los mutantes simples  $\Delta omp10$  (Sidhu-Muñoz *et al.*, 2016) y  $\Delta ugpB$  (**Figura 14 C**, **Apartado 1.3.** de Resultados).

En tercer lugar, y de acuerdo con las diferencias observadas en la capacidad de penetración de las distintas cepas, se analizó la cinética de multiplicación intracelular de las mismas (**Figura 30**). Al igual que lo descrito en el **Apartado 3** de Resultados en el análisis de los mutantes  $\Delta bepC$  y  $\Delta ugpB$ , la cepa parental presentó un descenso de UFC intracelulares a las 20 h p.i. y un ligero incremento en los recuentos hasta el final del experimento a 44 h p.i. En los mutantes que portaban la inactivación del gen *omp31* en los que se había observado una mayor capacidad de internalización ( $\Delta omp31$ ,  $\Delta omp31\Delta cgs$ ,  $\Delta omp10\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ ), se observó una reducción de aproximadamente 0,5 Log de UFC intracelulares a las 20 h p.i., aunque los niveles de infección fueron del orden de 1 Log superiores a los observados en la cepa parental (**Figura 30 A-D**). A partir de este momento, los recuentos intracelulares de los mutantes  $\Delta omp31$  y  $\Delta omp31\Delta cgs$  se mantuvieron estables hasta el final del experimento, mientras que los recuentos de los mutantes  $\Delta omp10\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  continuaron descendiendo hasta alcanzar valores similares a los de la cepa parental a las 44 h p.i. (**Figura 30 A-D**). En el caso del mutante simple  $\Delta cgs$  no se observaron diferencias en la cinética de multiplicación intracelular respecto a *B. ovis* PA (**Figura 30 B**), como tampoco se observaron en el caso de del mutante doble  $\Delta omp10\Delta ugpB$  y de los mutantes simples  $\Delta omp10$  (Sidhu-Muñoz *et al.*, 2016) y  $\Delta ugpB$  (**Figura 14 D**, **Apartado 1.3.** de Resultados). En contraste a lo observado en las demás cepas portadoras de la delección en el gen *omp31*, el mutante triple  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  mostró una capacidad de penetración y replicación en células HeLa muy limitada

Aunque la inactivación de los genes *omp25* y *omp25c* de forma independiente no afectó, en las condiciones empleadas, a la capacidad de multiplicación intracelular de *B. ovis* PA en células HeLa (**Figura 30 E-F**), el doble mutante  $\Delta omp25\Delta omp25c$  mostró niveles inferiores (del orden de 1-1,5 unidades logarítmicas inferiores en función del punto de muestreo) a los de la cepa parental a lo largo de todo el experimento (**Figura 30 G**).

Para intentar comprender el comportamiento en células HeLa de los mutantes  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  (con mayor capacidad de internalización que la cepa parental) y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  (con recuentos intracelulares inferiores desde el inicio del experimento) se realizó un análisis por microscopía confocal de inmunofluorescencia en comparación con la cepa parental y el mutante  $\Delta virB2$  obtenido anteriormente y que presenta graves defectos de supervivencia en células HeLa (Martín-Martín *et al.*, 2012). La metodología empleada para el marcaje de las bacterias y la proteína Lamp-1 lisosomal se describe en el **Apartado 9.4.** de Materiales y Métodos.

La cepa parental *B. ovis* PA presentó una internalización en células epiteliales HeLa (**Figura 31 A**) inferior a la observada en macrófagos J774.A1 (**Figura 28 A**), observándose bacterias en un número muy limitado de células HeLa al inicio del experimento. Estos resultados son coherentes con los obtenidos en los experimentos de recuentos intracelulares de *B. ovis* PA en los dos tipos celulares (**Figuras 27 y 29**). Se pudo detectar con frecuencia la asociación de *B. ovis* PA con la proteína Lamp-1 a las 20 h p.i. (la colocalización de la bacteria con Lamp-1 se detecta en amarillo), pero algunas bacterias fueron capaces de eludir la destrucción intracelular y a las 44 h p.i. se observaron células HeLa en las que la bacteria había conseguido multiplicarse (**Figura 31 A**). Por el contrario, el mutante  $\Delta virB2$  presentó mayoritariamente asociación con Lamp-1 incluso a las 44 h p.i. (**Figura 31 B**). Los resultados obtenidos con los mutantes  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  (**Figura 31 C-D**) también fueron coherentes con los obtenidos en el experimento de cinética intracelular (**Figura 30**). Así, la presencia de células HeLa que habían internalizado varias bacterias del mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  se observó con bastante frecuencia a tiempo 0 p.i. (**Figura 31 C**), lo que explica los mayores recuentos intracelulares obtenidos con este mutante, en comparación con la cepa parental, a tiempo 0 p.i. (**Figura 30 C**). Sin embargo, a partir de ese momento y hasta las 44 h p.i. las bacterias internalizadas se asociaron con frecuencia, aunque no en todos los casos, al marcador Lamp-1 (**Figura 31 C**), lo que podría estar relacionado con la disminución observada en el número de bacterias viables intracelulares después de la penetración en las células HeLa (**Figura 30 C**). En el caso del mutante  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$ , los menores recuentos intracelulares obtenidos al inicio del experimento se correspondieron más con un defecto en la penetración, manifestado por la dificultad para encontrar células HeLa con bacterias en su interior, que con una mayor destrucción intracelular (**Figura 31 D**). Esta reducida internalización, conlleva además la ausencia de replicación hasta las 44 h p.i. ya que en los tres tiempos analizados resultó difícil encontrar bacterias intracelulares y solo se observaron grupos de bacterias asociadas al exterior de la célula HeLa o en espacios intercelulares (**Figura 31 D**).



**Figura 29. Análisis de la internalización en células epiteliales HeLa de *B. ovis* PA y de los mutantes  $\Delta omp31\Delta cgs$ ,  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  obtenidos en este trabajo (A).** Los cultivos confluentes de células HeLa ( $1,5 \times 10^4$  células/pocillo) se incubaron durante 2 horas con suspensiones de *B. ovis* PA y las cepas mutantes ( $8 \times 10^6$  UFC/pocillo). Transcurrido el tiempo de penetración, las células se incubaron 1 hora en medio suplementado con gentamicina, se lisaron las células y se realizaron recuentos en placa. Se representa la media  $\pm$  DE ( $n=3$ ) del logaritmo de UFC intracelulares viables/pocillo. Simbología: <sup>a</sup>  $P \leq 0,0005$ ; <sup>c</sup>  $P \leq 0,05$  indican diferencias estadísticamente significativas entre el mutante y *B. ovis* PA. **B.** Para establecer las comparaciones, se emplearon los respectivos mutantes simples y dobles.

Multiplicación intracelular en células HeLa

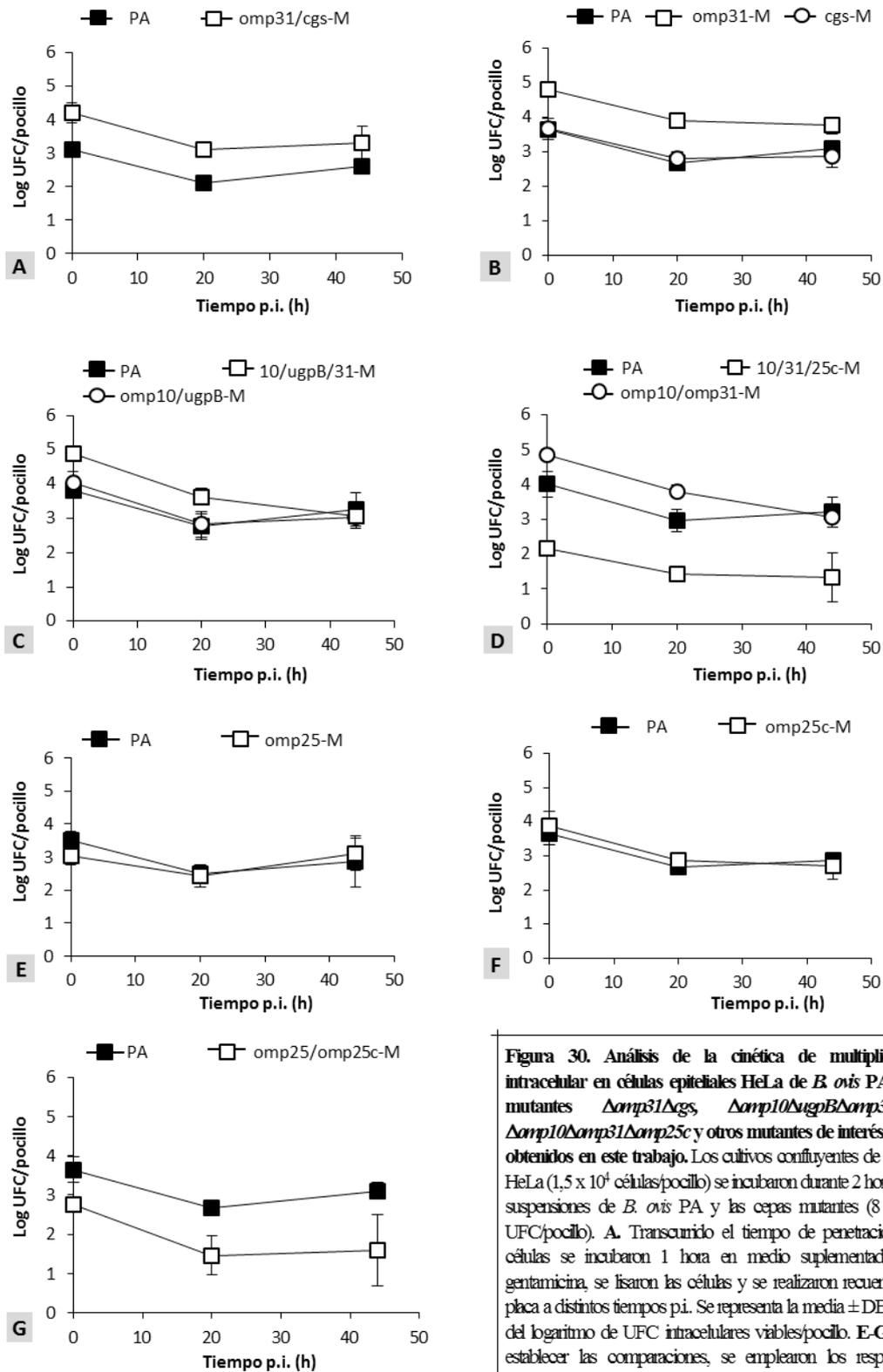


Figura 30. Análisis de la cinética de multiplicación intracelular en células epiteliales HeLa de *B. ovis* PA y los mutantes  $\Delta omp31\Delta cgs$ ,  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ ,  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  y otros mutantes de interés (A-D) obtenidos en este trabajo. Los cultivos confluentes de células HeLa ( $1,5 \times 10^4$  células/pocillo) se incubaron durante 2 horas con suspensiones de *B. ovis* PA y las cepas mutantes ( $8 \times 10^6$  UFC/pocillo). A. Transcurrido el tiempo de penetración, las células se incubaron 1 hora en medio suplementado con gentamicina, se lisaron las células y se realizaron recuentos en placa a distintos tiempos p.i. Se representa la media  $\pm$  DE ( $n=3$ ) del logaritmo de UFC intracelulares viables/pocillo. E-G. Para establecer las comparaciones, se emplearon los respectivos mutantes simples y dobles y el mutante  $\Delta omp25\Delta omp25c$ .

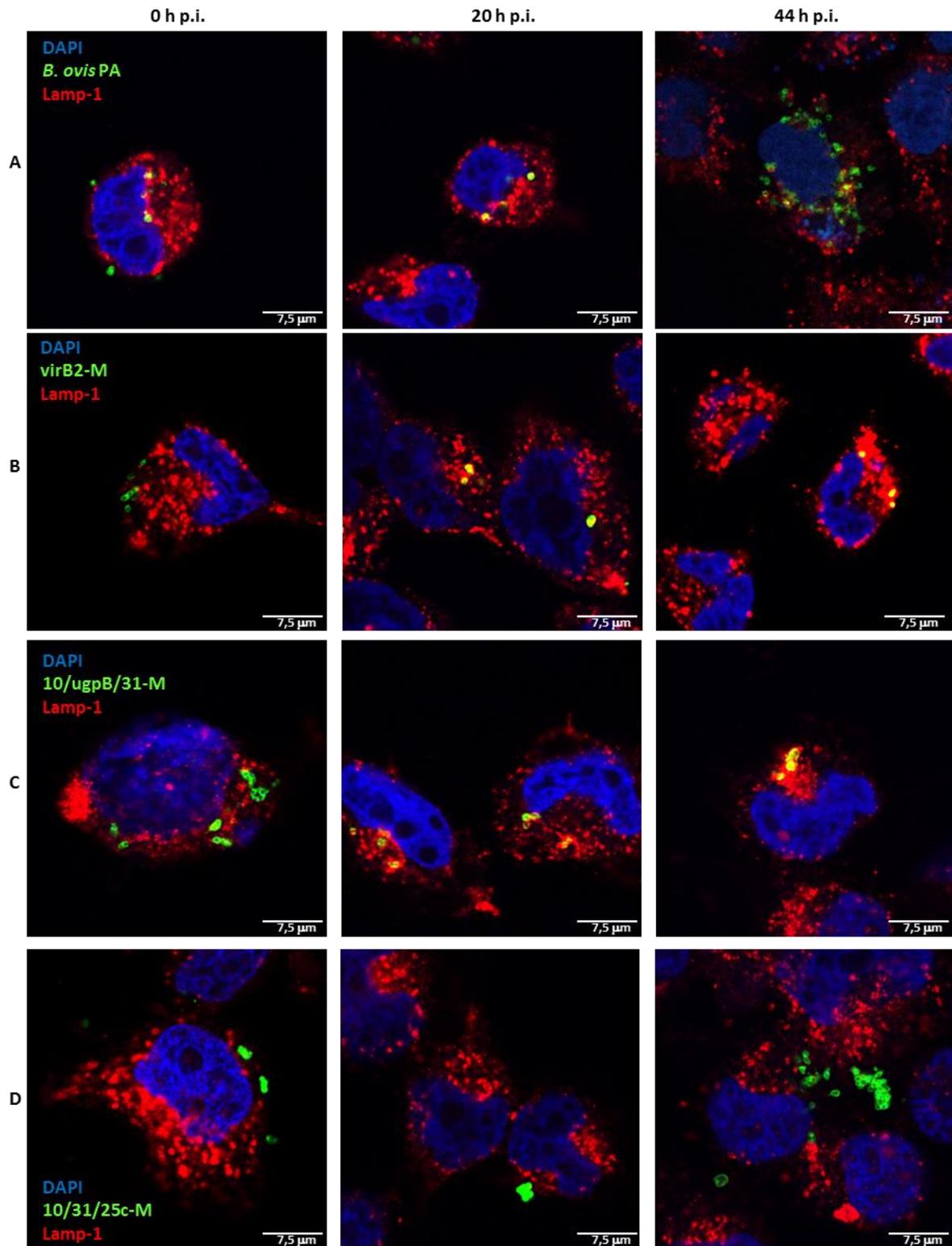


Figura 31. Colonización intracelular de *B. ovis* PA y los mutantes derivados  $\Delta virB2$ ,  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  en células epiteliales HeLa. Imágenes representativas de microscopía confocal de células epiteliales expresando Lamp-1 (proteína de membrana de lisosomas) (rojo) transcurridas 0, 20 y 44 h de la infección con *B. ovis* PA (fila A) o con las cepas mutantes (marcaje con MAb D05 anti R-LPS) (verde) (filas B-D).

### 3.3. Evaluación en modelo murino de los mutantes atenuados $\Delta omp31\Delta cgs$ , $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ y $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$ en la dosis vacunal

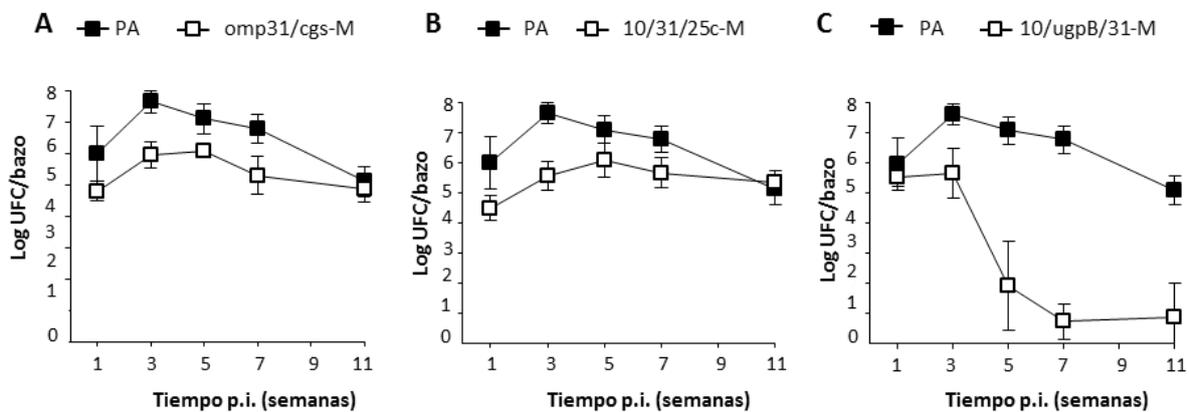
Considerando la atenuación mostrada por los mutantes  $\Delta omp31\Delta cgs$ ,  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  en el análisis preliminar de la virulencia y la dosis empleada habitualmente en el estudio de vacunas atenuadas en modelo murino frente a *Brucella* (Grilló *et al.*, 2006; Soler-Lloréns *et al.*, 2014; Sancho *et al.*, 2014), se empleó una dosis de inoculación de  $10^8$  UFC/ratón para evaluar la persistencia de las cepas (analizada en bazo) y la respuesta inmune humoral inducida en los ratones (**Apartado 10.3** de Materiales y Métodos). A tal efecto, se analizó la cinética de colonización esplénica de los mutantes hasta la semana 11 p.i. Así mismo, se evaluó el nivel de anticuerpos reactivos frente a *B. ovis* PA en el suero de los ratones de cada grupo experimental en cada tiempo analizado, incluyendo como control negativo el grupo inoculado con PBS (**Apartado 10.3.1.** de Materiales y métodos). También se evaluó el título de anticuerpos séricos en los ratones empleados en el cribado preliminar de los mutantes atenuados ( $10^6$  UFC/ratón) con el objetivo de poder comparar las posibles diferencias en la respuesta humoral en función de la dosis administrada.

En el análisis de la persistencia de *B. ovis* PA se observó cómo los recuentos en bazo fueron aumentando hasta alcanzar el máximo de colonización a la semana 3 p.i. (Log UFC  $7,64 \pm 0,35$ ), punto a partir del cual el nivel de infección fue disminuyendo progresivamente hasta situarse en valores de 5 unidades logarítmicas al final del experimento (semana 11 p.i.) (**Figura 32**). En cambio, en los ratones inoculados con los mutantes  $\Delta omp31\Delta cgs$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$ , los niveles de infección en la semana 1 p.i. fueron aproximadamente 2 Log inferiores respecto a los observados en la cepa parental. Además, el máximo infección se alcanzó a la semana 5 p.i., siendo también inferior a *B. ovis* PA. Sin embargo, ambos mutantes mostraron recuentos esplénicos en la semana 11 p.i. similares a los de la cepa parental (**Figura 32 A-B**). El mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  presentó niveles en bazo similares a los de la cepa parental en la semana 1 p.i. (**Figura 32C**). Sin embargo, mientras que la cepa parental experimentó un incremento de los recuentos esplénicos en la semana 3 p.i., los niveles del mutante triple se mantuvieron estables. A partir de este pico máximo en la infección del mutante, se observó una disminución drástica de los recuentos en el bazo, con una caída de aproximadamente 3 unidades logarítmicas en la semana 5 p.i. Los recuentos continuaron disminuyendo significativamente hasta la semana 11 p.i., donde el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  se detectó su presencia tan solo en uno de los bazos analizados.

En el análisis del peso de los bazos también se observaron diferencias significativas respecto a los observados en los animales inoculados con la cepa parental (**Figura 32 D**). Todos los mutantes produjeron una esplenomegalia inferior a la producida por *B. ovis* PA a lo largo del tiempo. Especialmente destacable es el caso del mutante  $\Delta omp31\Delta cgs$ , en el que, a pesar de los elevados recuentos esplénicos observados a lo largo de todo el experimento, los pesos de los bazos fueron similares a los observados en los animales no infectados e inoculados con PBS (**Figura 32D**).

El análisis de los niveles de anticuerpos séricos de tipo IgG se realizó frente a células enteras de *B. ovis* PA mediante i-ELISA (**Apartado 10.3.2.** de Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos en este análisis se recogen en la **Figura 33**. En los animales inoculados con el mutante  $\Delta omp31\Delta cgs$  a la dosis vacunal de  $10^8$  UFC/ratón, se observó un retraso en la aparición de anticuerpos con respecto a los niveles inducidos por *B. ovis* PA (**Figura 33 A**). Así, a la semana 3 p.i. el título de IgG en los animales inoculados con el mutante  $\Delta omp31\Delta cgs$  fue aproximadamente 1,3 unidades logarítmicas inferior al detectado en el suero de los ratones inoculados con la cepa parental ( $P \leq 0,0005$ ). A partir de este punto, el mutante  $\Delta omp31\Delta cgs$  indujo una respuesta inmune humoral similar a la producida por *B. ovis* PA, con una ligera disminución en los niveles de anticuerpos a la semana 11 p.i. ( $P=0,044$ ). La respuesta humoral inducida por el mutante triple  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  a la dosis vacunal no se detectó hasta la semana 3 p.i., momento en el que indujo niveles de IgG similares a los desencadenados por la cepa parental. A partir de este punto, el título de anticuerpos presentes en suero se incrementó progresivamente y se mantuvo estable hasta la semana 11 p.i. (**Figura 33 C**). En cambio, el mutante

triple  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ , indujo niveles elevados de anticuerpos de la clase IgG frente a *B. ovis* PA detectables desde la semana 1 p.i y su concentración fue superior ( $P \leq 0,0001$ ) a la producida por la cepa parental a partir de la semana 5 p.i., manteniéndose las diferencias en el título de anticuerpos hasta el final del experimento (Figura 33 C). Por último, la inoculación en dosis  $10^6$  UFC/ratón de los mutantes produjo niveles de IgG frente a *B. ovis* PA marcadamente inferiores ( $P \leq 0,0001$ ) a los detectados tras la inoculación en la dosis vacunal y también a los detectados en ratones inoculados con la cepa parental en dosis  $10^6$  UFC/ratón (Figura 33 D).



D

Tiempo p.i. (semanas)	peso de bazos (g) (media $\pm$ DE)				
	PBS	PA	omp31/cgs-M	10/31/25c-M	10/ugpB/31-M
1	0,089 $\pm$ 0,01	0,102 $\pm$ 0,03	0,087 $\pm$ 0,01	0,098 $\pm$ 0,01	0,097 $\pm$ 0,01
3	0,085 $\pm$ 0,02	0,478 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,090 $\pm$ 0,05 <sup>(a)</sup>	0,100 $\pm$ 0,01 <sup>(a)</sup>	0,135 $\pm$ 0,03 <sup>c(a)</sup>
5	0,096 $\pm$ 0,01	0,285 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,107 $\pm$ 0,02 <sup>(a)</sup>	0,173 $\pm$ 0,05 <sup>b(a)</sup>	0,126 $\pm$ 0,07 <sup>(a)</sup>
7	0,097 $\pm$ 0,01	0,341 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,100 $\pm$ 0,01 <sup>(a)</sup>	0,140 $\pm$ 0,02 <sup>c(a)</sup>	0,106 $\pm$ 0,01 <sup>(a)</sup>
11	0,098 $\pm$ 0,01	0,205 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,095 $\pm$ 0,01 <sup>(a)</sup>	0,131 $\pm$ 0,02 <sup>(a)</sup>	0,124 $\pm$ 0,02 <sup>(a)</sup>

Figura 32. Análisis de la colonización esplénica en ratones BALB/c de los mutantes  $\Delta omp31\Delta cgs$ ,  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  de *B. ovis* PA a la dosis vacunal seleccionada ( $1 \times 10^8$  UFC/ratón). A-C. Se muestran los recuentos bacterianos obtenidos de cada cepa en el bazo de los ratones a lo largo de 11 semanas p.i. expresados como la media  $\pm$  DE ( $n=5$ ) del Log UFC/bazo. D. Peso de los bazos (gramos) a lo largo del tiempo de los ratones empleados en el análisis de la persistencia en los apartados A-D y el grupo inoculado con PBS. Simbología: <sup>a</sup>  $P \leq 0,0005$ ; <sup>b</sup>  $P \leq 0,005$ ; <sup>c</sup>  $P \leq 0,05$  con respecto al peso de los bazos de ratones inoculados con PBS y obtenido en cada tiempo. Entre paréntesis se indican las diferencias respecto al peso de los bazos de ratones inoculados con *B. ovis* PA.

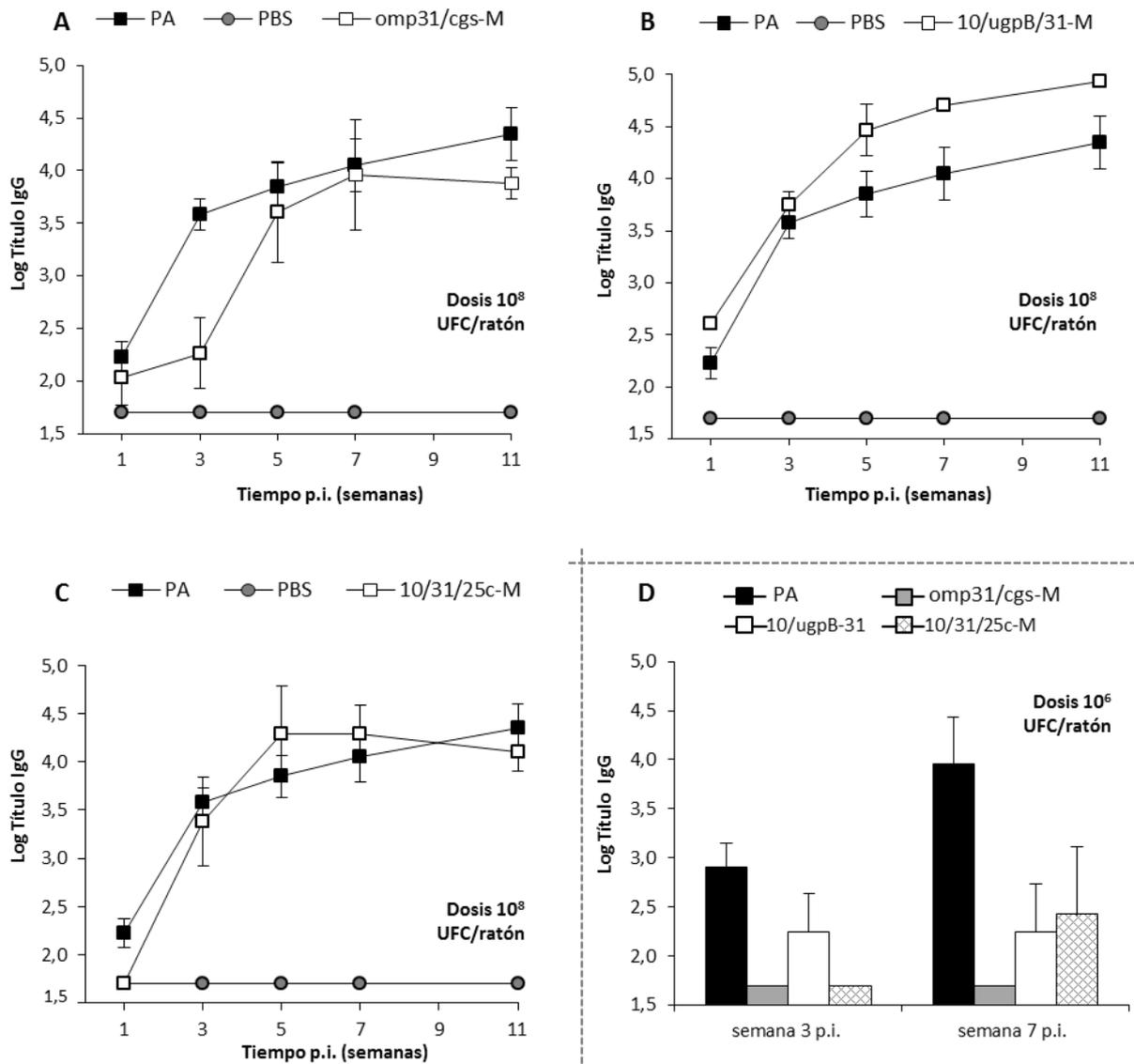


Figura 33. Análisis de la evolución de los niveles de anticuerpos tipo IgG, frente a células enteras de *B. ovis* PA, en suero de ratones inoculados con los mutantes  $\Delta omp31\Delta cgs$ ,  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ ,  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  y PBS (A-C: dosis 10<sup>8</sup> UFC/ratón; D-E: dosis 10<sup>6</sup> UFC/ratón), a diferentes tiempos p.i. A-C. Se representa la media del Log del título  $\pm$  DE ( $n=5$ ). D. Se representa la media del Log del título  $\pm$  DE ( $n=3$ ). El límite de detección es 1,7E. Peso de los bazos (gramos) a lo largo del tiempo de los ratones empleados en el análisis de la virulencia en el apartado D, expresado como la media  $\pm$  DE ( $n=3$ ). Simbología: <sup>a</sup>,  $P < 0,0005$  con respecto al peso de los bazos de ratones inoculados con *B. ovis* PA.

E

Cepa	peso de bazos (g) (media $\pm$ DE)	
	3 semanas p.i.	7 semanas p.i.
<i>B. ovis</i> PA	0,210 $\pm$ 0,07	0,237 $\pm$ 0,11
omp31/cgs-M	0,082 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,083 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
10/ugpB/31-M	0,090 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,086 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
10/31/25c-M	0,090 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,103 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>

#### 4. Análisis en modelo murino del interés como vacuna del mutante atenuado más relevante

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el apartado anterior, se consideró que el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  presentaba el perfil de atenuación más adecuado para evaluar con más detalle su potencial como vacuna viva atenuada en modelo murino.

La evaluación consistió por una parte en estudiar la respuesta inmune inducida frente a una infección experimental por *B. ovis* PA. Para ello, los ratones se vacunaron con el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y a la semana 7 post-vacunación (p.vac.), bien se infectaron con la cepa virulenta *B. ovis* PA (para el estudio de protección) o bien se procesaron para evaluar la respuesta inmune humoral y celular inducida por la vacunación. En estos estudios también se incluyeron ratones no vacunados (inoculados con PBS) y ratones vacunados con la vacuna clásica heteróloga *B. melitensis* Rev1. Para el estudio de protección también se emplearon ratones que se infectaron 11 semanas después de la vacunación. Estos experimentos se detallan en los siguientes apartados.

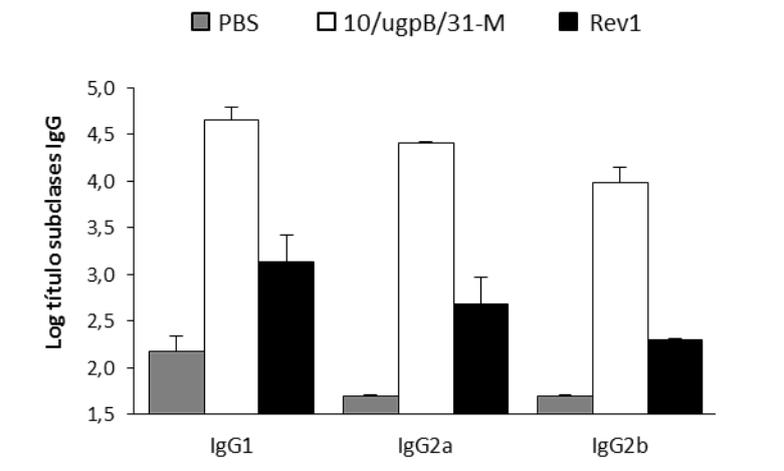
##### 4.1. Respuesta inmune inducida por el mutante $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$

En primer lugar, se empleó un grupo de ratones vacunados con el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  ( $1 \times 10^8$  UFC/ratón) ( $n=5$ ), otro grupo vacunado con la vacuna clásica *B. melitensis* Rev1 ( $1 \times 10^5$  UFC/ratón) ( $n=5$ ) y un grupo control sin vacunar (PBS) ( $n=5$ ). Transcurridas 7 semanas desde la vacunación, momento que coincide con la infección experimental en los experimentos de protección, se analizaron mediante i-ELISA los niveles de anticuerpos de las subclases IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>2b</sub> específicos frente a células enteras de *B. ovis* PA, en el suero de los ratones (**Apartado 10.3.2.** de Materiales y Métodos).

Para el análisis de la respuesta inmune celular se extrajeron los bazos de los animales empleados en el análisis de la respuesta de anticuerpos. A continuación, se realizaron cultivos primarios de esplenocitos procedentes de los ratones de cada grupo. Las células se estimularon con concanavalina A (control de viabilidad), *B. ovis* PA (células enteras inactivadas por calor) o con medio RPMI completo (control de los niveles de producción basal) y a los 3 días se cuantificaron, mediante ELISA, los niveles de citocinas secretadas al medio por los esplenocitos (**Apartado 10.3.3.** de Materiales y Métodos).

##### 4.1.1. Análisis de las subclases de IgG frente a *B. ovis* PA

Coincidiendo con los resultados obtenidos en el análisis de la producción de IgG total (**Figura 34 B**), los títulos de IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> y IgG<sub>2b</sub> observados a la semana 7 p.i. en los animales inoculados con el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  se situaron en valores por encima de las 4 unidades logarítmicas. Estos valores fueron muy superiores a los obtenidos en los animales inoculados con la vacuna Rev1, observándose una diferencia con ésta superior a 1,5 unidades logarítmicas en cada una de las subclases. Aunque los niveles de IgG<sub>1</sub> fueron ligeramente superiores en todos los animales, no se observó una clara predominancia en las subclases de IgG analizadas.



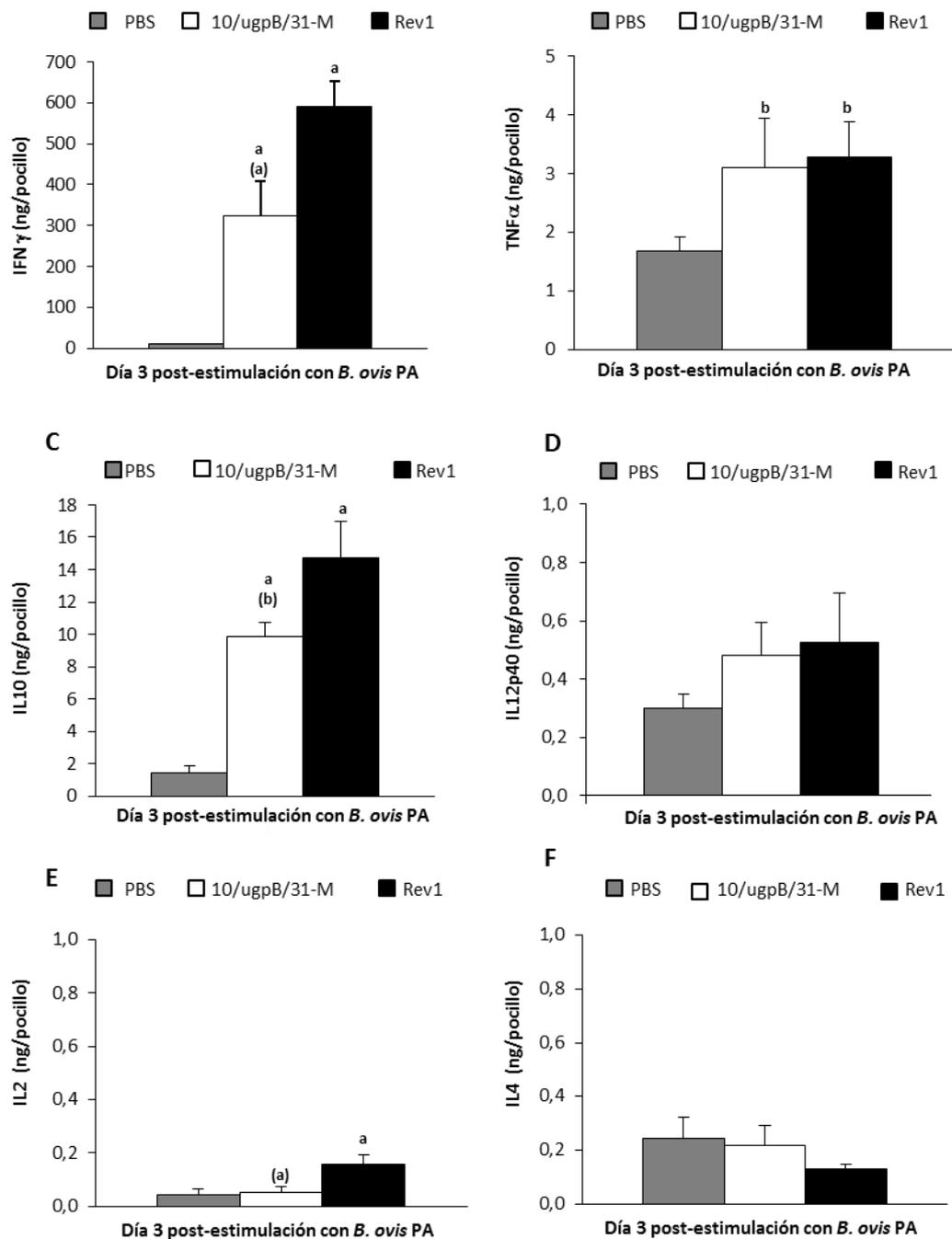
**Figura 34.** Respuesta de anticuerpos de las subclases IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> e IgG<sub>2b</sub>, frente a células enteras de *B. ovis* PA, analizada a la semana 7 p.i. en muestras de suero de ratones inoculados con el mutante atenuado  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  de *B. ovis* PA ( $1 \times 10^8$  UFC/ratón) y con la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 ( $1 \times 10^5$  UFC/ratón). Representación de la media del Log del título  $\pm$  DE ( $n=5$ ). El límite de detección es 1,7.

#### 4.1.2. Análisis de la producción de citocinas tras un segundo estímulo *in vitro* con *B. ovis* PA

Los controles de viabilidad (concanavalina A) y de producción basal de citocinas (RPMI) fueron los esperados (datos no mostrados). En las condiciones experimentales empleadas, los esplenocitos de animales vacunados con el mutante atenuado  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  o la vacuna *B. melitensis* Rev1 secretaron niveles importantes de IFN $\gamma$  tras la exposición con *B. ovis* PA, detectándose niveles aproximados de 300 ng/pocillo y 600 ng/pocillo, respectivamente. En contraste, los niveles de IFN $\gamma$  producidos por los esplenocitos obtenidos de los ratones del grupo de PBS fueron comparativamente débiles, con valores de aproximadamente 10 ng/pocillo (**Figura 35 A**).

Tras el estímulo con *B. ovis* PA los niveles de TNF $\alpha$  secretados por los esplenocitos de ratones vacunados con el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y con Rev1 fueron similares ( $P \leq 0,005$ ), con cantidades detectadas de aproximadamente 3 ng/pocillo. En el grupo de PBS se detectó una cantidad de TNF $\alpha$  de aproximadamente la mitad de la producida por los esplenocitos de los animales vacunados (**Figura 35 B**). También fue positiva la producción de IL10 por los esplenocitos de los animales vacunados con el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  ( $P \leq 0,0005$ ) y con Rev1 ( $P \leq 0,0005$ ), tras el segundo estímulo con *B. ovis* PA, siendo en este caso más elevada la cantidad de IL10 detectada en el grupo de la vacuna heteróloga (**Figura 35 C**). Respecto a la producción de IL12p40, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los esplenocitos de los animales vacunados y sin vacunar (**Figura 35 D**).

Por último, tras el estímulo de *B. ovis* PA *in vivo* sólo se detectó IL2 en pequeñas cantidades, en los ratones vacunados con *B. melitensis* Rev1 (**Figura 33 E**) y no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos de animales en la producción de IL4 (**Figura 35 F**).



**Figura 35.** Detección de citocinas extracelulares producidas por esplenocitos obtenidos de ratones sin vacunar, vacunados con *B. melitensis* Rev1 y vacunados con el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  de *B. ovis* PA, tras ser estimulados con células enteras de *B. ovis* PA inactivadas por calor. Se representa la media  $\pm$  DE ( $n=5$ ) de la concentración de cada citocina. Simbología: <sup>a</sup>  $P \leq 0,0005$ ; <sup>b</sup>  $P \leq 0,005$ ; diferencias significativas con respecto al valor del grupo de PBS. Siguiendo la misma simbología, se indican entre paréntesis las diferencias significativas con respecto *B. melitensis* Rev1.

## 4.2. Ensayos de protección

En estos experimentos se evaluó el poder protector del mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  frente a la infección experimental con la cepa virulenta *B. ovis* PA transcurridas 7 y 11 semanas de la vacunación. Para ello, se emplearon tres grupos experimentales: i) PBS, control negativo sin inmunizar ( $n=10$ ); ii) vacuna experimental  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  ( $n=15$ ) ( $1 \times 10^8$  UFC/ratón) y iii) vacuna de referencia *B. melitensis* Rev1 ( $n=5$ ) ( $1 \times 10^5$  UFC/ratón). Transcurridas 7 semanas p. vac., 10 animales del grupo vacunado con  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y 5 animales de cada grupo control se infectaron con *B. ovis* PA. Transcurridas tres semanas después de la infección se realizaron los recuentos de *B. ovis* PA en el bazo de los animales. La evaluación de la protección en la semana 11 p.vac. se llevó de manera similar, infectando experimentalmente a 5 animales del grupo vacunado con  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y del grupo de PBS.

Como se recoge en la **Tabla XIV**, en el experimento en el que la infección experimental se realizó a la semana 7 p. vac., el grupo control no vacunado (inoculado con PBS) presentó niveles de infección en bazo de *B. ovis* PA del orden de 6 unidades logarítmicas. Por el contrario, el grupo inmunizado con la vacuna heteróloga *B. melitensis* Rev1 presentó una elevada reducción de la colonización esplénica de la cepa infectiva (valores de Log UFC/bazo de  $2,11 \pm 0,97$ ), aunque la cepa vacunal se detectó en 4 de los 5 animales vacunados. El mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  de *B. ovis* PA proporcionó niveles de protección mejores que *B. melitensis* Rev1 ( $p \leq 0,05$ ) y no se detectó en ninguno de los animales vacunados. El mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  también confirió niveles similares de protección frente a la infección experimental cuando esta se realizó a la semana 11 p.vac. (**Tabla XIV**).

**Tabla XIV. Protección conferida por el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  de *B. ovis* en ratones BALB/c frente a la infección experimental con *B. ovis* PA.**

Grupo vacunación/dosis	Log UFC <i>B. ovis</i> /bazo (media $\pm$ D.E)		Log protección		Detección vacuna/total (nº animales)	
	infección semana 7 p.vac.	infección semana 11 p.vac.	infección semana 7 p.vac.	infección semana 11 p.vac.	infección semana 7 p.vac.	infección semana 11 p.vac.
PBS (control negativo)	$6,31 \pm 0,68$	$5,93 \pm 1,68$	-	-	-	-
Rev1 ( $1 \times 10^5$ )	$2,11 \pm 0,97^a$	ND	4,2	ND	4/5	ND
$10/ugpB/31-M$ ( $1 \times 10^8$ )	$0,55 \pm 0,10^{a(b)}$	$0,81 \pm 0,64^a$	5,76	5,12	0/10	0/5

Los ratones fueron vacunados a la dosis seleccionada del mutante  $10/ugpB/31-M$  ( $1 \times 10^8$  UFC/ratón) ( $n=15$ ). Como controles, se emplearon la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 ( $1 \times 10^5$  UFC/ratón) ( $n=5$ ) y PBS ( $n=10$ ) (control negativo). Las infecciones experimentales con *B. ovis* PA ( $2 \times 10^5$  UFC/ratón) se realizaron a las semanas 7 y 11 posteriores a la vacunación de los animales. Se muestran los recuentos esplénicos de *B. ovis* PA obtenidos transcurridas 3 semanas posteriores a cada infección, expresados como la media del Log UFC/bazo  $\pm$  D.E ( $n=5$  o  $10$ ), los logaritmos de protección (diferencia entre el recuento esplénico obtenido para cada grupo de vacunación y el obtenido para el grupo sin vacunar) y el número de animales en el que se detectó la vacuna respecto del número total empleado en cada grupo de vacunación. Todas las inoculaciones se realizaron vía IP. ND: No determinado. Simbología: <sup>a</sup>  $P \leq 0,0005$ ; <sup>b</sup>  $P \leq 0,05$  indican diferencias significativas respecto al control sin vacunar. Siguiendo la misma simbología, se indican entre paréntesis las diferencias significativas con respecto al grupo vacunado con *B. melitensis* Rev1.

## **Discusión**



*B. ovis* produce una enfermedad infecciosa en el carnero caracterizada por la presencia de epididimitis y descenso de la fertilidad, causando elevadas pérdidas económicas en el sector ganadero y para la que no existe una vacuna específica disponible (OIE., 2015). El tema central del presente trabajo ha sido la obtención de mutantes atenuados de *B. ovis* PA como modelo de vacuna frente a la infección por *B. ovis* en carneros. No obstante, un aspecto fundamental en el diseño de vacunas atenuadas es la identificación de factores que estén implicados en la virulencia del microorganismo y que puedan ser adecuados como dianas vacunales (Ko & Splitter., 2003; de Figueiredo *et al.*, 2015).

Los microorganismos pertenecientes a este género poseen una elevada homología a nivel de ADN, pero exhiben importantes diferencias en su patogenicidad y preferencia de hospedador (Scholz *et al.*, 2012). *Brucella* es un patógeno intracelular facultativo que posee una serie de factores que difieren ampliamente de los clásicos factores de virulencia de otras bacterias Gram negativas (exotoxinas, plásmidos, lipopolisacárido endotóxico, fimbrias, etc) (de Figueiredo *et al.*, 2015). Numerosas observaciones han conducido a que muchos de los aspectos de la virulencia de *Brucella* se hayan relacionado con las características de su ME (Martín-Martín *et al.*, 2011; Vizcaíno & Cloeckert., 2012). En concreto, la ausencia de cadenas O en el LPS (R-LPS) de *B. ovis* es un rasgo característico diferencial respecto a las especies lisas (S-LPS), en las cuales la presencia de estos componentes es esencial para la virulencia (González *et al.*, 2008; Monreal *et al.*, 2003). Sin embargo, *B. ovis* es una especie naturalmente rugosa y virulenta en sus hospedadores naturales y sus mecanismos de virulencia han sido menos estudiados que el caso de cepas lisas de *Brucella*.

Por una parte, en este trabajo se ha estudiado el papel de los genes *bepC* y *ugpB* en la fisiología y virulencia de la cepa *B. ovis* PA. Ambos genes desempeñan un papel relevante en la virulencia de *B. suis* (Castañeda-Roldán *et al.*, 2006; Posadas *et al.*, 2007), concretamente en el proceso de interacción bacteria-hospedador, y están relacionados con los mecanismos de transporte y adhesión bacteriana. Dichos aspectos están menos estudiados en *Brucella*, en comparación con otros patógenos intracelulares, y los estudios que existen se han realizado en especies lisas. Por otra parte, se ha construido un panel de mutantes múltiples en genes relacionados con la ME con el doble objetivo de profundizar en el conocimiento del papel de la ME en la virulencia de *B. ovis* y de encontrar cepas atenuadas con propiedades vacunales adecuadas y que faciliten la diferenciación serológica entre animales vacunados e infectados.

## 1. Construcción, caracterización y evaluación de la virulencia de los mutantes $\Delta b e p C$ y $\Delta u g p B$ de *B. ovis* PA

### 1.1. El gen *bepC*

La proteína BepC ha sido descrita como el único miembro de la familia de proteínas TolC codificado en el genoma de *B. suis* 1330 (Posadas *et al.*, 2007). Los miembros de la familia TolC son OMPs que interactúan con proteínas de fusión de membrana (MFP) y con diferentes transportadores de MI, permitiendo el paso directo de diferentes sustratos desde el citoplasma de la bacteria hasta el medio extracelular. Entre los sustratos diana de los sistemas tripartitos de flujo dependientes de TolC, se encuentra un amplio rango de compuestos. Estos incluyen colorantes catiónicos como la acriflavina, cristal violeta, bromuro de etidio y rodamina 6G; antibióticos como las penicilinas, cefalosporinas, fluoroquinolonas, macrólidos, cloranfenicol, tetraciclinas, ácido fusídico y rifampicina; detergentes como el triton X-100, SDS, ácidos biliares e incluso solventes orgánicos como pentano o ciclohexano (Nikaido., 2011). Independientemente del estado de carga que posean, estos sustratos tienen una característica común; ser relativamente lipofílicos (Nikaido., 1996). La secreción de toxinas proteicas como la  $\alpha$ -hemolisina también tienen lugar a través de sistemas dependientes de TolC (Nikaido., 2003). La expulsión de compuestos tóxicos para las bacterias como antibióticos y sales biliares, está principalmente mediado por transportadores de MI de tipo RND y la de toxinas proteicas, principalmente por transportadores de tipo ABC (Misra & Bavro., 2009; Hinchliffe *et al.*, 2013). Los miembros de la familia TolC están ampliamente distribuidos en bacterias Gram negativas (aunque también están presentes en Gram positivas) y tienen un papel

importante en la supervivencia bacteriana y de manera especial en el desarrollo del proceso infeccioso (Bina & Mekalanos., 2001; Baucheron *et al.*, 2005; Horiyama *et al.*, 2010; Baucheron *et al.*, 2014).

El papel de las proteínas de la familia TolC en *Brucella* ha sido pobremente estudiado y hasta la fecha sólo se disponen de datos en *B. suis*, obtenidos a partir de un mutante por inserción de un *cassette* de resistencia a espectinomina en el gen *bepC* (Posadas *et al.*, 2007). Los resultados de este estudio en *B. suis* han sugerido una implicación de la proteína BepC en la expulsión de moléculas hidrofóbicas, que contribuye a la supervivencia *in vivo* de esta especie, al menos en modelo murino (Posadas *et al.*, 2007). Sin embargo, en la actualidad se desconoce el papel de la proteína BepC en la virulencia de la especie rugosa *B. ovis*.

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que la cepa mutante  $\Delta bepC$  de *B. ovis* PA poseía un fenotipo muy similar al de la cepa parental. La delección del gen *bepC* de *B. ovis* PA no alteró la capacidad de penetración y multiplicación en macrófagos J774.A1, ni en células epiteliales HeLa (**Apartado 1.3. de Resultados, Figura 14**). Estos resultados son coherentes con los obtenidos para el mutante de *B. suis* 1330, que también mostró una cinética de multiplicación en ambas líneas celulares similar a la de la cepa parental (Posadas *et al.*, 2007). Estos resultados sugieren que el gen *bepC* no es imprescindible para la supervivencia intracelular de ambas especies. En cambio, los mutantes de *B. suis* y *B. ovis* difieren en los estudios de virulencia *in vivo*. Así, el mutante  $\Delta bepC$  de *B. ovis* PA desarrolló una cinética de colonización esplénica en ratones BALB/c muy similar a la de la cepa parental (**Apartado 1.4. de Resultados, Tabla X**), sugiriendo que el gen *bepC* no es esencial para la supervivencia *in vivo* de *B. ovis* PA. Por el contrario, el mutante de *B. suis* 1330 presentó una atenuación en modelo murino (Posadas *et al.*, 2007). Las diferencias en el comportamiento observado *in vitro* e *in vivo* del mutante de *B. suis* 1330 se han relacionado con mecanismos de resistencia extracelulares mediados por BepC a los que esta especie puede estar expuesta *in vivo* y que podrían contribuir a su diseminación. En concreto, la inactivación del gen *bepC* en *B. suis* 1330 incrementó notablemente la sensibilidad a sales biliares (Posadas *et al.*, 2007). En el caso de *B. ovis* PA, el gen *bepC* no parece jugar un papel significativo en la resistencia a compuestos relacionados con el ambiente extracelular como el desoxicolato (principal componente de las sales biliares) (**Tabla IX**).

Las discrepancias observadas entre los mutantes  $\Delta bepC$  de *B. suis* 1330 y de *B. ovis* PA no parecen residir en defectos que pudieran afectar, en general, a la función de la proteína BepC de *B. ovis* PA. En concreto, solo se detectó un aminoácido de diferencia en la secuencia de la proteína de *B. ovis* PA, respecto a la proteína BepC de *B. suis* 1330 (datos no mostrados). Tampoco parece deberse a una ausencia de la transcripción del gen en *B. ovis* PA ya que solo se ha detectado una sustitución nucleotídica en la región promotora hipotética del gen *bepC* de *B. ovis* PA (**Apartado 1.6. de Resultados, Figura 16**) y se ha comprobado su transcripción mediante RT-PCR (**Apartado 1.5. de Resultados, Figura 15**). Así mismo, la fuerza de la región promotora del gen *bepC* de *B. ovis* PA y de *B. suis* 1330, analizada mediante la actividad  $\beta$ -galactosidasa de fusiones *lacZ*, fue similar (**Apartado 1.6. de Resultados, Figura 17**), lo cual apoyaría una transcripción similar de *bepC* en las dos cepas. En cambio, teniendo en cuenta que los sistemas tripartitos dependientes de TolC pueden interaccionar con diferentes transportadores de MI para la traslocación de sustratos (Hinchliffe *et al.*, 2013; Dijun *et al.*, 2014), un defecto en las otras dos proteínas podría anular dicha función. En concreto, estudios centrados en el sistema AcrAB-TolC de *E. coli* han demostrado que es necesario el correcto ensamblaje de los todos los componentes para permitir la funcionalidad del complejo (Murakami *et al.*, 2002; Touzé *et al.*, 2004; Dijun *et al.*, 2014). Así, se ha comprobado que el ensamblaje de AcrAB en la MI tiene lugar de manera constitutiva (independiente de la presencia de sustrato) y que la punta del dominio periplásmico de AcrB, interactúa con el final del túnel periplásmico de TolC (Norihisa Tamura *et al.*, 2005) (**Figura 2**), induciéndose el reclutamiento de TolC por la unión del sustrato al sistema de traslocación de MI (Touzé *et al.*, 2004). En este contexto, en el genoma de *B. suis* 1330 se ha detectado la presencia de dos sistemas de tipo RND, BepDE (BR0291-BR0292) y BepFG (BRA0334-BRA0335), que parecen trabajar en asociación con BepC para eliminar compuestos tóxicos en esta especie (Martín *et al.*, 2009). En concreto, BepE posee un elevado grado de similitud con la proteína AcrB de *E. coli* y su inactivación en *B. suis* 1330 aumenta significativamente la sensibilidad de esta cepa a desoxicolato sódico. Además, la presencia de este componente biliar induce la expresión del sistema BepDE en *B. suis* 1330

(Martín *et al.*, 2009), del mismo modo que ocurre con el sistema AcrAB de *E. coli* (Ma *et al.*, 1995). El análisis del genoma publicado de *B. ovis* ATCC 25840 ha permitido detectar que *bepE* (locus BOV\_RS01560) es un pseudogen (datos no mostrados), por lo que las diferencias observadas entre el mutante *bepC* de *B. ovis* PA y de *B. suis* 1330 podrían deberse a un defecto en el ensamblaje del sistema tripartito dependiente de BepC en *B. ovis* que impediría el funcionamiento del sistema completo.

La función natural de AcrB, la parte activa del sistema AcrAB-TolC de *E. coli* y con el que BepE presenta homología, es la de expulsión de sales biliares y derivados de éstas, contribuyendo así a la supervivencia de patógenos intestinales como *E. coli*, *Salmonella* o *Vibrio cholerae* en elevadas concentraciones de estos compuestos de acción detergente (Ma *et al.*, 1995; Baucheron *et al.*, 2014). Las especies del género *Brucella* penetran en el hospedador a través de las mucosas, de las cuales, la digestiva es una importante ventana de entrada de la infección especialmente de las especies que causan infección en humanos, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. abortus* (Moreno., 2014). Por tanto, un defecto en el sistema tripartito dependiente de BepC podría contribuir a la baja relevancia que tiene la vía oral en la adquisición de *B. ovis* (Tsolis *et al.*, 2009). Concretamente, esta especie, que carece de potencial zoonótico, se transmite predominantemente por vía sexual entre los hospedadores naturales (Blasco., 1990; Picard-Hagen *et al.*, 2015), una vía en la que *B. ovis* no se encontraría expuesta a elevadas concentraciones de sales biliares. Así mismo, se ha observado la ausencia en *B. ovis* de funciones que, en especies como *B. suis*, *B. abortus* y *B. melitensis* se relacionan con la adaptación a la transmisión por vía oral, como es el caso de la actividad ureasa. Estas tres especies preservan los genes *ureT* y *urG2*, los cuales son necesarios para su supervivencia a condiciones extracelulares de pH ácido extremo, como las del tracto gastrointestinal (Bandara *et al.*, 2007; Sangari *et al.*, 2007, 2010; Paixão *et al.*, 2009). En cambio, *B. ovis* carece de actividad ureasa, probablemente debido a la presencia de deleciones que afectan a dichos genes (Tsolis *et al.*, 2009). Además, junto con los sistemas de flujo, la resistencia intrínseca característica de las bacterias Gram negativas a compuestos tóxicos recae también en la barrera que supone la ME (Nikaido., 2003). En este aspecto, en *B. ovis* PA se ha observado una notable sensibilidad a elevadas concentraciones de otros compuestos de acción detergente como el triton X-100 en comparación con especies lisas, incluida *B. suis*, sugiriéndose la existencia de propiedades características de la ME de *B. ovis* que podrían contribuir al tropismo que posee por el tracto reproductor del carnero (Martín-Martín *et al.*, 2011). Así mismo, en estudios previos se había observado una mayor permeabilidad a compuestos de naturaleza hidrofóbica en *B. ovis*, en comparación con mutantes rugosos de *B. abortus* (Freer *et al.*, 1999).

El mutante  $\Delta$ *bepC* de *B. suis* 1330 mostró también sensibilidad a diversos antibióticos, incluidos  $\beta$ -lactámicos y aminoglucósidos (Posadas *et al.*, 2007). En el caso del mutante de *B. ovis* PA no se observaron tales diferencias con representantes de ambos grupos como la ampicilina y kanamicina (Tabla IX). Si bien en este trabajo no hemos profundizado en el estudio de los mecanismos de resistencia a antibióticos, el gen *bepC* de *B. ovis* PA no parece jugar un papel relevante en dicho aspecto. Sin embargo, teniendo en cuenta que *B. ovis* carece de carácter zoonótico y por tanto el tratamiento antibiótico no es de uso tan común como en el caso de especies que producen brucelosis en humanos, una diferente presión selectiva en ambas podría contribuir a diferencias en la preservación de sistemas dependientes de BepC. Apoyando esta idea, en estudios previos se puede observar una elevada sensibilidad de especies no zoonóticas, incluida *B. ovis*, a eritromicina y cloranfenicol, en comparación con una resistencia intrínseca superior en las especies patógenas para humanos *B. suis*, *B. melitensis* y *B. abortus* a estos compuestos (Halling & Jensen., 2006). Además, mediante el empleo de un inhibidor de transportadores de tipo RND, se han observado importantes diferencias en la resistencia de las especies zoonóticas a estos antibióticos presumiblemente mediado por sistemas de flujo (Halling & Jensen., 2006). Por tanto, la presencia de sistemas de flujo dependientes de BepC en *B. suis* capaces de expulsar fármacos empleados en el tratamiento de la brucelosis en humano tendría un impacto significativo en la supervivencia de esta especie (Posadas *et al.*, 2007; Martín *et al.*, 2009), el cual podría ser menos relevante en *B. ovis*.

Por último, el sistema BepFG descrito en *B. suis* (Martín *et al.*, 2009) parece estar intacto a nivel de secuencia en el genoma publicado de *B. ovis* ATCC 25840 (datos no mostrados), por lo que BepFG podría ser un sistema que interaccione con BepC en *B. ovis*. Además, existen otro tipo de transportadores independientes de

TolC que están implicados en la expulsión de compuestos tóxicos en las bacterias, como los de tipo ABC (Higgins., 2001). En concreto, *B. ovis* posee un transportador específico de este tipo localizado en la isla de patogenicidad BOPI-1, el cual se ha demostrado que es necesario para la virulencia y se encuentra ausente en las especies clásicas de *Brucella* (Silva *et al.*, 2011).

## 1.2. Gen *ugpB*

Los microorganismos del género *Brucella* muestran una incapacidad de supervivencia prolongada fuera del hospedador, debido a lo cual se les considera patógenos intracelulares, extracelulares facultativos. En este contexto, el fagosoma, al que se han ido adaptando evolutivamente, es su nicho natural (Köhler *et al.*, 2002). Por tanto, la capacidad de adherencia y penetración de *Brucella* en las células hospedadoras es esencial para alcanzar dicho nicho y asegurar, por ende, su supervivencia.

En los últimos años, el estudio de los elementos de *Brucella* que contribuyen a su adherencia e internalización celular ha experimentado un auge notable. Diversos estudios han mostrado que *Brucella* es capaz de interactuar con los residuos de ácido siálico presentes en la superficie de distintos tipos de células del hospedador (Rocha-Gracia *et al.*, 2002; Castañeda-Roldán *et al.*, 2004). En concreto, la proteína de superficie SP41, la primera adhesina descrita en *Brucella*, parece ser una lectina que interactuaría con residuos este tipo presentes en las células epiteliales del hospedador (Castañeda-Roldán *et al.*, 2006). Se ha comprobado que tanto el bloqueo de la proteína SP41 con anticuerpos específicos frente a ésta como la inactivación del gen *ugpB* que la codifica en *B. suis* 1330, conducen a una disminución de la capacidad de adhesión de la bacteria a células epiteliales (Castañeda-Roldán *et al.*, 2006). Sin embargo, el papel de la proteína SP41 en la supervivencia intracelular de *B. suis* 1300 no parece ser relevante y no se ha evaluado en modelos animales (Castañeda-Roldán *et al.*, 2006). En este trabajo, hemos obtenido un mutante por delección del gen *ugpB* en la cepa naturalmente rugosa *B. ovis* PA ( $\Delta$ *ugpB*), que, en contraste con el mutante  $\Delta$ *ugpB* de *B. suis* 1330, no presenta defectos ni en la capacidad de penetración, ni en la capacidad de multiplicación en cultivos de células epiteliales (**Apartado 1.3. de Resultados, Figura 14**). La inactivación del gen *ugpB* en *B. ovis* PA tampoco modificó la internalización, ni la proliferación bacteriana, en fagocitos profesionales (**Apartado 1.3 de Resultados, Figura 14**). Además, el mutante  $\Delta$ *ugpB* de *B. ovis* posee una capacidad de colonización esplénica en ratones BALB/c similar a la de la cepa parental (**Apartado 1.4 de Resultados, Tabla X**). Todo ello sugiere que el gen *ugpB* no está implicado en la virulencia de *B. ovis*.

Por un lado, las discrepancias observadas en el comportamiento del mutante  $\Delta$ *ugpB* entre *B. ovis* PA y *B. suis* 1330 podrían deberse a defectos en la transcripción del gen *ugpB* en *B. ovis* PA. Sin embargo, aunque no puede descartarse una menor fuerza del promotor, se ha comprobado que el gen *ugpB* se transcribe en *B. ovis* PA (**Figura 15**). También podría deberse a diferencias en la secuencia de aminoácidos que pudieran comprometer las propiedades adhesivas de la proteína SP41 en *B. ovis*. En este sentido, se detectaron cinco aminoácidos de diferencia en la proteína SP41 de *B. ovis* en comparación con la proteína de *B. suis* 1330 (datos no mostrados). Además, aunque no se ha comprobado experimentalmente, cabe destacar que la función hipotética para la proteína codificada en el gen *ugpB* es la de un transportador ABC de glicerol-3-fosfato (Castañeda-Roldán *et al.*, 2006). El glicerol-3-fosfato (G3P) es un intermediario de la glucólisis, pudiendo también entrar a formar parte del proceso de la gluconeogénesis (Yao & Rock., 2013). La biosíntesis de fosfolípidos (PLs) de ME es un aspecto relevante en la fisiología de las bacterias. Aunque la variedad de estructuras de PLs producidas por estas es amplia, el precursor clave de todas ellas es el ácido fosfatídico, cuya fuente de glicerol universal para la formación de su esqueleto es el G3P proveniente de la glucólisis (Yao & Rock., 2013). Así, defectos en el transportador codificado en el gen *ugpB* de *B. ovis* podrían modificar la composición de su ME, exhibiendo ésta propiedades de adhesión diferentes a las de *B. suis* 1330. Otro hecho a destacar relacionado con una posible disfunción de éste transportador de G3P en *B. ovis*, es la incapacidad de esta especie de crecer en presencia de glucosa como única fuente de carbono y su aparente disfunción en la vía de la gluconeogénesis, debido que varios transportadores de azúcares, intactos en *B. melitensis*, *B. suis* y *B. abortus*, se encuentran inactivados por

la presencia de mutaciones en el genoma de *B. ovis* (Tsolis *et al.*, 2009). Esos defectos en el metabolismo de *B. ovis* se han relacionado con las diferencias en la patogenicidad en humanos que poseen otras especies de *Brucella* (Tsolis *et al.*, 2009). Sin embargo, no se ha comprobado experimentalmente que la proteína SP41 tenga la función transportadora predicha y tampoco conserva ninguno de los dominios ABC de este tipo de transportadores en *Brucella* (Castañeda-Roldán *et al.*, 2006).

Por otro lado, el reconocimiento mediado por adhesinas de las distintas moléculas en las células hospedadoras, es un proceso específico que determina en gran medida el tipo de tejido a colonizar por el patógeno (Bonazzi & Cossart., 2011). Así, cabe mencionar que la línea de células epiteliales empleadas en la evaluación del mutante *ugpB* tanto de *B. suis* 1330 como de *B. ovis* PA, es de origen humano. Por tanto, teniendo en cuenta que *B. ovis* es una especie que carece de poder zoonótico, el producto del gen *ugpB* podría no estar implicado en la adherencia en este tipo de células, pero podría estarlo en la adhesión a células epiteliales de origen ovino.

Por último, la internalización de *Brucella* en las células hospedadoras es un proceso coordinado en el que la ME es un elemento clave. Debido a la ausencia de cadenas O en el LPS de *B. ovis* otras adhesinas podrían estar más expuestas en la superficie de esta especie (Bowden *et al.*, 1995 b), lo que favorecería su interacción con la célula hospedadora. En este sentido, se ha descrito la existencia de otras adhesinas en este género, que podrían compensar los defectos hipotéticos de la proteína SP41 en *B. ovis*, como son los autotransportadores BmaC, BtaE y BtaF, o la proteína con dominio inmunoglobulina BigA (Posadas *et al.*, 2012; Ruiz-Ranwez *et al.*, 2013 a, 2013 b; Czibener *et al.*, 2015).

## **2. Construcción y evaluación preliminar de un panel de mutantes múltiples de *B. ovis* PA en genes relacionados con la membrana externa**

### **2.1. Los genes de las lipoproteínas Omp10 y Omp19 y de las proteínas mayoritarias Omp25 y Omp31 en la estabilidad de la ME de *B. ovis***

En la superficie celular de *Brucella* se encuentran expuestas, de manera minoritaria, las lipoproteínas Omp10 y Omp19, junto con las proteínas mayoritarias Omp25 y Omp31 (CloECKaert *et al.*, 1990). Si bien su implicación en la virulencia de las distintas especies del género *Brucella* no está claramente delimitada, se considera que estos elementos contribuyen de forma relevante al mantenimiento de la integridad de la ME (CloECKaert *et al.*, 1990, 1992; Moriyón & López-Goñi., 1998; Tibor *et al.*, 1999; Vizcaíno & CloECKaert., 2012) y, por tanto, a la fisiología de la bacteria.

Por un lado, las lipoproteínas Omp10 y Omp19 se han relacionado, en *B. abortus* 544, con funciones de adhesión, invasión celular e inmunomodulación, así como con la virulencia en modelo murino (Tibor *et al.*, 2002; Giambartolomei *et al.*, 2004; Zwerdling *et al.*, 2008; Coria *et al.*, 2016). En cambio, en *B. ovis* PA, los genes de las lipoproteínas Omp10 y Omp19 no se relacionan, de forma individual, con la viabilidad y virulencia de la bacteria (Sidhu-Muñoz *et al.*, 2016). Así mismo, estudios realizados con la vacuna *B. abortus* RB51 muestran que la inactivación del gen *omp19* no incrementa su atenuación (Vemulapalli *et al.*, 2000), mientras que dicha inactivación, tanto en la vacuna lisa *B. abortus* S19, como en la cepa virulenta *B. abortus* 2308, produce un incremento de la atenuación en modelo murino (Campos *et al.*, 2002; de Souza Filho *et al.*, 2015). De acuerdo con ello, las diferencias del papel de las lipoproteínas Omp10 y Omp19 en la virulencia de las distintas cepas de *Brucella* podrían estar relacionadas, en parte, con el fenotipo rugoso o liso de la cepa parental, así como con diferencias en la composición y propiedades relacionadas con la ME observadas entre especies de este género (Martín-Martín *et al.*, 2011; Vizcaíno & CloECKaert., 2012).

En este trabajo se emplearon, por un lado, los mutantes simples  $\Delta omp10$  y  $\Delta omp19$  como fondo genético para la obtención de mutantes dobles en ambos genes. Para ello, se introdujeron por electroporación en los mutantes  $\Delta omp10$  y  $\Delta omp19$ , los plásmidos pNV19OVL02 y pNV10OVL02, respectivamente (**Tabla VI**). Todos los intentos por conseguir una doble recombinación en las cepas  $\Delta omp10$  y  $\Delta omp19$  con los respectivos

plásmidos, resultaron en la reversión al genotipo mutado original (datos no mostrados). Estas observaciones parecen indicar que la ausencia simultánea de los genes *omp10* y *omp19*, afecta de manera severa a la viabilidad de *B. ovis* PA y que ambos genes podrían tener una función intercambiable en mantener la integridad de la ME.

En base al estudio de la topología de la envuelta celular de *Brucella* con MAbs (Cloekaert *et al.*, 1990; Tibor *et al.*, 1999) y al análisis de secuencias de aminoácidos (Moriyón & López-Goñi., 1998), se ha modelizado la localización de las lipoproteínas Omp10 y Omp19 en la ME. Se propone que la parte lipídica de estas OMPs se inserta en la región de la ME cercana al periplasma (Moriyón & López-Goñi., 1998; Tibor *et al.*, 1999). Además de la presencia de Omp10 y Omp19 en la ME, estudios en *B. ovis* y *B. abortus* describieron la existencia de otra lipoproteína (Gómez-Miguel & Moriyón., 1986), posteriormente denominada Omp16, que presenta homología con las lipoproteínas asociadas al PG de la pared celular (PALs) (Tibor *et al.*, 1994, 1999). No se ha descrito, hasta la fecha, la obtención de ningún mutante de *Brucella* en el gen que la codifica (Sidhu-Muñoz *et al.*, 2016) y los mutantes obtenidos en otras bacterias Gram negativas presentan defectos en la envoltura celular, crecimiento y/o virulencia (Dubuisson *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2006; Yeh *et al.*, 2010). De acuerdo a lo anterior, parece probable que la proteína Omp16 desempeñe un papel significativo en el anclaje de la ME a la pared celular en *Brucella*. Este tipo de interacciones, junto con la imposibilidad de obtención de la doble mutación en los genes *omp10* y *omp19* en *B. ovis* PA, reforzaría la hipótesis del papel estructural que jugarían estas tres lipoproteínas en la ME de *Brucella*.

Mediante la caracterización topológica de los mutantes  $\Delta omp10$  y  $\Delta omp19$  se observó un incremento en la reactividad de los MAbs anti-BP26 tanto en el mutante  $\Delta omp19$  como en los mutantes múltiples portadores de dicha inactivación (**Apartado 2.3. de Resultados, Figuras 24 y 25 B**). Las diferencias de reactividad observadas indican una mayor exposición de los epítomos de la proteína periplásmica BP26 y/o una mayor cantidad de proteína BP26 en ausencia del gen *omp19*. Estos resultados sugieren un posible efecto compensatorio entre los genes *bp26* y *omp19* en *B. ovis* PA lo que podría, a su vez, relacionarse con los resultados obtenidos en el análisis proteómico de mutantes de *B. abortus* 2308 en el sistema regulador BvrR/BvrS (Lamontagne *et al.*, 2007). En este análisis se observó, entre numerosos cambios en la envuelta celular, un incremento en la expresión de proteínas de origen periplásmico, junto con una disminución en los niveles de OMPs (Lamontagne *et al.*, 2007). En concreto, el incremento en la expresión de proteínas periplásmicas, se ha relacionado con un mecanismo de compensación frente a estrés nutricional, el cual podría deberse a que las alteraciones presentes en la ME de estos mutantes, comprometieran también el transporte de nutrientes (Lamontagne *et al.*, 2007). De acuerdo con lo anterior, cabe mencionar que los mutantes  $\Delta omp10$  y  $\Delta omp19$  de *B. ovis* PA desarrollan un menor tamaño de colonia en medio sólido que la cepa parental (Sidhu-Muñoz *et al.*, 2016), el cual podría deberse, al menos en parte, a un defecto en el acceso a nutrientes y esto podría conducir a un incremento en los niveles de proteínas periplásmicas, como BP26. Sin embargo, la función de esta proteína, que es un antígeno inmunodominante en la infección por *Brucella* en el ganado (Cloekaert *et al.*, 2001), es todavía desconocido y no se ha observado homología con otras proteínas (Campos *et al.*, 2002). Por otro lado, la ausencia del gen *omp10* en *B. ovis* PA no parece afectar a la exposición de epítomos de BP26, puesto que no se observaron diferencias, con la metodología y los MAbs anti-BP26 disponibles, ni en el mutante  $\Delta omp10$  (**Apartado 2.3. de Resultados, Figura 24 A**), ni en aquellos que portaban dicha inactivación (**Apartado 2.3. de Resultados, Figura 23 D-E**). En este contexto, podría hipotetizarse una contribución diferencial de ambas lipoproteínas a la estabilidad de la ME de *B. ovis*. En relación a esto, se ha detectado en Western-blot una mayor masa molecular aparente de la lipoproteína Omp19 en cepas de *B. ovis*, en comparación con el tamaño observado para ésta en cepas de *B. melitensis*, *B. suis* y *B. abortus*. En cambio, la banda observada en Western-blot correspondiente a la lipoproteína Omp10 mostró un tamaño idéntico entre las cepas analizadas (Tibor *et al.*, 1996). Puesto que la diferencia en la secuencia de aminoácidos de la proteína Omp19 entre especies de *Brucella* no justifica las diferencias observadas en Western-blot, es posible que éstas radiquen en la parte no proteica de Omp19.

Por otro lado, las proteínas mayoritarias Omp25 y Omp31, de manera individual no están implicadas en la virulencia de *B. ovis* PA en modelo murino (Caro-Hernández *et al.*, 2007), aunque la proteína Omp25 se ha relacionado con funciones inmunomoduladoras en *B. suis* (Jubier-Maurin *et al.*, 2001) y con la virulencia *in vivo* de diferentes cepas de *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. ovis* (Edmonds *et al.*, 2001, 2002). Sin embargo, resultados obtenidos en otros estudios han demostrado que la cepa *B. abortus* 2308 que porta el gen *omp25* inactivado, de manera similar a lo descrito en *B. ovis* PA, no se encuentra atenuada en ratón y se ha descartado la implicación de Omp25 en la virulencia de esta cepa (Manterola *et al.*, 2007). A la proteína Omp31 también se le ha atribuido un papel inmunomodulador en *B. melitensis* 16M (Zhang *et al.*, 2016), así como características de función porina (Vizcaíno *et al.*, 1996) y de unión a grupos hemo en *B. ovis*, *B. melitensis* y *B. suis* (Delpino *et al.*, 2006). Sin embargo, no se han descrito efectos drásticos en la virulencia *in vivo* de *B. melitensis* Rev1 y de *B. ovis* PA, en ausencia de Omp31 (Cloeckert *et al.*, 2004; Caro-Hernández *et al.*, 2007). Así, se decidió llevar a cabo la inactivación simultánea de los genes de las proteínas mayoritarias Omp25 y Omp31 en *B. ovis* PA partiendo del mutante simple  $\Delta omp25$  (**Apartado 2.1. de Resultados, Figura 18 A**). A pesar de la obtención de mutantes simples en los genes *omp25* y *omp31*, tras múltiples intentos no fue posible conseguir, bajo nuestras condiciones experimentales, el reemplazamiento del gen *omp31* en el mutante  $\Delta omp25$ , ya que la cepa  $\Delta omp25$  con el plásmido pPS31OVL02 integrado en el cromosoma reversionó siempre al genotipo mutado original tras incubar en presencia de sacarosa (datos no mostrados).

Estos resultados reflejan la ya descrita relevancia de las proteínas de la familia Omp25/Omp31 en la integridad de la ME (Cloeckert *et al.*, 1992; Moriyón & López-Goñi., 1998). Tanto la proteína Omp25 como la proteína Omp31 están fuertemente asociadas al PG (Cloeckert *et al.*, 1992), por lo que parece probable que la eliminación simultánea de dichos elementos pueda afectar severamente a la estabilidad de la envoltura celular y, por tanto, a la viabilidad de la bacteria. Entre los cambios en la topología de la ME que presentan los mutantes de *B. abortus* 2308 en el sistema BvrR/BvrS y que se relacionan con la atenuación, se encuentran la reducción en los niveles de las proteínas Omp2b, Omp22, Omp25, Omp25c y Omp31b (Lamontagne *et al.*, 2007). Además, se ha observado un estrecho balance entre los miembros de la familia Omp25/Omp31 mediante la inactivación en *B. suis* 1330, de los genes *omp25c*, *omp25d* y *omp22*, que conduce a un incremento de los niveles de la proteína Omp25b (ausente en *B. ovis*) (Salhi *et al.*, 2003). También en *B. ovis* PA se ha observado un efecto compensatorio en el que, en ausencia de la proteína Omp31, se detectan mayores niveles de la proteína Omp25, además de alteraciones en la ME y un defecto en el crecimiento (Caro-Hernández *et al.*, 2007). Estos resultados sugieren un intercambio de función entre proteínas de la familia Omp25/Omp31 en *Brucella* y coinciden con los obtenidos en este trabajo en la caracterización de los mutantes mediante ELISA con MAbs. En concreto, se detectó una mayor reactividad de diferentes MAbs anti-Omp25 con todos mutantes en los que se había inactivado el gen *omp31* (**Apartado 2.3. Figuras 23 y 25A**). Así, la imposibilidad de la inactivación simultánea de los genes *omp25* y *omp31* en este trabajo, refuerza la relevancia de la redundancia existente entre los miembros que conforman la familia *omp25/omp31* para la preservación de la estructura de la ME.

## 2.2. Selección de mutantes múltiples de interés

Con el objetivo de seleccionar cepas atenuadas para posteriores análisis encaminados a evaluar su potencial como vacunas, se llevó a cabo un cribado preliminar del panel de mutantes (**Tabla VI**) en base a su virulencia *in vivo* (niveles de infección en bazo). Durante la infección por *Brucella* en el modelo murino, el recuento de bacterias en bazo proporciona perfiles de colonización altamente reproducibles y que son sensibles a pequeñas variaciones. Esto permite diferenciar las cepas en relación a su patogenicidad, habilidad de multiplicarse intracelularmente y persistir en ratón, en: virulentas, atenuadas y no virulentas (Grilló *et al.*, 2012). Según este modelo, en la infección por cepas virulentas de *Brucella* se pueden diferenciar varias fases. Entre ellas están la fase aguda que abarca desde el tercer día hasta que se alcanzan los recuentos esplénicos máximos (2-3 semanas p.i.) y la fase crónica, en la que se produce una meseta en dichos recuentos (hasta las semanas 8-11 p.i.) (Grilló *et al.*, 2012). En el curso de la infección en ratón por *B. ovis* PA se observan, acorde a su carácter virulento,

dichos patrones (Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2012). Así, teniéndolos en cuenta se seleccionaron como puntos relevantes de muestreo, para analizar de forma preliminar la virulencia (colonización esplénica), la semana 3 (fase aguda) y la semana 7 (fase crónica). Para ello, todas las cepas se inocularon a una dosis infectiva de aproximadamente  $10^6$  UFC/ratón. Los mutantes dobles  $\Delta omp25\Delta cgs$ ,  $\Delta omp31\Delta cgs$  y los mutantes triples  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ ,  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  y  $\Delta omp31\Delta omp10\Delta omp25c$ , mostraron recuentos esplénicos notablemente inferiores a los obtenidos con *B. ovis* PA (Apartado 2.2. de Resultados, **Figura 21**). El resto de los mutantes del panel mostraron niveles de UFC por bazo muy similares a los de la cepa parental. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y el interés de la mutación en el gen *omp31*, como marcaje diferencial de posibles cepas vacunales, se seleccionaron las cepas  $\Delta omp31\Delta cgs$ ,  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  como candidatos a evaluar su perfil como posibles vacunas atenuadas.

### 3. Estudio de las propiedades de la membrana externa y de la virulencia en modelos celulares y en ratón de los mutantes seleccionados tras la caracterización preliminar

#### 3.1. Propiedades de la membrana externa

Debido a que la ME de *Brucella* posee una serie de características que la hacen en gran parte responsable de sus particularidades como patógeno intracelular (Moriyón & López-Goñi., 1998; Martín-Martín *et al.*, 2011; Moreno & Moriyón., 2002; Vizcaíno & Cloeckert., 2012), la introducción de alteraciones en la ME puede repercutir en el establecimiento del proceso infeccioso (Lamontagne *et al.*, 2007). Por ello, parte de la caracterización de los mutantes seleccionados consistió en evaluar una serie de propiedades de la ME. Junto con los tres mutantes seleccionados y con el fin de poder realizar comparaciones entre cepas que ayudaran a comprender los resultados de virulencia y profundizar en el conocimiento de la ME, se incluyeron mutantes de la colección generada y otros disponibles en nuestro laboratorio. Los ensayos comprendieron el análisis de la topología de la ME con MAbs frente a diferentes epítomos de la misma, de la capacidad de autoaglutinación y de la resistencia a compuestos relacionados con los mecanismos de defensa (extracelulares e intracelulares) del hospedador: polimixina B, desoxicolato sódico, peróxido de hidrógeno, desoxicolato sódico y suero no inmune (Martín-Martín *et al.*, 2011).

Los ensayos llevados a cabo para evaluar las propiedades de la ME de las cepas mutantes  $\Delta omp31\Delta cgs$ ,  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  demostraron que todas ellas exhibían notables alteraciones, entre ellas una elevada capacidad de autoaglutinación (**Apartado 3 de Resultados, Figura 26 A**) y un incremento de la sensibilidad a polimixina B y a  $H_2O_2$  (**Tabla XII**), con respecto a la cepa parental y a los mutantes simples y dobles correspondientes ( $\Delta omp31$ ,  $\Delta omp10\Delta ugpB$ ,  $\Delta omp10\Delta omp31$ , respectivamente) (**Tabla XII**). Estos resultados sugieren un efecto acumulativo de las mutaciones introducidas en las características de la ME de los mutantes múltiples analizados. En cuanto a la capacidad de autoaglutinación, en algunos microorganismos como *E. coli* está relacionada con su virulencia (Knutton *et al.*, 1999). Sin embargo, la existencia de este fenómeno en *Brucella* se relaciona con la introducción de cambios en la carga neta de la superficie bacteriana (González *et al.*, 2008) y no se ha demostrado una correlación con la virulencia (Martín-Martín *et al.*, 2011). Así, algunas cepas virulentas lisas como *B. suis* 1330, rugosas como *B. ovis* PA o la cepa vacunal atenuada lisa *B. melitensis* Rev1, no son capaces de aglutinar, mientras que la cepa atenuada rugosa *B. abortus* RB51 y la cepa virulenta rugosa *B. canis* RM6/66 presentan una elevada capacidad de autoaglutinación (Martín-Martín *et al.*, 2011). En estudios previos se ha demostrado que la ausencia individual de los genes *omp31* y *cgs* causa en *B. ovis* PA alteraciones de la capacidad autoaglutinación (Martín-Martín *et al.*, 2012; Sancho., 2014). Puesto que la inactivación (tanto individual como simultánea), de los genes *omp10* y *ugpB* no altera la capacidad de autoaglutinación de *B. ovis* PA (Sidhu-Muñoz *et al.*, 2016), podemos relacionar, por tanto, que la sedimentación observada en las cepas  $\Delta omp31\Delta cgs$ ,  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$ , viene dada por el efecto acumulativo de la ausencia de los genes *omp31* y *cgs*, en la primera de ellas y en los dos mutantes triples, del gen *omp31* junto con los dos genes restantes. Cabe destacar la fuerte capacidad de

autoaglutinación presentada por el mutante triple  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$ , con los mayores niveles de sedimentación entre las cepas analizadas (**Figura 26 A**). Estos resultados sugieren importantes cambios en la ME de *B. ovis* PA fruto de la ausencia de los genes de proteínas mayoritarias y minoritarias en esta cepa, lo cual pone de manifiesto la importancia descrita de estos elementos en la estructura de la misma (Moriyón & López-Goñi., 1998). Por último, la elevada sensibilidad de estos mutantes a péptidos catiónicos y peróxido de hidrógeno, mecanismos bactericidas de las células fagocíticas (Jenssen *et al.*, 2006; Flannagan *et al.*, 2012), a los que la cepa parental *B. ovis* PA es igual o más resistente que cepas lisas de *B. melitensis* y *B. abortus* (Martín-Martín *et al.*, 2011), podría contribuir a una menor capacidad para sobrevivir en el interior de este tipo de células y, en consecuencia, afectar al establecimiento del nicho replicativo. Además, el mutante triple  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  presentó una marcada sensibilidad a suero no inmune, mecanismo extracelular de defensa al que *B. ovis* PA es también especialmente resistente (Martín-Martín *et al.*, 2011), poniendo de nuevo de manifiesto las importantes alteraciones en las propiedades de la ME de este mutante. En conjunto, parece posible que las alteraciones observadas en la ME de los mutantes  $\Delta omp31\Delta cgs$ ,  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$ , junto con el defecto en el crecimiento observado en todos ellos (**Apartado 2.1. de Resultados, Tabla XI**), puedan contribuir a la atenuación de la virulencia observada (**Apartado 2.2. de Resultados, Figura 21**).

### 3.2. Ensayos de virulencia en modelos celulares de infección

Una de las principales características de las especies de este género es su capacidad de penetrar y sobrevivir en células fagocíticas profesionales y no profesionales, estando la relación entre la persistencia de *Brucella* en macrófagos y su virulencia bien documentada (Celli *et al.*, 2003; Celli., 2006; Martín-Martín *et al.*, 2010, 2012; Copin *et al.*, 2012; Xavier *et al.*, 2013; Hanot-Mambres *et al.*, 2015). En las condiciones experimentales empleadas en este trabajo, no se observaron diferencias significativas en la capacidad de penetración de los mutantes  $\Delta omp31\Delta cgs$ ,  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  en macrófagos murinos J774.A1 (**Apartado 3.2.1. de Resultados, Figura 27 A**). Sin embargo, transcurridas 20 horas p.i., los tres presentaron una reducción de los recuentos intracelulares mayor que la observada en *B. ovis* PA. Se relaciona con defectos en la virulencia el hecho de que, transcurridas las primeras 12 horas p.i., la cepa muestre un rápido descenso de UFC intracelulares, puesto que la formación de la vacuola replicativa en macrófagos ocurre aproximadamente al cabo de este tiempo (Baldwin & Goenka., 2006; de Figueiredo *et al.*, 2015). A pesar del mayor descenso de UFC intracelulares a 20 horas p.i., los tres mutantes fueron capaces de sobrevivir e incrementar el número de UFC intracelulares, aunque sin alcanzar los niveles de infección de la cepa parental a las 44 horas p.i. (**Figura 27 B-D**). Los resultados obtenidos por microscopía confocal de inmunofluorescencia (**Figura 28**) confirmaron la menor infección intracelular a partir de las 20 h p.i., al menos de los mutantes  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$ , en comparación con la cepa parental *B. ovis* PA (**Figura 28**). Estos defectos observados en macrófagos murinos podrían contribuir a la atenuación observada *in vivo* (**Figura 21**).

En el análisis del comportamiento en células epiteliales HeLa, se observaron diferencias en la capacidad de penetración de las tres cepas, respecto a la mostrada por *B. ovis* PA. En concreto, los mutantes  $\Delta omp31\Delta cgs$  y  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  mostraron una penetración en células HeLa de aproximadamente 1 Log superior a la de *B. ovis* PA, mientras que en el mutante triple  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  los recuentos iniciales fueron aproximadamente de 1,5 Log inferiores a los obtenidos con la cepa parental (**Figura 29 A**). En base a dichas diferencias, también observadas en el análisis por microscopía confocal (**Figura 31**), se analizaron los mutantes simples y dobles correspondientes. Por un lado, las cepas  $\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31$  presentaron un incremento en la capacidad de penetración similar a la de los mutantes  $\Delta omp31\Delta cgs$  y  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  (**Figura 29 B**) y no se observaron diferencias significativas en el nivel de penetración de los mutantes simples  $\Delta cgs$  (**Figura 29 B**),  $\Delta omp10$  (Sidhu-Muñoz *et al.*, 2016) y  $\Delta ugpB$  (**Figura 14 C**), ni del mutante doble  $\Delta omp10\Delta ugpB$  (**Figura 29 B**) en células HeLa. Estos resultados muestran que la mayor penetración en células epiteliales HeLa de

$\Delta omp31\Delta cgs$  y  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  se debe a la ausencia individual del gen *omp31*. La excepción a la mayor internalización en células HeLa de los mutantes que contienen la delección del gen *omp31* la constituye el mutante  $\Delta omp10\Delta omp31B\Delta omp25c$ , que tiene delecionados genes de OMPs mayoritarias en *B. ovis* PA (Martín-Martín *et al.*, 2009) y en el gen de la lipoproteína Omp10. Este mutante, por el contrario, presentó recuentos iniciales más de 10 veces inferiores a los obtenidos con la cepa parental (**Figura 29 A**). Resultados similares se obtuvieron también con el mutante  $\Delta omp31\Delta omp10\Delta omp25c$  que contiene los mismos genes delecionados en orden diferente (datos no mostrados). Además, aunque la eliminación individual de los genes *omp25* y *omp25c* no modifica el comportamiento de *B. ovis* PA en células HeLa (**Figura 31 E-F**), la doble delección de estos genes, que codifican dos OMPs mayoritarias en *B. ovis* PA (Martín-Martín *et al.*, 2009), también conducen a una menor internalización en células HeLa (**Figura 29 B**). Estos resultados sugieren que es necesaria la contribución conjunta de genes de OMPs mayoritarias de la familia Omp25/Omp31 para una internalización eficaz en células epiteliales HeLa. Esta hipótesis se apoya además en los resultados obtenidos por microscopía confocal de inmunofluorescencia (**Figura 30 D**), donde se observó que, tras la penetración del mutante  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$ , éste presentaba una localización periférica en las células epiteliales. Este hecho podría estar relacionado además, con la elevada capacidad de autoaglutinación que posee el mutante  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  (**Figura 26 A**).

Respecto al fenómeno del incremento en la penetración celular, se considera que éste puede ocurrir cuando se produce una mayor exposición de determinadas moléculas en la superficie de *Brucella* (Martínez de Tejada & Moriyón., 1993; Bowden *et al.*, 1995 a; Moreno & Gorvel., 2004). En este respecto, la detección de una mayor reactividad de los MAb anti-Omp25 en los mutantes carentes del gen *omp31* (**Figura 25 A**), sugiere una alteración de epítomos Omp25 expuestos y/o de su conformación que podría estar acompañada de otras alternaciones en la superficie de las bacterias y afectar a la penetración de éstas en la célula. En concreto, el MAb A76/08H09/A02, el cual reconoce epítomos de la proteína Omp25 de *B. melitensis* B115 (Cloeckaert *et al.*, 1996), mostró una baja reactividad frente a las células de *B. ovis* PA en ELISA, la cual fue superior en los mutantes (**Figura 25 A**). Debido al isotipo del MAb A02 (IgG3), se cree que reconoce preferentemente epítomos glicosilados (Greenspan & Cooper., 1992; Quintana *et al.*, 2008), los cuales podrían estar presentes en la proteína Omp25 debido a su asociación con el PG (Cloeckaert *et al.*, 1992). Por tanto, en condiciones normales, este epítomo se encontraría menos accesible en la superficie de *B. ovis* PA. También se ha descrito que la inactivación del gen *omp31* en *B. ovis* PA conduce a un mayor nivel de las proteínas Omp25 y Omp25c, ambas mayoritarias en la ME de *B. ovis* (Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2009), por lo que las dos proteínas podrían contribuir conjuntamente en la penetración de esta especie en células epiteliales. La limitada capacidad de penetración en células HeLa que posee el mutante doble  $\Delta omp25\Delta omp25c$  reforzaría esta hipótesis. En base a lo expuesto anteriormente, la mayor penetración de los mutantes  $\Delta omp31$ ,  $\Delta omp31\Delta cgs$  y  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  sugiere una contribución de las proteínas codificadas en los genes *omp31*, *omp25* y posiblemente *omp25c* en *B. ovis* PA, de manera coordinada a la internalización de la bacteria en este tipo celular. Esto a su vez es coherente con los estudios realizados con mutantes *bvrR/bvrS* de *B. abortus* 2308, los cuales no son capaces de penetrar en distintos tipos celulares y no estimulan la generación de las formas activas de las pequeñas GTPasas de la familia Rho en el contacto celular (Guzmán-Verri *et al.*, 2001). Estas características se han relacionado con la reducción en la expresión de las proteínas de la familia Omp25/Omp31 (Lamontagne *et al.*, 2007), esto está en consonancia con la baja penetración que presenta el mutante  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$ . De acuerdo con lo anterior, la redundancia existente entre los miembros de la familia Omp25/Omp31 (Martín-Martín *et al.*, 2009) podría ser una adaptación encaminada a preservar, al menos, funciones relacionadas con la penetración intracelular de *Brucella*.

Aunque la contribución directa de las células epiteliales a la infección por *Brucella* no está completamente clara, se considera que la colonización de este tipo de células es un punto importante de contacto inicial antes de la diseminación de la bacteria por el sistema reticuloendotelial (Rossetti *et al.*, 2012, 2013; de Figueiredo *et al.*, 2015). Estas células constituyen pues, la primera barrera mecánica e inmunológica frente a la infección por

*Brucella* (Rossetti *et al.*, 2012). Por ello, una menor entrada y/o supervivencia en células epiteliales podría condicionar negativamente la colonización inicial del huésped y la evolución del proceso infeccioso. Sin embargo, la limitada capacidad invasiva y replicativa que presentan los mutantes  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  y  $\Delta omp25\Delta omp25c$  en células HeLa sólo se corresponde con la atenuación *in vivo* observada en el primero (**Figura 21**). Por lo tanto, un defecto en el comportamiento bacteriano observado en este modelo celular, no implica atenuación *in vivo* en modelo murino. Esto podría deberse, por un lado, a la naturaleza de la línea celular HeLa, la cual es de origen humano. Teniendo en cuenta el carácter no zoonótico de *B. ovis*, el mutante  $\Delta omp25\Delta omp25c$  podría ser fagocitada *in vivo* por diversos tipos de células epiteliales de ratón y de no epiteliales como macrófagos, en las que podría alcanzar un nicho replicativo. Otra posible explicación recaería en la mayor alteración de las propiedades de la ME que presenta el mutante  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$ , en comparación con el mutante  $\Delta omp25\Delta omp25c$ . Así, la fuerte capacidad de autoaglutinación mostrada por el primero (**Figura 26 A**) y su sensibilidad a suero no inmune (**Tabla XIII**) (mecanismo asociado al control de patógenos en el medio extracelular), no se observaron en el mutante doble  $\Delta omp25\Delta omp25c$  (**Figura 26 B**, **Tabla XIII**). Por último, ni el mutante  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$ , ni el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpb\Delta omp31$  se replican en células HeLa, lo cual puede contribuir a la atenuación observada *in vivo* (**Figura 21**).

### 3.3. Evaluación en modelo murino de los mutantes atenuados $\Delta omp31\Delta cgs$ , $\Delta omp10\Delta ugpb\Delta omp31$ y $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$ en la dosis vacunal

Dentro del control de la calidad de las VVA frente a *Brucella* es necesario evaluar la inocuidad de las cepas (virulencia residual) y su inmunogenicidad tanto en el modelo murino, como en el hospedador final (Bosserey., 1992; Banai., 2002). A tal efecto, se empleó un modelo murino para evaluar, durante 11 semanas, la persistencia (analizada en bazo) y la respuesta inmune humoral inducida en ratones, tras la inoculación de una dosis de  $10^8$  UFC/ratón de los mutantes  $\Delta omp31\Delta cgs$ ,  $\Delta omp10\Delta ugpb\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$ , dosis habitualmente empleada en experimentos de protección con vacunas atenuadas (Sancho *et al.*, 2014; Soler-Lloréns *et al.*, 2014). La dosis vacunal se seleccionó con el objetivo de incrementar tanto el grado de colonización esplénica como la persistencia bacteriana, puesto que, según sugieren estudios realizados con las vacunas *B. abortus* S19 y *B. abortus* RB51, para que se induzca una respuesta inmune adecuada y duradera, las cepas vacunales deben persistir durante un tiempo en los tejidos del sistema reticuloendotelial (Kahl-McDonagh & Ficht., 2006; Grilló *et al.*, 2012). La cepa parental *B. ovis* PA desarrolló una infección en bazo acorde con el carácter virulento previamente descrito (Jiménez de Bagüés *et al.*, 1993, 1994; Caro-Hernández *et al.*, 2007), alcanzando recuentos esplénicos máximos en la semana 3 p.i. (fase aguda) y los cuales se mantuvieron elevados hasta la semana 7 p.i. (fase crónica constante), disminuyendo hacia el final del experimento en la semana 11 p.i. (**Figura 32**). En cambio, las cepas  $\Delta omp31\Delta cgs$ ,  $\Delta omp10\Delta ugpb\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  de *B. ovis* PA mostraron diferencias en la capacidad para multiplicarse y persistir en el bazo (**Figura 32 A-C**). En la semana 3 p.i., coincidiendo con la fase aguda de la infección por *B. ovis* PA, los tres mutantes mostraron recuentos esplénicos inferiores a los obtenidos en los animales inoculados con la cepa parental a la dosis vacunal. Además, los mutantes  $\Delta omp31\Delta cgs$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  mostraron un alargamiento de la fase de aguda de infección, desarrollando recuentos esplénicos máximos hacia la semana 5 p.i., si bien estos fueron marcadamente inferiores a los de *B. ovis* PA (**Figura 32 A,C**). A partir de este punto, los mutantes  $\Delta omp31\Delta cgs$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  produjeron un nivel de infección similar al de la cepa parental. En cambio, los animales inoculados con el mutante triple  $\Delta omp10\Delta ugpb\Delta omp31$  no mostraron fase crónica ya que, tras desarrollar una fase aguda con niveles de infección inferiores a los de la cepa parental, su presencia en el bazo se redujo forma drástica desde la semana 3 p.i. (**Figura 32 B**). Estos resultados muestran, por un lado, un incremento de la colonización esplénica y de la persistencia de los mutantes al incrementar la dosis de inoculación. Este comportamiento podría estar relacionado con los resultados obtenidos en macrófagos J774.A1 en los que la disminución de los recuentos de UFC a las 20 h p.i. fueron más acusados en los tres mutantes que

en *B. ovis* PA. Este importante descenso del número organismos intracelulares podría conducir a la eliminación de la bacteria cuando la dosis de inoculación es de  $10^6$  UFC/ratón, mientras que al incrementar la dosis de inoculación, un cierto porcentaje de bacterias podría escapar a los mecanismos bactericidas de las células fagocíticas y conseguir establecer un nicho replicativo conducente a una infección activa. Esto estaría también en consonancia con el alargamiento de la fase aguda de infección observado en los mutantes  $\Delta omp31\Delta cgs$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  (**Figura 32 A, C**). Por el contrario, el comportamiento del mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  en ratón es difícil de explicar teniendo en cuenta los parámetros analizados en este estudio. Aunque el descenso de UFC intracelulares a las 20 h pi. En macrófagos J774.A1 fue algo más acusado en este mutante que en el caso de los dos anteriores (**Figura 27**), el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  también consiguió incrementar los recuentos en macrófagos a las 44 h p.i. (**Figura 27 B**), observándose su replicación en algunas células por microscopía de inmunofluorescencia (**Figura 28 B**). La eliminación del mutante del bazo que se inicia a partir de la semana 3 p.i., podría estar relacionado con mecanismos de defensa extracelulares del hospedador. Sin embargo, el mutante  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$ , que mostró recuentos elevados en bazo hasta la semana 11 p.i. (**Figura 32 B**), fue, en general, más susceptible a todos los elementos analizados que el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ . Una inducción de una mayor respuesta inmune también podría explicar un mejor control de la infección. En este sentido hay que señalar que el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  induce una respuesta de anticuerpos más elevada que la inducida por los otros dos mutantes a partir de la semana 5 p.i. (**Figura 33**) y que podría conducir a su eliminación.

Teniendo en cuenta el perfil de persistencia desarrollado por los tres candidatos y el hecho de que una elevada virulencia residual podría comprometer la seguridad del uso de la cepa vacunal (Grilló *et al.*, 2000), se seleccionó el mutante triple  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  de *B. ovis* PA para ser analizado como VVA debido a su mayor atenuación. Así mismo, en base a la persistencia observada (**Figura 32 C**), se estableció la semana 7 p.i. como momento más temprano en el que realizar la infección experimental con la cepa virulenta en los ensayos de protección (**Apartado 10.3.4. de Materiales y Métodos**). Dicho tiempo p.i. fue elegido para evitar la presencia de la cepa mutante en el bazo de los animales en el momento de la infección experimental y, por tanto, un posible efecto competitivo entre ambas que pudiera distorsionar los resultados referentes a la protección (Kahl-McDonagh *et al.*, 2006).

Respecto a la evolución del tamaño de los bazos, en los animales inoculados con *B. ovis* PA se observó un incremento del peso de este órgano en comparación con los ratones control (PBS) (**Figura 32 D**). El aumento del tamaño del bazo (esplenomegalia) es fruto de una respuesta inflamatoria producida mientras la bacteria se replica en el tejido, tratándose de un efecto dependiente de la dosis y de la virulencia de la cepa (Grilló *et al.*, 2012; Roset *et al.*, 2014). Las cepas virulentas de *Brucella* son capaces de producir una marcada esplenomegalia ( $>0,4$  g/bazo) en el ratón, la cual se hace evidente a partir de la semana 3 p.i., pudiendo bien disminuir lentamente (Arenas-Gamboa *et al.*, 2011) o mantenerse hasta el final de la fase crónica (Fernández-Lago *et al.*, 2005). En cambio, el peso de los bazos de ratones vacunados con cepas atenuadas como *B. abortus* S19 pueden producir un pico de esplenomegalia incluso superior al observado en la cepa virulenta *B. abortus* 2308 para el mismo periodo de tiempo, pero éste disminuye rápidamente (Grilló *et al.*, 2012). Acorde con el carácter virulento de *B. ovis* PA, los bazos de los ratones mostraron una marcada esplenomegalia, la cual se detectó en coincidencia con el máximo de recuentos esplénicos en la semana 3 p.i. y se mantuvo hasta el final del experimento a la semana 11 p.i. (**Figura 32 D**). Estos resultados son similares a los observados en el empleo de otras cepas virulentas de *B. ovis* en modelo murino (Silva *et al.*, 2011). En cuanto a los bazos de los animales inoculados con las tres cepas recombinantes, todos ellos mostraron menor inflamación respecto a los animales inoculados con *B. ovis* PA (**Figura 32 D**). Además, no se observaron en general, importantes diferencias entre el peso de los bazos de dichos grupos experimentales y el grupo control sin infectar (PBS).

Cabe destacar que los bazos de los ratones inoculados con el mutante  $\Delta omp31\Delta cgs$  fueron refractarios a la inflamación durante los tiempos analizados, sin observarse diferencias con los pesos observados en el grupo de PBS (**Figura 32 D**), a pesar de presentar un elevado grado de infección (**Figura 32 A**). En estudios previos se ha

observado que la inactivación individual del gen *omp31* en *B. ovis* PA no altera la aparición de esplenomegalia (peso de bazo) durante la infección en los ratones. En cambio, ésta es limitada en los animales inoculados con el mutante  $\Delta cgs$  (Sancho., 2014). Por tanto, la ausencia de esplenomegalia, a pesar de recuentos elevados de UFC en bazo, en los ratones inoculados con el mutante  $\Delta omp31\Delta cgs$  puede relacionarse con la inactivación del gen *cgs*. Estos resultados coinciden con lo descrito en trabajos previos donde se ponía de manifiesto que mutantes  $\Delta cgs$  tanto de la cepa virulenta *B. abortus* 2308, como de la vacunal *B. abortus* S19, inducían una esplenomegalia muy reducida en los ratones, incluso en presencia de recuentos esplénicos elevados (Briones *et al.*, 2001; Roset *et al.*, 2014). *Brucella* expresa factores de virulencia que interfieren con la activación temprana de la respuesta innata, fundamentalmente inhibiéndola (Martirosyan *et al.*, 2011). Sin embargo, los glucanos cíclicos (C $\beta$ G) son potentes moléculas proinflamatorias (Roset *et al.*, 2014) que presentan baja toxicidad y han mostrado ser importantes activadores de la respuesta inmune en células dendríticas (Degos *et al.*, 2015). Aunque se desconoce el mecanismo molecular exacto por el que los C $\beta$ G de *Brucella* producen esplenomegalia en el ratón, se ha especulado, por un lado, que podría deberse a que su presencia en el espacio periplásmico contribuyera a la estabilización de la expresión de PAMPs como lipoproteínas y S-LPS en las especies lisas (Roset *et al.*, 2014). De este modo, la inactivación del gen *cgs* podría alterar la exposición de estas moléculas en la superficie de la bacteria y producirse una menor activación de los receptores de la respuesta innata en fagocitos, resultando en una reducción de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, los mutantes de *B. abortus* en el gen *cgs* no muestran diferencias en la expresión de las lipoproteínas Omp16, Omp19, ni de la cadena O del LPS (Roset *et al.*, 2014). De manera similar, en el presente trabajo no se observaron diferencias en la reactividad de MAbs frente a distintos epítomos de la ME, incluidos epítomos de las lipoproteínas Omp10, Omp16 y Omp19 y el R-LPS en el mutante  $\Delta cgs$  (**Figura 23 B**), ni en el mutante  $\Delta omp31\Delta cgs$  (**Figura 23 C**). Por otro lado, la menor esplenomegalia observada en los mutantes  $\Delta cgs$  de *B. abortus* se relaciona con el menor reclutamiento de poblaciones celulares (monocitos, células dendríticas y neutrófilos) observado en este órgano (Roset *et al.*, 2014). En concreto, la ausencia de PMNs en ratones KO infectados con *B. abortus* 2308 incrementó la activación de poblaciones linfocitos T CD4+, CD8+ y linfocitos B, mejorando la eliminación de la infección en bazo (Barquero-Calvo *et al.*, 2013).

La menor esplenomegalia observada en los ratones inoculados con los mutantes constituye una característica ventajosa en una vacuna atenuada ya que este rasgo se asocia a un menor riesgo de producción de lesiones inflamatorias (Silva *et al.*, 2011). Por el contrario, la vacuna de referencia *B. melitensis* Rev1 induce una marcada esplenomegalia que puede considerarse un efecto secundario indeseado (Arenas-Gamboa *et al.*, 2008; Sancho *et al.*, 2014).

### 3.4. Respuesta inmune humoral inducida por los mutantes $\Delta omp31\Delta cgs$ , $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ y $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$

Para analizar la respuesta inmune humoral inducida por las cepas  $\Delta omp31\Delta cgs$ ,  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  de *B. ovis* PA se determinaron en el suero de los animales inmunizados ( $10^8$  UFC/ratón) los niveles de anticuerpos de la clase IgG capaces de reaccionar frente a células enteras de *B. ovis* PA (**Apartado 3.3. de Resultados**). Todos ellos indujeron la producción de niveles elevados de anticuerpos tipo IgG específicos frente a *B. ovis* PA, los cuales se detectaron en diferentes momentos p.i. en función de la cepa (**Figura 33**). En cambio, tras la inoculación de los mutantes en dosis  $10^6$  UFC/ratón no se obtuvieron recuentos esplénicos, o estos fueron muy bajos (**Figura 21**), y los niveles de IgG frente a *B. ovis* PA fueron también marcadamente inferiores a los detectados tras la inoculación en la dosis vacunal seleccionada de  $10^8$  UFC/ratón (**Figura 33 D**). Estos resultados sugieren la necesidad de un cierto grado de infección en los ratones para que se produzca una respuesta de anticuerpos detectable en suero.

La detección de anticuerpos tras la inmunización con el mutante  $\Delta omp31\Delta cgs$  se retrasó hasta la semana 5 p.i. (**Figura 33 A**). En el grupo inmunizado con  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  la respuesta humoral fue muy similar

a la de la cepa parental (**Figura 33 B**) y la inducida por el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  se detectó desde la semana 1 p.i., alcanzando niveles superiores a los inducidos por *B. ovis* PA desde la semana 5 p.i. hasta el final del experimento (**Figura 33 C**).

El papel de los anticuerpos en el control de la infección natural por patógenos intracelulares se ha considerado, en general, menos relevante que el ejercido por los mecanismos de inmunidad mediada por células (Casadevall., 2003), si bien existen cada vez más evidencias de que la inmunidad mediada por anticuerpos contribuye de manera importante a limitar la diseminación de este tipo de patógenos en el hospedador (Casadevall & Pirofski., 2006; Vitry *et al.*, 2014). El papel de los anticuerpos en el control de una primera infección por especies lisas como *B. abortus* y *B. melitensis* en ratón parece no ser relevante (Goenka *et al.*, 2011; Vitry *et al.*, 2012). En cambio, estudios posteriores en ratones inmunizados con la cepa virulenta *B. melitensis* 16M viva e inactivada, han demostrado un papel fundamental de los anticuerpos séricos en el control temprano de una segunda infección, limitando la diseminación de la bacteria a través de la sangre y, cuando la inmunización es realizada con células vivas, eliminándola del bazo (Vitry *et al.*, 2014). En la especie rugosa *B. ovis* la contribución de los anticuerpos para controlar la infección, tanto en ratón (Jiménez de Bagüés *et al.*, 1994) como en carneros (Jiménez de Bagüés *et al.*, 1995), parece significativa ya en una primera infección. Por todo esto, es deseable que una vacuna frente a *B. ovis* induzca una respuesta humoral temprana, como la que se observa tras la inmunización con el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ , para poder conseguir una protección eficaz de la infección. A este respecto, y como se ha comentado anteriormente, cabe destacar, en el grupo inmunizado con el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  (**Figura 33 B**), la coincidencia temporal entre la presencia de títulos de IgG superiores a los observados en la infección con *B. ovis* PA a partir de la semana 5 p.i. (fase crónica) y la marcada reducción de su persistencia en bazo (**Figura 32 C**). En cambio, el retraso en la producción de anticuerpos séricos observado en la inmunización con las cepas  $\Delta omp31\Delta cgs$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  podría relacionarse, al menos en parte, con su prolongada persistencia en bazo.

#### 4. Análisis en modelo murino del interés como vacuna del mutante atenuado más relevante

##### 4.1. Respuesta inmune inducida por el mutante $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$

El desarrollo de una respuesta inmune adaptativa (humoral y celular) es determinante en el establecimiento de la memoria inmunológica, la cual es un aspecto fundamental de la vacunación (Baldwin & Goenka., 2006). Por tanto, se realizaron una serie de ensayos encaminados a analizar el tipo de respuesta inmune humoral y celular inducida por la inmunización con el candidato vacunal  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  ( $10^8$  UFC/ratón), empleando como referencia la inmunización con la vacuna heteróloga *B. melitensis* Rev1 ( $10^5$  UFC/ratón) y un control negativo sin inmunizar (PBS) (**Apartado 4.1. de Resultados**). En el presente trabajo se analizaron, frente a células enteras de *B. ovis*, las subclases IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> e IgG<sub>2b</sub> presentes en el suero de los animales a la semana 7 p.i.. Este momento coincide, en los mismos animales, con la segunda estimulación *in vitro* con *B. ovis* PA de cultivos de esplenocitos para el análisis de la producción de citocinas, y, en los animales empleados en los experimentos de protección, con la infección experimental.

En la brucelosis murina por cepas lisas, un predominio de las subclases IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, e IgG<sub>3</sub> sobre la subclase IgG<sub>1</sub> se considera indicativo de la inducción de una respuesta inmune mediada principalmente por células o Th1 (Elzer *et al.*, 1994; Fernández-Lago *et al.*, 1996). Las células T, mediante la secreción de IFN $\gamma$ , facilitan la activación de los mecanismos bactericidas en macrófagos y la producción de subclases IgG<sub>2a</sub> y IgG<sub>3</sub> implicadas en la opsonización y facilitación de la fagocitosis (Ko & Splitter., 2003). La aparición temprana de una respuesta de tipo Th1 tras la inmunización es un factor clave en la protección frente a *Brucella* (Giambartolomei *et al.*, 2002; Baldwin & Goenka., 2006; Vitry *et al.*, 2012; Palomares-Resendiz *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2015 b). Por otro lado, el predominio en suero de la subclase IgG<sub>1</sub> sobre el resto indica un balance hacia una respuesta mayoritariamente humoral o Th2 (Cassataro *et al.*, 2005). En la infección de *B. ovis* en ratón

los anticuerpos reactivos con el extracto salino de *B. ovis*, son predominantemente de tipo IgG<sub>2a</sub> e IgG<sub>3</sub> (Jiménez de Bagüés *et al.*, 1994). El papel de los anticuerpos en el control de la infección por *B. ovis* se atribuye a la opsonización, la mediación de la muerte celular por las proteínas del complemento o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Jiménez de Bagüés *et al.*, 1994). En este trabajo no se observó el predominio de ninguna de las subclases de IgG frente a células enteras de *B. ovis* PA, si bien los títulos de las distintas subclases detectados en los animales inmunizados con el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  se situaron en valores muy superiores a los obtenidos en los animales inoculados con la vacuna Rev1 (**Figura 34**).

Estos resultados indican, por un lado, la inducción de una respuesta adaptativa de naturaleza mixta Th1/Th2 en una primera inmunización. Este tipo de respuesta heterogénea, también observada tras la inmunización con cepas mutantes atenuadas derivadas de *B. abortus* (Pasquali *et al.*, 2001), *B. canis* (Palomares-Resendiz *et al.*, 2012) y de *B. ovis* (Sancho *et al.*, 2014), no parece comprometer la protección conferida por los candidatos vacunales en el ratón. La inmunización con antígenos subcelulares, por lo general, estimula la producción de determinadas subclases de IgG (Cassataro *et al.*, 2005, 2007; Riquelme-Neira *et al.*, 2013; Gómez *et al.*, 2016). En cambio, tras la inmunización con cepas vivas atenuadas de *Brucella* suele detectarse una respuesta adaptativa compleja, con combinación de efectores Th1 y Th2, lo cual redundaría en el mayor poder estimulador de la inmunidad adaptativa que se atribuye a las vacunas basadas en cepas vivas atenuadas (Vitry *et al.*, 2014). Además, mediante el empleo de un panel de ratones con fenotipos deficientes en varias vías de activación de la respuesta adaptativa (linfocitos T CD4+, adaptador MyD88, entre otras), que mostraban varias subclases de IgG alteradas, se ha demostrado que el predominio de estas no es un factor crítico en conferir protección frente a *B. melitensis* en una segunda infección (Vitry *et al.*, 2014). Sin embargo, el establecimiento de la respuesta inmune humoral, así como de la mediada por células, es necesario para que la protección sea completa (Vitry *et al.*, 2014). Así, la detección de niveles inferiores de las subclases de IgG frente a células enteras de *B. ovis* PA en los animales inmunizados con la vacuna lisa *B. melitensis* Rev1, podría suponer un compromiso en la eficacia protectora de la respuesta humoral desarrollada por esta vacuna en la infección por *B. ovis* en ratón. Estos resultados coinciden con lo observado en sueros de carneros infectados experimentalmente con cepas lisas de *B. melitensis* y *B. abortus*, los cuales no reaccionaron con los antígenos de superficie de *B. ovis* (Suarez *et al.*, 1991). En las cepas lisas de *Brucella*, como la vacuna heteróloga *B. melitensis* Rev1, las cadenas polisacáridicas O son los antígenos inmunodominantes frente a los que se desarrollan los anticuerpos específicos (Zygmunt *et al.*, 1994; Fernández-Lago *et al.*, 1996). En cambio, en la infección por *B. ovis* éstos son el R-LPS y OMPs (Gamazo & Moriyón, 1987; Kittelberger *et al.*, 1995; Bowden *et al.*, 2000). Por tanto, el menor nivel de anticuerpos frente a *B. ovis* PA detectado en el grupo de la vacuna heteróloga, podría deberse a un menor reconocimiento cruzado de los antígenos de superficie en esta especie rugosa. En base a esto, la vacunación con una cepa homóloga de *B. ovis* como el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ , que estimule la producción de anticuerpos específicos frente a esta especie, podría contribuir a una respuesta humoral más eficaz en el control de la infección que la conferida por la vacuna *B. melitensis* Rev1. Además, puesto que las cadenas O del LPS constituyen un prototipo de antígenos T-independientes (Betts *et al.*, 1993) y por tanto, no implicados en el desarrollo de la memoria inmunológica (Baldwin & Goenka, 2006), una vacuna homóloga de *B. ovis*, carente de dichas cadenas en su R-LPS, induciría una respuesta predominantemente frente a antígenos proteicos (T-dependientes) como son las OMPs. En este contexto, la relevancia que tendría el componente de anticuerpos en la estimulación de una respuesta inmune protectora frente a *B. ovis* podría ser superior en los animales vacunados con el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  que en aquellos vacunados con *B. melitensis* Rev1. Sin embargo, esta última confiere protección heteróloga frente a *B. ovis*, pudiendo deberse además de a la producción de anticuerpos, a una mayor estimulación de la respuesta inmune celular (Sancho *et al.*, 2014). Por otro lado, la menor dosis de inmunización empleada con la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1, en comparación de la empleada con el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  de *B. ovis* PA también podría influir en el desarrollo inicial de anticuerpos, aunque hay que considerar que los recuentos en bazo de *B. melitensis* Rev1 a esa dosis son elevados ya a la semana 1 p.i. (Sancho *et al.*, 2014).

Con el fin de analizar posibles marcadores relacionados con la inmunidad celular que pudieran predecir la eficacia de la cepa atenuada  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  frente a la infección por *B. ovis*, se evaluó la producción de citocinas, tras un segundo estímulo *ex vivo* con *B. ovis* PA, por parte de esplenocitos procedentes de los animales vacunados. Los resultados se compararon con los obtenidos con esplenocitos procedentes de animales inoculados con PBS y de animales vacunados con *B. melitensis* Rev1 (**Apartado 4.1.2. de Resultados**). Las citocinas que juegan un papel fundamental en la inmunidad adaptativa frente a *Brucella* en modelo murino son IL12, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  (Ko & Splitter., 2003). Pese a que no se han identificado marcadores que se puedan correlacionar inequívocamente con una protección inmunológica en el ganado (de Figueiredo *et al.*, 2015), una inmunidad protectora frente a *Brucella* requiere de mecanismos de inmunidad mediada por células, donde la producción de IFN $\gamma$  es un parámetro clave (Murphy *et al.*, 2001; Pasquali *et al.*, 2001; Vitry *et al.*, 2012, 2014). El IFN $\gamma$  es una citocina de respuesta Th1 involucrada en la eliminación de *Brucella* por parte de macrófagos activados (Paranavitana *et al.*, 2005). En las condiciones experimentales empleadas en este trabajo, los esplenocitos de animales vacunados con el mutante atenuado  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y la vacuna *B. melitensis* Rev1 secretaron niveles elevados de IFN $\gamma$  en respuesta a la segunda estimulación con *B. ovis* PA, en comparación con los niveles en el grupo inoculado con PBS (**Figura 35 A**). Por tanto, los esplenocitos de los animales vacunados son capaces de responder a un segundo estímulo con la cepa virulenta generando una respuesta inmune de naturaleza celular. La detección de IFN $\gamma$  en ambos grupos, sugiere una activación de CPAs presentes en el bazo debido a la posible interacción/reconocimiento de componentes de *B. ovis* PA con los receptores TLR de éstas (Baldwin & Goenka., 2006). La activación de los esplenocitos queda también avalada por la detección de la producción de IL12p40 y TNF $\alpha$ . En este trabajo no se observaron diferencias significativas entre la cantidad de TNF $\alpha$  detectada en los esplenocitos procedentes de los animales inmunizados con el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y la detectada en los animales vacunados con la vacuna de referencia, cuyos niveles fueron aproximadamente el doble de los detectados en animales no inmunizados (**Figura 35 B**). El TNF $\alpha$  es una citocina pro-inflamatoria involucrada en la activación de macrófagos (Baldwin & Goenka., 2006; Salcedo *et al.*, 2008), por lo que su secreción por parte de los esplenocitos de los ratones vacunados, también podría estar relacionado con una eficacia protectora.

La producción de IFN $\gamma$  en la brucelosis murina está controlada por citocinas secretadas por CPAs, especialmente por IL12 e IL18 (Pasquali *et al.*, 2002; Fernández-Lago *et al.*, 2005). En cambio, las diferencias observadas en la producción de IFN $\gamma$  en los animales inmunizados con el mutante de *B. ovis* PA y los vacunados con *B. melitensis* Rev1 no correlacionaron con los niveles de IL12p40 detectados, los cuales fueron similares en todos los grupos de ratones (**Figura 35 D**). Pese a que la mayor producción de IFN $\gamma$ , en un segundo estímulo con *B. ovis* PA, no parece relacionarse en este trabajo con una mayor producción de IL12p40, no puede descartarse el efecto regulador de la IL18 en la producción de éste. Por otro lado, debido a que la producción de IL12 por parte de las células B y macrófagos está relacionada con la maduración y diferenciación de las células Th0 a células Th1 (Martirosyan *et al.*, 2011), esto podría relacionarse con la naturaleza mixta Th1/Th2 observada en el análisis de las subclases de IgG en los ratones inmunizados (**Figura 34**). Esto se apoyaría con la detección de citocinas de respuesta Th2 de naturaleza humoral como la IL4 (Salas-Téllez *et al.*, 2005). En este trabajo los niveles de IL2 e IL4 detectados fueron bajos en todos los animales (**Figura 35 E-F**). Estos resultados se asemejan a los observados en esplenocitos de animales inmunizados con *B. abortus* y reestimulados *in vitro*, con una producción de IL2 y e IL4 baja al menos a las 8 semanas p.i. (Zhan *et al.*, 1995). También se han observado, al menos a los 15 días p.i., resultados semejantes en la reestimulación *in vitro* de esplenocitos de animales inmunizados con *B. canis* (Palomares-Resendiz *et al.*, 2012). Los niveles de IL4 detectados en los animales inmunizados no difieren de los producidos por los animales no inmunizados (**Figura 35 F**). Sin embargo, su detección sugiere cierta contribución de la IL4 al desarrollo de una respuesta inmune humoral frente a un contacto con *B. ovis* PA. Así mismo, la IL2 sólo se detectó, en pequeñas cantidades, en los ratones vacunados con *B. melitensis* Rev1 (**Figura 35 E**). Estudios en modelo murino han mostrado que la inmunización de ratones con *Brucella* estimula una respuesta celular caracterizada por la producción de IFN $\gamma$  e IL2 (Zhan *et al.*, 1995).

En base a esto, la mayor producción de IL2 en los ratones vacunados con *B. melitensis* Rev1 podrían relacionarse con la mayor producción de IFN $\gamma$  observada en este grupo (**Figura 35 A**), lo que podría indicar la inducción de una respuesta celular más potente por la vacuna de referencia.

Finalmente, tanto en los esplenocitos de animales inmunizados con el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ , como en los de los animales vacunados con *B. melitensis* Rev1, se detectó la producción de IL10 (**Figura 33C**). Esta citocina posee carácter antiinflamatorio y se considera que su secreción por macrófagos podría reducir los efectos negativos causados por citocinas proinflamatorias como el IFN $\gamma$  (Sharif *et al.*, 2004; Corsetti *et al.*, 2013). Por tanto, los mayores niveles de IL10 detectados en los ratones vacunados con *B. melitensis* Rev1, en comparación con los inmunizados con el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ , podrían estar relacionados con la mayor producción de IFN $\gamma$  y la marcada esplenomegalia que induce en ratones (Arenas-Gamboa *et al.*, 2008; Sancho *et al.*, 2014).

#### 4.2. Evaluación de la protección conferida por el mutante $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ frente a la infección experimental por *B. ovis* PA

Por último, se evaluó la eficacia protectora de la vacunación con el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  conferida tras una infección experimental con *B. ovis* PA a las semanas 7 y 11 p.vac. Para ello, se comparó la capacidad de la vacuna experimental ( $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ ) de restringir la infección en bazo, con la mostrada por la vacuna de referencia (*B. melitensis* Rev1) o PBS (Bosserey., 1991, 1992) (**Apartado 4.2. de Resultados**). La vacunación con la cepa homóloga  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  eliminó por completo la presencia de *B. ovis* PA en el bazo de los animales cuando la infección experimental se realizó a la semana 7 p.vac. (**Tabla XIV**), siendo la protección conferida en estas condiciones de vacunación superior a la de *B. melitensis* Rev1. Además, el mutante triple también protegió significativamente frente a la infección experimental realizada a la semana 11 p.vac.

En el presente trabajo se ha demostrado que la vacunación con el mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  confiere protección duradera frente a la infección con *B. ovis* PA y que ésta es superior a la desarrollada por *B. melitensis* Rev1 en las condiciones del ensayo. Sin embargo, una mayor eficacia protectora, (menor colonización de la cepa virulenta en bazo) no parece relacionarse en el modelo empleado, con una mayor producción endógena de IFN $\gamma$  *in vitro*. Aunque una mayor secreción de esta citocina podría reflejar una memoria inmunológica superior frente a la infección por *B. ovis* en los animales vacunados con *B. melitensis* Rev1, los resultados sugieren que una producción de IFN $\gamma$  no implica necesariamente una mayor protección. Por tanto, la protección frente a la infección probablemente no se deba a los niveles absolutos de una única citocina, aunque hay que tener en cuenta que los esplenocitos de los ratones vacunados con  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  también secretaron altísimos niveles de IFN $\gamma$  al entrar en contacto con *B. ovis* PA. Así mismo, el análisis de la presencia de citocinas en suero o en otros tejidos como nódulos linfáticos podría contribuir a una mejor comprensión de la relación entre la respuesta inmune y la protección (Grilló *et al.*, 2012).

Por otro lado, otras VVA experimentales de *B. ovis*, como las portadoras de inactivaciones en los genes *omp25d* y *omp22* (Sancho *et al.*, 2014), en genes del núcleo del R-LPS (Soler-Lloréns *et al.*, 2014) o en un transportador de tipo ABC específico (Silva *et al.*, 2015 b) confieren una protección homóloga frente a *B. ovis* en modelo murino si bien, ésta es similar a la conferida por la vacuna heteróloga *B. melitensis* Rev1. Así, el mutante triple  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  presenta, en dicho modelo, una eficacia protectora superior a éstas. Además, el mutante triple presenta una baja virulencia residual, en contraste con la vacuna atenuada *B. melitensis* Rev1, la cual puede persistir hasta 15 semanas (Grilló *et al.*, 2000). El fenotipo atenuado se mantiene incluso en la administración de dosis elevadas, lo cual redundaría en la seguridad del empleo de la cepa  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ . La seguridad es un parámetro fundamental en el diseño de VVA (Ficht *et al.*, 2009; Pandey *et al.*, 2016) del que no se dispone de datos en el caso de los mutantes del núcleo del R-LPS (Soler-Lloréns *et al.*, 2014) o del transportador ABC de *B. ovis* (Silva *et al.*, 2011, 2015 b), aunque la administración de este último no presenta potencial patogénico en carneros (Silva *et al.*, 2015 b). Sin embargo, el mutante  $\Delta abcBA$ , que confiere protección

frente a *B. ovis* en carneros, presenta una pobre persistencia, tanto en modelo murino (Silva *et al.*, 2011) como en el hospedador natural (Silva *et al.*, 2013), por lo que se propone su administración encapsulada (Silva *et al.*, 2015 a, 2015 b). En contraste, a pesar de la elevada atenuación del mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  durante al menos 3 semanas en el bazo de los animales vacunados con importantes niveles bacterianos, superiores a los descritos para las demás vacunas de *B. ovis*. La persistencia, al menos durante un tiempo, en los tejidos del sistema reticuloendotelial es necesaria para que se estimule una respuesta inmune adecuada y duradera (Kahl-McDonagh & Ficht., 2006; Grilló *et al.*, 2012), por lo que la presencia del mutante  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  en el bazo de los ratones vacunados, podría favorecer, al menos en parte, la inducción de una respuesta inmune protectora. Además, a pesar de la protección homóloga conferida por las actuales vacunas experimentales, éstas no permiten la diferenciación serológica entre animales vacunados e infectados por *B. ovis*. La presencia de la inactivación del gen de la proteína mayoritaria Omp31 e inmunodominante en la infección por *B. ovis*, favorecería una diferenciación diagnóstica serológica entre la vacuna y las cepas virulentas (Kittelberger *et al.*, 1998; Vizcaíno *et al.*, 2001). Así, la vacuna homóloga *B. ovis*  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ , carente de Omp31 facilitaría un diagnóstico serológico DIVA que aportaría una ventaja adicional en las campañas de control y erradicación de la enfermedad. Sin embargo, aunque el modelo murino es un método consistente y eficiente para la evaluación de candidatos potenciales a vacunas frente a *Brucella* (Grilló *et al.*, 2012), presenta limitaciones que no permiten la estimación directa de la protección conferida en los hospedadores naturales. En base a los resultados obtenidos en este trabajo y a las limitaciones del empleo de la vacuna *B. melitensis* Rev1 en la profilaxis de las infecciones por *B. ovis*, el mutante triple  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  constituye un interesante candidato a evaluar en carneros como vacuna homóloga específica frente a la epididimitis contagiosa ocasionada por *B. ovis*.

## **Conclusiones**



A la vista de los resultados obtenidos en este trabajo se pueden establecer las siguientes conclusiones principales:

1. Los genes *bepC* y *ugpB* no son esenciales para la virulencia de *B. ovis* PA en modelo murino y no se relacionan con la supervivencia bacteriana en el interior de macrófagos J774A.1 y células epiteliales HeLa o con las propiedades de la membrana externa estudiadas.
2. Los resultados obtenidos con los mutantes  $\Delta bepC$  y  $\Delta ugpB$  de *B. ovis* PA, que difieren de los descritos anteriormente para cepas lisas del género *Brucella*, ponen de manifiesto las diferencias existentes entre especies del género *Brucella* a pesar de su elevado grado de similitud genética.
3. Atendiendo a la imposibilidad de obtención de mutantes dobles en los genes *omp10* y *omp19*, la ausencia simultánea de las lipoproteínas de membrana externa Omp10 y Omp19 impide la supervivencia de *B. ovis* PA en las condiciones empleadas. Los resultados obtenidos con las proteínas mayoritarias de membrana externa Omp25 y Omp31 permiten establecer una conclusión similar.
4. Atendiendo a la modificación del perfil de reactividad con anticuerpos monoclonales, la ausencia en *B. ovis* PA tanto del gen *omp19* como del gen *omp31* afecta a la topología de la membrana externa, al menos en lo referente a las proteínas BP26 y Omp25, respectivamente.
5. La ausencia del gen *omp31* provoca una mayor internalización de *B. ovis* PA en células epiteliales HeLa.
6. Las proteínas mayoritarias de membrana externa Omp25 y Omp25c no están implicadas ni de manera individual ni conjuntamente en la virulencia de *B. ovis* PA en modelo murino. Sin embargo, la ausencia simultánea de los genes que las codifican produce graves defectos en la penetración bacteriana en células epiteliales HeLa.
7. La atenuación en modelo murino que presentan las cepas mutantes  $\Delta omp31\Delta cgs$ ,  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  y  $\Delta omp10\Delta omp31\Delta omp25c$  de *B. ovis* PA se acompaña de importantes alteraciones en las propiedades de la membrana externa y la supervivencia bacteriana en el interior de macrófagos J774A.1 y células epiteliales HeLa, que podrían explicar, al menos en parte, su atenuación.
8. La protección frente a una infección experimental por *B. ovis* PA conferida en ratón por la vacunación con el mutante atenuado  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$ , incluso superior a la conferida por la vacuna heteróloga de referencia *B. melitensis* Rev1, se acompaña de una respuesta inmune de naturaleza humoral temprana y persistente y una respuesta celular mediada principalmente por  $IFN\gamma$  y  $TNF\alpha$ , citocinas relacionadas con la activación de una inmunidad protectora.
9. Considerando la respuesta inmune inducida y la protección conferida en modelo murino, junto con el interés del marcaje diferencial de la cepa vacunal, el mutante atenuado  $\Delta omp10\Delta ugpB\Delta omp31$  de *B. ovis* PA constituye un interesante candidato a evaluar en carneros como vacuna homóloga específica frente a la epididimitis contagiosa ocasionada por *B. ovis*.



## **Conclusions**



Considering the results obtained in this work, the following main conclusions can be established:

1. The genes *bepC* and *ugpB* are not essential for the virulence of *B. ovis* PA in the murine model and are not related with the survival of bacteria within macrophages J774A.1 and HeLa epithelial cells or with the outer membrane properties that were studied.
2. The results obtained with the  $\Delta$ *bepC* and  $\Delta$ *ugpB* mutants of *B. ovis* PA, that differ from previous descriptions of *Brucella* smooth strains, evidence the existing differences between species of the genus *Brucella* despite their high genetic similarity.
3. Considering the impossibility of obtaining double mutants in genes *omp10* and *omp19*, the simultaneous absence of the outer membrane lipoproteins Omp10 and Omp19 hampers the survival of *B. ovis* PA under the conditions assayed. The results obtained with the major outer membrane proteins Omp25 and Omp31 allow a similar conclusion to be established.
4. Considering the modification of the pattern of reactivity with monoclonal antibodies, the absence of the gene *omp19* as well as the gene *omp31* in *B. ovis* affects the topology of the outer membrane at least regarding to the proteins BP26 and Omp25, respectively.
5. The absence of the gene *omp31* provokes a greater internalization of *B. ovis* PA in HeLa epithelial cells.
6. The major outer membrane proteins Omp25 and Omp25c are not involved neither individually nor together in the virulence of *B. ovis* PA in the mouse model. However, the simultaneous absence of their encoding genes produces serious defects in the bacterial penetration in HeLa epithelial cells.
7. The attenuation of the *B. ovis* PA  $\Delta$ *omp31* $\Delta$ *cgs*,  $\Delta$ *omp10* $\Delta$ *ugpB* $\Delta$ *omp31* and  $\Delta$ *omp10* $\Delta$ *omp31* $\Delta$ *omp25c* mutants is accompanied with important alterations in the outer membrane properties and the survival of bacteria within J774A.1 macrophages and HeLa epithelial cells that could explain, at least partially, their attenuation.
8. The protection against challenge infection with *B. ovis* PA conferred by vaccination with the  $\Delta$ *omp10* $\Delta$ *ugpB* $\Delta$ *omp31* attenuated mutant, stronger than that conferred by the heterologous reference vaccine *B. melitensis* Rev1, is accompanied by an early and persistent humoral immune response and a cellular response mainly mediated by IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ , cytokines related with the activation of a protective immune response.
9. Considering the immune response induced and the protection conferred in the mouse model, together with the interest of a differential marker in the vaccine strain, the *B. ovis* PA  $\Delta$ *omp10* $\Delta$ *ugpB* $\Delta$ *omp31* attenuated mutant constitutes an interesting candidate to be evaluated as a specific homologous vaccine against contagious epididymitis caused in rams by *B. ovis*.



## **Bibliografía**



- Adams, L.G. (1990).** Vaccination against brucellosis. *Advances in brucellosis research*. Editado por L.G. Adams. Texas University Press, College Station. USA.
- Ahmed, W., Zheng, K. & Liu, Z.F. (2016).** Establishment of chronic infection: *Brucella's* stealth strategy. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, **6**, 1–12.
- Allen, C.A., Adams, L.G. & Ficht, T.A. (1998).** Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. *Infection and immunity*, **66**, 1008–1016.
- Alonso-Urmeneta, B., Marín, C., Aragón, V., Blasco, J.M., Díaz, R. & Moriyón, I. (1998).** Evaluation of lipopolysaccharides and polysaccharides of different epitopic structures in the indirect enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of brucellosis in small ruminants and cattle. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, **5**, 749–754.
- Alton, G., Jones, L., Angus, R. & Verger, J. (1998).** Techniques for the brucellosis laboratory. INRA. Paris, France.
- Anderson, E.S., Paulley, J.T., Gaines, J.M., Valderas, M.W., Martin, D.W., Menscher, E., Brown, T.D., Burns, C.S. & Roop, R.M. (2009).** The manganese transporter MntH is a critical virulence determinant for *Brucella abortus* 2308 in experimentally infected mice. *Infection and immunity*, **77**, 3466–74.
- Anderson, E.S., Paulley, J.T., Martinson, D.A., Gaines, J.M., Steele, K.H. & Roop, R.M. (2011).** The iron-responsive regulator irr is required for wild-type expression of the gene encoding the heme transporter BhuA in *Brucella abortus* 2308. *Journal of bacteriology*, **193**, 5359–64.
- Aono, R., Tsukagoshi, N. & Yamamoto, M. (1998).** Involvement of outer membrane protein TolC, a possible member of the mar-sox regulon, in maintenance and improvement of organic solvent tolerance of *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, **180**, 938–44.
- Aragón, V., Díaz, R., Moreno, E. & Moriyón, I. (1996).** Characterization of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* native haptens as outer membrane O-type polysaccharides independent from the smooth lipopolysaccharide. *Journal of bacteriology*, **178**, 1070–1069.
- Archambaud, C., Salcedo, S.P., Lelouard, H., Devillard, E., de Bovis, B., Van Rooijen, N., Gorvel, J.-P. & Malissen, B. (2010).** Contrasting roles of macrophages and dendritic cells in controlling initial pulmonary *Brucella* infection. *European journal of immunology*, **40**, 3458–3471.
- Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., Briones, G., Ciocchini, A.E., Ugalde, R., Moreno, E., Moriyón, I. & Gorvel, J.-P. (2005).** Cyclic  $\beta$ -1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nature Immunology*, **6**, 618–625.
- Arenas-Gamboa, A., Rice-Ficht, A., Kahl-McDonagh, M. & Ficht, T. (2011).** Protective efficacy and safety of *Brucella melitensis* 16M $\Delta$ mutC against intraperitoneal and aerosol challenge in BALB/c mice. *Infection and immunity*, **79**, 3653–3658.
- Arenas-Gamboa, A.M., Ficht, T.A., Kahl-McDonagh, M.M. & Rice-Ficht, A.C. (2008).** Immunization with a single dose of a microencapsulated *Brucella melitensis* mutant enhances protection against wild-type challenge. *Infection and immunity*, **76**, 2448–55.
- Aridor, M., Fish, K.N., Bannykh, S., Weissman, J., Roberts, T.H., Lippincott-Schwartz, J. & Balch, W.E. (2001).** The Sar1 GTPase coordinates biosynthetic cargo selection with endoplasmic reticulum export site assembly. *The Journal of cell biology*, **152**, 213–29.
- Audic, S., Lescot, M., Claverie, J.-M., Cloeckert, A. & Zygmunt, M. (2011).** The genome sequence of *Brucella pinnipedialis* B2/94 sheds light on the evolutionary history of the genus *Brucella*. *BMC evolutionary biology*, **11**, 200.
- Ávila-Calderón, E., López-Merino, A., Sriranganathan, N., Boyle, S. & Contreras-Rodríguez, A. (2013).** A history of the development of *Brucella* vaccines. *BioMed research international*, 743509.
- Baldwin, C.L. & Goenka, R. (2006).** Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? *Critical reviews in immunology*, **26**, 407–42.
- Baldwin, C.L. & Parent, M. (2002).** Fundamentals of host immune response against *Brucella abortus*: what the mouse model has revealed about control of infection. *Veterinary Microbiology*, **90**, 367–382.
- Banai, M. (2002).** Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine: laboratory aspects and field observations. *Veterinary microbiology*, **90**, 497–519.
- Bandara, A.B., Contreras, A., Contreras-Rodríguez, A., Martins, A.M., Dobrea, V., Poff-Reichow, S., Rajasekaran, P., Sriranganathan, N., Schurig, G.G. & Boyle, S.M. (2007).** *Brucella suis* urease encoded by *ure1* but not *ure2* is necessary for intestinal infection of BALB/c mice. *BMC microbiology*, **7**, 57.
- Barbier, T., Collard, F., Zúñiga-Ripa, A., Moriyón, I., Godard, T., Becker, J., Wittmann, C., Schaftingen, E. & Letesson, J.J. (2014).** Erythritol feeds the pentose phosphate pathway via three new isomerases leading to D-erythrose-4-phosphate in *Brucella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**, 17815–17820.

- Barbier, T., Nicolas, C. & Letesson, J.J. (2011).** *Brucella* adaptation and survival at the crossroad of metabolism and virulence. *FEBS Letters*, **585**, 2929–2934.
- Barkha, S., Kumar, S. & Kumar, S. (2011).** Immunochemical characterization of antigens of *Brucella canis* and their use in seroprevalence study of canine brucellosis. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, **4**, 857–861.
- Barquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., Weiss, D., Guzmán-Verri, C., Chacón-Díaz, C., Alex, Rucavado, A., Rucavado, R., Moriyón, I. & 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-Ávarez, 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. & 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.
- Barquero-Calvo, E., Martirosyan, A., Ordóñez-Rueda, D., Arce-Gorvel, V., Alfaro-Alarcón, A., Lepidi, H., Malissen, B., Malissen, M., Gorvel, J.P., Moreno, E., Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Zhang, X., Majlessi, L., Deriaud, E., Leclerc, C., Lo-Man, R., et al (2013).** Neutrophils exert a suppressive effect on Th1 responses to intracellular pathogen *Brucella abortus*. *PLoS Pathogens*, **9**, e1003167.
- Barrio, M.B., Grilló, M.J., Muñoz, P.M., Jacques, I., González, D., de Miguel, M.J., Marín, C.M., Barberán, M., Letesson, J.J., Gorvel, J.P., Moriyón, I., Blasco, J.M. & Zygmunt, M.S. (2009).** Rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export induce antibodies reacting in an indirect ELISA with smooth lipopolysaccharide and are less effective than Rev 1 vaccine against *Brucella melitensis* infection of sheep. *Vaccine*, **27**, 1741–1749.
- de Barsy, M., Jamet, A., Filopon, D., Nicolas, C., Laloux, G., Rual, J.F., Muller, A., Twizere, J.-C., Nkengfac, B., Vandenhoute, J., Hill, D.E., Salcedo, S.P., Gorvel, J.P., Letesson, J.J. & De Bolle, X. (2011).** Identification of a *Brucella spp.* secreted effector specifically interacting with human small GTPase Rab2. *Cellular microbiology*, **13**, 1044–58.
- de Barsy, M., Mirabella, A., Letesson, J.J. & De Bolle, X. (2012).** A *Brucella abortus* *cstA* mutant is defective for association with endoplasmic reticulum exit sites and displays altered trafficking in HeLa cells. *Microbiology (Reading, England)*, **158**, 2610–8.
- Baucheron, S., Mouline, C., Praud, K., Chaslus-Dancla, E. & Cloeckaert, A. (2005).** TolC but not AcrB is essential for multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium colonization of chicks. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **55**, 707–712.
- Baucheron, S., Nishino, K., Monchaux, I., Canepa, S., Maurel, M.-C., Coste, F., Roussel, A., Cloeckaert, A. & Giraud, E. (2014).** Bile-mediated activation of the *acrAB* and *tolC* multidrug efflux genes occurs mainly through transcriptional derepression of *ramA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, **69**, 2400–2406.
- Betts, M., Beining, P., Brunswick, M., Inman, J., Angus, R.D., Hoffman, T. & Golding, B. (1993).** Lipopolysaccharide from *Brucella abortus* behaves as a T-cell-independent type 1 carrier in murine antigen-specific antibody responses. *Infection and immunity*, **61**, 1722–9.
- De Biase, D. & Pennacchietti, E. (2012).** Glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in orally acquired bacteria: function, distribution and biomedical implications of the *gadBC* operon. *Molecular Microbiology*, **86**, 770–786.
- Billard, E., Dornand, J. & Gross, A. (2007).** *Brucella suis* prevents human dendritic cell maturation and antigen presentation through regulation of Tumor Necrosis Factor Alpha secretion. *Infection and Immunity*, **75**, 4980–4989.
- Bina, J.E. & Mekalanos, J.J. (2001).** *Vibrio cholerae* *tolC* is required for bile resistance and colonization. *Infection and immunity*, **69**, 4681–5.
- Biswas, S.K. & Mantovani, A. (2012).** Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell Metabolism*, **15**, 432–437.
- Blasco, J. (1990).** *Brucella ovis*. Animal brucellosis. Editado por K.H. Nielsen & J.R. Duncan CRC PRes. Boca Ratón, Florida. USA. , 351–378.
- Blasco, J.M. (1997).** A review of the use of *B. melitensis* Rev1 vaccine in adult sheep and goats. *Preventive veterinary medicine*, **31**, 275–283.
- Blasco, J.M. & Díaz, R. (1993).** *Brucella melitensis* Rev1 vaccine as a cause of human brucellosis. *Lancet (London, England)*, **342**, 805.
- Blasco, J.M., Gamazo, C., Winter, A., Bagüés, M., Marín, C., Barberán, M., Moriyón, I., Alonso-Urmeneta, B. & Díaz, R. (1993).** Evaluation of whole cell and subcellular vaccines against *Brucella ovis* in rams. *Veterinary immunology and immunopathology*, **37**, 257–270.
- Blasco, J.M., Marín, C.M., Barberán, M., Moriyón, I. & Díaz, R. (1987).** Immunization with *Brucella melitensis* Rev1 against *Brucella ovis* infection of rams. *Veterinary microbiology*, **14**, 381–92.

- Blasco, J.M. & Molina-Flores, B. (2011).** Control and eradication of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, **27**, 95–104.
- Blasco, J.M., Moreno, E. & Moriyón, I. (2015).** Brucellosis vaccines and vaccine candidates. *Veterinary Vaccines for Developing Countries*. Editado por Metwally, S. & Viljoen, G. J. & El Idrissi, A. FAO. Rome.
- Bohin, J.P. (2000).** Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. *FEMS microbiology letters*, **186**, 11–9.
- Boigegrain, R.A., Salhi, I., Álvarez-Martínez, M.T., Machold, J., Fedon, Y., Arpagaus, M., Weise, C., Rittig, M. & Rouot, B. (2004).** Release of periplasmic proteins of *Brucella suis* upon acidic shock involves the outer membrane protein Omp25. *Infection and immunity*, **72**, 5693–703.
- Bonazzi, M. & Cossart, P. (2011).** Impenetrable barriers or entry portals? The role of cell-cell adhesion during infection. *The Journal of cell biology*, **195**, 349–358.
- Boschioli, M.L., Ouahrani-Bettache, S., Foulongne, V., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Allardet-Servent, A., Cazevielle, C., Liautard, J.P., Ramuz, M. & O'Callaghan, D. (2002).** The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 1544–1549.
- Bosseray, N. (1991).** *Brucella melitensis* Rev. 1 living attenuated vaccine: stability of markers, residual virulence and immunogenicity in mice. *Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization*, **19**, 355–363.
- Bosseray, N. (1992).** Control methods and thresholds of acceptability for antibrucella vaccines. *Developments in biological standardization*, **79**, 121–8.
- Bosseray, N., Plommet, M. & De Rycke, J. (1982).** Development of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis* infection in mice to a chronic stage and cure. *Annales de recherches vétérinaires. Annals of veterinary research*, **13**, 153–61.
- Bowden, R.A., Cloeckaert, A., Zygmunt, M.S. & Dubray, G. (1995a).** Outer-membrane protein- and rough lipopolysaccharide-specific monoclonal antibodies protect mice against *Brucella ovis*. *Journal of medical microbiology*, **43**, 344–7.
- Bowden, R., Cloeckaert, A., Zygmunt, M., Bernard, S. & Dubray, G. (1995b).** Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infection and immunity*, **63**, 3945–3952.
- Bowden, R., Estein, S., Zygmunt, M., Dubray, G. & Cloeckaert, A. (2000).** Identification of protective outer membrane antigens of *Brucella ovis* by passive immunization of mice with monoclonal antibodies. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, **2**, 481–488.
- Briones, G., Iñón de Iannino, N., Roset, M., Vigliocco, A., Paulo, P.S. & 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. *Infection and immunity*, **69**, 4528–35.
- Briones, G., Iñón de Iannino, N., Steinberg, M. & Ugalde, R.A. (1997).** Periplasmic cyclic 1,2-beta-glucan in *Brucella* spp. is not osmoregulated. *Microbiology (Reading, England)*, 1115–24.
- Brumell, J.H. (2012).** *Brucella* ‘hitches a ride’ with autophagy. *Cell Host & Microbe*, **11**, 2–4.
- Buddle, M.B. (1956).** Studies on *Brucella ovis* (n.sp.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. *The Journal of hygiene*, **54**, 351–364.
- Bukata, L., Altabe, S., de Mendoza, D., Ugalde, R.A. & Comerci, D.J. (2008).** Phosphatidylethanolamine synthesis is required for optimal virulence of *Brucella abortus*. *Journal of bacteriology*, **190**, 8197–203.
- Bulgin, M.S. (1990).** Epididymitis in rams and lambs. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, **6**, 683–90.
- Bundle, D.R., Gidney, M.A., Perry, M.B., Duncan, J.R. & Cherwonogrodzky, J.W. (1984).** Serological confirmation of *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9 O-antigens by monoclonal antibodies. *Infection and immunity*, **46**, 389–393.
- Burgess, G. (1982).** Ovine contagious epididymitis: a review. *Veterinary microbiology*, **7**, 551–575.
- Campos, E., Cravero, S.L., Delgui, L., Mora, I., Kahn, N., Arese, A.I. & Rossetti, O.L. (2002).** *Brucella abortus* INTA2, a novel strain 19  $\Delta$ bp26::luc  $\Delta$ bmp18 double mutant lacking drug resistance markers. *Veterinary Microbiology*, **87**, 1–13.
- Campos, M.A., Rosinha, G.M.S., Almeida, I.C., Salgueiro, X.S., Jarvis, B.W., Splitter, G.A., Qureshi, N., Bruna-Romero, O., Gazzinelli, R.T. & Oliveira, S.C. (2004).** Role of Toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice. *Infection and immunity*, **72**, 176–86.
- Carmichael, L.E. & Bruner, D.W. (1968).** Characteristics of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. *The Cornell veterinarian*, **48**, 579–592.

- Caro-Hernández, P., Fernández-Lago, L., de Miguel, M.J., Martín-Martín, A., Cloeckert, A., Grilló, M.J. & Vizcaíno, N. (2007). Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*. *Infection and immunity*, **75**, 4050–4061.
- Carpenter, T.E., Berry, S.L. & Glenn, J.S. (1987). Economics of *Brucella ovis* control in sheep: epidemiologic simulation model. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **190**, 977–82.
- Carroll, J.A., Coleman, S.A., Smitherman, L.S. & Minnick, M.F. (2000). Hemin-binding surface protein from *Bartonella quintana*. *Infection and immunity*, **68**, 6750–7.
- Carvalho Neta, A. V., Stynen, A.P.R., Paixão, T.A., Miranda, K.L., Silva, F.L., Roux, C.M., Tsolis, R.M., Everts, R.E., Lewin, H.A., Adams, L.G., Carvalho, A.F., Lage, A.P. & Santos, R.L. (2008). Modulation of the bovine trophoblastic innate immune response by *Brucella abortus*. *Infection and immunity*, **76**, 1897–907.
- Casadevall, A. (2003). Antibody-mediated immunity against intracellular pathogens: two-dimensional thinking comes full circle. *Infection and immunity*, **71**, 4225–8.
- Casadevall, A. & Pirofski, L. (2006). A reappraisal of humoral immunity based on mechanisms of antibody-mediated protection against intracellular pathogens. *Advances in immunology*, **91**, 1–44.
- 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. *Infection and immunity*, **73**, 8079–88.
- 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. & Goldbaum, F.A. (2007a). 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 Rev1 vaccination. *Vaccine*, **25**, 4437–4446.
- 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. & Goldbaum, F.A. (2007b). 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.
- Castanie-Cornet, M.P., Penfound, T.A., Smith, D., Elliott, J.F. & Foster, J.W. (1999). Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, **181**, 3525–35.
- Castañeda-Roldán, E., Ouahrani-Bettache, S., Saldaña, Z., Avelino, F., Rendón, M., Dornand, J. & Girón, J. (2006). Characterization of SP41, a surface protein of *Brucella* associated with adherence and invasion of host epithelial cells. *Cellular microbiology*, **8**, 1877–1887.
- Castañeda-Roldán, E.I., Avelino-Flores, F., Dall’Agnol, M., Freer, E., Cedillo, L., Dornand, J. & Girón, J.A. (2004). Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. *Cellular microbiology*, **6**, 435–445.
- Castaño, M.J. & Solera, J. (2009). Chronic brucellosis and persistence of *Brucella melitensis* DNA. *Journal of clinical microbiology*, **47**, 2084–2089.
- Celli, J. (2006). Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. *Research in microbiology*, **157**, 93–98.
- Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D.M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. & Gorvel, J.P. (2003). *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *The Journal of Experimental Medicine*, **198**, 545–556.
- Celli, J., Salcedo, S.P. & Gorvel, J.P. (2005). *Brucella* coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 1673–8.
- Celli, J. & Tsolis, R.M. (2015). Bacteria, the endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: friends or foes? *Nature Reviews Microbiology*, **13**, 71–82.
- Cellier, M.F., Courville, P. & Campion, C. (2007). Nramp1 phagocyte intracellular metal withdrawal defense. *Microbes and Infection*, **9**, 1662–1670.
- Cha, S.B., Rayamajhi, N., Kang, M.L., Lee, W.J., Shin, M.K. & Yoo, H.S. (2010). Comparative study of gamma interferon production in mice immunized with outer membrane proteins and whole bacteria of *Brucella abortus*. *Japanese journal of infectious diseases*, **63**, 49–51.
- Chain, P.S.G., Comerci, D.J., Tolmasky, M.E., Larimer, F.W., Malfatti, S.A., Vergez, L.M., Agüero, F., Land, M.L., Ugalde, R.A. & Garcia, E. (2005). Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*. *Infection and immunity*, **73**, 8353–83561.

- Chain, P.S.G., Lang, D.M., Comerci, D.J., Malfatti, S.A., Vergez, L.M., Shin, M., Ugalde, R.A., Garcia, E. & Tolmasky, M.E. (2011). Genome of *Ochrobactrum anthropi* ATCC 49188T, a versatile opportunistic pathogen and symbiont of several eukaryotic hosts. *Journal of Bacteriology*, **193**, 4274–4275.
- Chandran, V. (2013). Type IV secretion machinery: molecular architecture and function. *Biochemical Society Transactions*, **41**, 17–28.
- Chaves-Olarte, E., Guzmán-Verri, C., Méresse, S., Desjardins, M., Pizarro-Cerdá, J., Badilla, J., Gorvel, J.P. & Moreno, E. (2002). Activation of Rho and Rab GTPases dissociates *Brucella abortus* internalization from intracellular trafficking. *Cellular Microbiology*, **4**, 663–676.
- Cheers, C. & Ho, M. (1983). Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection. IV. Functional specificity in natural resistance to facultative intracellular bacteria. *Journal of the Reticuloendothelial Society*, **34**, 299–309.
- Chen, R. & Henning, U. (1987). Nucleotide sequence of the gene for the peptidoglycan-associated lipoprotein of *Escherichia coli* K12. *European journal of biochemistry*, **163**, 73–7.
- Cherwonogrodzky, J.W., Perry, M.B. & Bundle, D.R. (1987). Identification of the A and M antigens of *Brucella* as the O-polysaccharides of smooth lipopolysaccharides. *Canadian journal of microbiology*, **33**, 979–81.
- Christie, P.J. & Cascales, E. (2005). Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems (review). *Molecular membrane biology*, **22**, 51–61.
- Clausse, M., Díaz, A.G., Ibáñez, A.E., Cassataro, J., Giambartolomei, G.H. & Estein, S.M. (2014). Evaluation of the efficacy of outer membrane protein 31 vaccine formulations for protection against *Brucella canis* in BALB/c mice. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, **21**, 1689–94.
- Cloekaert, A., Baucheron, S., Vizcaíno, N. & Zygmunt, M. (2001a). Use of recombinant BP26 protein in serological diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, **8**, 772–775.
- Cloekaert, A., Grayon, M. & Grépinet, O. (2002a). Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev1 by PCR-RFLP based on a mutation in the *rpsL* gene. *Vaccine*, **20**, 2546–2550.
- Cloekaert, A., Jacques, I., Bosseray, N., Limet, J., Bowden, R., Dubray, G. & Plommet, M. (1991). Protection conferred on mice by monoclonal antibodies directed against outer-membrane-protein antigens of *Brucella*. *Journal of medical microbiology*, **34**, 175–180.
- Cloekaert, A., Jacques, I., Bowden, R.A., Dubray, G. & Limet, J.N. (1993). Monoclonal antibodies to *Brucella* rough lipopolysaccharide: characterization and evaluation of their protective effect against *B. abortus*. *Research in microbiology*, **144**, 475–484.
- Cloekaert, A., Jacques, I., Grilló, M., Marín, C., Grayon, M., Blasco, J.M. & 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.
- Cloekaert, A., Tibor, A. & Zygmunt, M. (1999). *Brucella* outer membrane lipoproteins share antigenic determinants with bacteria of the family *Rhizobiaceae*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, **6**, 627–629.
- Cloekaert, A., Verger, J., Grayon, M., Zygmunt, M. & Grépinet, O. (1996). 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. *Infection and immunity*, **64**, 2047–2055.
- Cloekaert, A., Verger, J.M., Grayon, M., Paquet, J.Y., Garin-Bastuji, B., Foster, G. & Godfroid, J. (2001b). Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, **3**, 729–738.
- Cloekaert, A. & Vizcaíno, N. (2005). DNA polymorphism and taxonomy of *Brucella* species. *Brucella: Molecular and Cellular biology and Genomics*. Editado por López-Goñi, I. & Moriyón, I. Horizon Bioscience. Norfolk, UK. , 1–23.
- Cloekaert, A., Vizcaíno, N., Paquet, J.Y., Bowden, R. & Elzer, P. (2002b). Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Veterinary microbiology*, **90**, 229–247.
- Cloekaert, A., Wergifosse, P., Dubray, G. & Limet, J. (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. *Infection and immunity*, **58**, 3980–3987.
- Cloekaert, A., Zygmunt, M., Wergifosse, P., Dubray, G. & Limet, J. (1992). Demonstration of peptidoglycan-associated *Brucella* outer-membrane proteins by use of monoclonal antibodies. *Journal of general microbiology*, **138**, 1543–1550.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **69**, 2110–4.
- Comerci, D.J., Martínez-Lorenzo, M.J., Seira, R., Gorvel, J.P. & Ugalde, R.A. (2001). Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cellular Microbiology*, **3**, 159–168.

- Conde-Álvarez, R., Arce-Gorvel, V., Gil-Ramírez, Y., Iriarte, M., Grilló, M.J., Gorvel, J.P. & Moriyón, I. (2013). Lipopolysaccharide as a target for brucellosis vaccine design. *Microbial Pathogenesis*, **58**, 29–34.
- Conde-Álvarez, R., Arce-Gorvel, V., Iriarte, M., Manček-Keber, M., Barquero-Calvo, E., Palacios-Chaves, L., Chacón-Díaz, C., Chaves-Olarte, E., Martirosyan, A., von Bargen, K., Grilló, M.J., Jerala, R., Brandenburg, K., Llobet, E., Bengochea, J.A., Moreno, E., Moriyón, I. & Gorvel, J.P. (2012). The lipopolysaccharide core of *Brucella abortus* acts as a shield against innate immunity recognition. *PLoS pathogens*, **8**, e1002675.
- Conde-Álvarez, R., Grilló, M.J., Salcedo, S.P., de Miguel, M.J., Fugier, E., Gorvel, J.P., Moriyón, I. & Iriarte, M. (2006). Synthesis of phosphatidylcholine, a typical eukaryotic phospholipid, is necessary for full virulence of the intracellular bacterial parasite *Brucella abortus*. *Cellular microbiology*, **8**, 1322–1335.
- Connolly, J.P., Commerci, 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**, 3767–80.
- Copin, R., De Baetselier, P., Carlier, Y., Letesson, J.J. & Muraille, E. (2007). MyD88-dependent activation of B220-CD11b+LY-6C+ dendritic cells during *Brucella melitensis* infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **178**, 5182–91.
- Copin, R., Vitry, M.A., Hanot Mambres, D., Machelart, A., De Trez, C., Vanderwinden, J.M., Magez, S., Akira, S., Ryffel, B., Carlier, Y., Letesson, J.J. & Muraille, E. (2012). In situ microscopy analysis reveals local innate immune response developed around *Brucella* infected cells in resistant and susceptible mice. *PLoS pathogens*, **8**, e1002575.
- Corbeil, L.B., Blau, K., Inzana, T.J., Nielsen, K.H., Jacobson, R.H., Corbeil, R.R. & Winter, A.J. (1988). Killing of *Brucella abortus* by bovine serum. *Infection and immunity*, **56**, 3251–61.
- Corbel, M.J. (1990). *Brucella*. Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunology. London, England, 339–353.
- Corbel, M.J. & Brinley-Morgan, W. (1984). Genus *Brucella*, Meyer and Shaw 1920, 173 AL. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.
- Coria, L.M., Ibañez, A.E., Pasquevich, K.A., Cobiello, P.L.G., Frank, F.M., Giambartolomei, G.H. & Cassataro, J. (2016a). *Brucella abortus* Omp19 recombinant protein subcutaneously co-delivered with an antigen enhances antigen-specific T helper 1 memory responses and induces protection against parasite challenge. *Vaccine*, **34**, 430–7.
- Coria, L.M., Ibañez, A.E., Tkach, M., Sabbione, F., Bruno, L., Carabajal, M. V, Berguer, P.M., Barrionuevo, P., Schillaci, R., Trevani, A.S., Giambartolomei, G.H., Pasquevich, K.A. & Cassataro, J. (2016b). A *Brucella* spp. protease inhibitor limits antigen lysosomal proteolysis, increases cross-presentation, and enhances CD8+ T Cell responses. *Journal of immunology*, **196**, 4014–4029.
- Corsetti, P.P., de Almeida, L.A., Carvalho, N.B., Azevedo, V., Silva, T.M.A., Teixeira, H.C., Faria, A.C. & Oliveira, S.C. (2013). Lack of endogenous IL-10 enhances production of proinflammatory cytokines and leads to *Brucella abortus* clearance in mice. *PLoS one*, **8**, e74729.
- Cosivi, O. & Corbel, M.J. (1998). WHO consultation on the development of new/improved brucellosis vaccines. 17 December 1997, Geneva, Switzerland. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*, **26**, 361–3.
- Cossart, P., Pizarro-Cerdà, J. & Lecuit, M. (2005). Microbial Pathogens: an Overview. Cellular Microbiology, Second Edition. American Society of Microbiology. *Cellular Microbiology, Second Edition*, 1–34.
- Da Costa Martins, R., Irache, J.M., Blasco, J.M., Muñoz, M.P., Marín, C.M., Jesús Grilló, M., Jesús De Miguel, M., Barberán, M. & Gamazo, C. (2010). Evaluation of particulate acellular vaccines against *Brucella ovis* infection in rams. *Vaccine*, **28**, 3038–46.
- Cui, G., Wei, P., Zhao, Y., Guan, Z., Yang, L., Sun, W., Wang, S. & Peng, Q. (2014). *Brucella* infection inhibits macrophages apoptosis via Nedd4-dependent degradation of calpain2. *Veterinary Microbiology*, **174**, 195–205.
- Czibener, C., Del Giudice, M.G., Spera, J.M., Fulgenzi, F.R. & Ugalde, J.E. (2016). Delta-pgm, a new live-attenuated vaccine against *Brucella suis*. *Vaccine*, **34**, 1524–1530.
- Czibener, C., Merwaiss, F., Guaimas, F., Del Giudice, M.G., Serantes, D.A.R., Spera, J.M. & Ugalde, J.E. (2015). BigA is a novel adhesin of *Brucella* that mediates adhesion to epithelial cells. *Cellular microbiology*, **18**, 500–13.
- 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**, 3862–70.
- Damiano, M., Damiano, R., Bastianelli, D., Dahouk, S., Köhler, S., Cloeckert, A., Biase, D., Occhialini, A., Aless & Occhialini, R. (2015). Glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in *Brucella* spp.: distribution and contribution to fitness under extremely acidic conditions. *Applied and environmental microbiology*, **81**, 578–586.

- 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. & Whatmore, A.M. (2008). Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. *Journal of clinical microbiology*, **46**, 43–49.
- Degos, C., Gagnaire, A., Banchereau, R., Moriyón, I. & Gorvel, J.-P. (2015). *Brucella* C $\beta$ G induces a dual pro- and anti-inflammatory response leading to a transient neutrophil recruitment. *Virulence*, **6**, 19–28.
- Delpino, M.V., Cassataro, J., Fossati, C.A., Goldbaum, F.A. & Baldi, P.C. (2006). *Brucella* outer membrane protein Omp31 is a haemin-binding protein. *Microbes and Infection*, **8**, 1203–1208.
- Delrue, R.-M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrade, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Gorvel, J.-P. & Letesson, J.-J. (2001). Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cellular Microbiology*, **3**, 487–497.
- DelVecchio, V.G., Kapatral, V., Elzer, P., Patra, G. & Mújer, C. V (2002). The genome of *Brucella melitensis*. *Veterinary Microbiology*, **90**, 587–592.
- Dentinger, C.M., Jacob, K., Lee, L. V, Mendez, H.A., Chotikanatis, K., McDonough, P.L., Chico, D.M., De, B.K., Tiller, R. V, Traxler, R.M., Campagnolo, E.R., Schmitt, D., Guerra, M.A. & Slavinski, S.A. (2015). Human *Brucella canis* infection and subsequent laboratory exposures associated with a puppy, New York City, 2012. *Zoonoses and public health*, **62**, 407–414.
- Dermine, J.-F., Duclos, S., Garin, J., St-Louis, F., Rea, S., Parton, R.G. & Desjardins, M. (2001). Flotillin-1-enriched Lipid Raft Domains Accumulate on Maturing Phagosomes. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 18507–18512.
- Dijun, Wang, Z., James, N., Voss, J., Klimont, E., Ohene-Agyei, T., Venter, H., Chiu, W. & Luisi, F. (2014). Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature*, **509**, 512–515.
- Donnenberg, M.S. & Kaper, J.B. (1991). Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infection and immunity*, **59**, 4310–7.
- Douglas, J.T. & Palmer, D.A. (1988). Use of monoclonal antibodies to identify the distribution of A and M epitopes on smooth *Brucella* species. *Journal of clinical microbiology*, **26**, 1353–6.
- Dozot, M., Boigegrain, R.-A., Delrue, R.-M., Hallez, R., Ouahrani-Bettache, S., Danese, I., Letesson, J.-J., De Bolle, X. & 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. *Cellular Microbiology*, **8**, 1791–1802.
- Dubray, G. & Bézard, G. (1980). Isolation of three *Brucella abortus* cell-wall antigens protective in murine experimental brucellosis. *Annales de recherches vétérinaires. Annals of veterinary research*, **11**, 367–73.
- Dubray, G. & Charriaut, C. (1983). Evidence of three major polypeptide species and two major polysaccharide species in the *Brucella* outer membrane. *Annales de recherches vétérinaires. Annals of veterinary research*, **14**, 311–318.
- Dubray, G. & Limet, J. (1987). Evidence of heterogeneity of lipopolysaccharides among *Brucella* biovars in relation to A and M specificities. *Annales de l'Institut Pasteur. Microbiology*, **138**, 27–37.
- Dubuisson, J.-F., Vianney, A., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. & Lazzaroni, J.C. (2005). Tol-Pal proteins are critical cell envelope components of *Erwinia chrysanthemi* affecting cell morphology and virulence. *Microbiology (Reading, England)*, **151**, 3337–47.
- Durward, M., Radhakrishnan, G., Harms, J., Bareiss, C., Magnani, D., Splitter, G.A., Mantur, B., Amarnath, S., Shinde, R., Montaraz, J., Winter, A., Ko, J., Splitter, G., Commander, N., Brewer, J., Wren, B., Spencer, S., Macmillan, A., Martirosyan, A., Moreno, E., et al (2012). Active Evasion of CTL Mediated Killing and Low Quality Responding CD8+ T Cells Contribute to Persistence of Brucellosis. *PLoS ONE*, **7**, e34925.
- Edmonds, M.D., Cloeckaert, A., Booth, N.J., Fulton, W.T., Hagius, S.D., Walker, J. V & Elzer, P.H. (2001). Attenuation of a *Brucella abortus* mutant lacking a major 25 kDa outer membrane protein in cattle. *American journal of veterinary research*, **62**, 1461–6.
- Edmonds, M.D., Cloeckaert, A. & 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*. *Veterinary Microbiology*, **88**, 205–221.
- Edmonds, M.D., Cloeckaert, A., Hagius, S.D., Samartino, L.E., Fulton, W.T., Walker, J.V., Enright, F.M., Booth, N.J. & Elzer, P.H. (2002b). Pathogenicity and protective activity in pregnant goats of a *Brucella melitensis*  $\Delta$ omp25 deletion mutant. *Research in Veterinary Science*, **72**, 235–239.
- Eisenberg, T., Hamann, H.-P., Kaim, U., Schlez, K., Seeger, H., Schauerte, N., Melzer, F., Tomaso, H., Scholz, H.C., Koylass, M.S., Whatmore, A.M. & Zschöck, M. (2012). Isolation of potentially novel *Brucella* spp from frogs. *Applied and environmental microbiology*, **78**, 3753–3755.
- Eisenschenk, F.C., Houle, J.J. & Hoffmann, E.M. (1999). Mechanism of serum resistance among *Brucella abortus* isolates. *Veterinary Microbiology*, **68**, 235–244.

- Elhassanny, A.E.M., Anderson, E.S., Menscher, E.A. & Roop, R.M. (2013). The ferrous iron transporter FtrABCD is required for the virulence of *Brucella abortus* 2308 in mice. *Molecular Microbiology*, **88**, 1070–1082.
- Elzer, P.H., Jacobson, R.H., Nielsen, K.H., Douglas, J.T. & Winter, A.J. (1994a). BALB/c mice infected with *Brucella abortus* express protracted polyclonal responses of both IgG2a and IgG3 isotypes. *Immunology Letters*, **42**, 145–50.
- Elzer, P.H., Phillips, R.W., Kovach, M.E., Peterson, K.M. & Roop, R.M. (1994b). Characterization and genetic complementation of a *Brucella abortus* high-temperature-requirement A (*htrA*) deletion mutant. *Infection and immunity*, **62**, 4135–9.
- Endley, S., McMurray, D. & Ficht, T.A. (2001). Interruption of the *cydB* locus in *Brucella abortus* attenuates intracellular survival and virulence in the mouse model of infection. *Journal of bacteriology*, **183**, 2454–62.
- Eschenbrenner, M., Wagner, M., Horn, T., Kraycer, J., Mujer, C., Hagijs, S., Elzer, P. & DelVecchio, V. (2002). Comparative proteome analysis of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev 1 and a virulent strain, 16M. *Journal of bacteriology*, **184**, 4962–4970.
- Eskra, L., Canavessi, A., Carey, M. & Splitter, G. (2001). *Brucella abortus* genes identified following constitutive growth and macrophage infection. *Infection and immunity*, **69**, 7736–42.
- 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., Kjekken, R. & Goldbaum, F.A. (2009). The polymeric antigen BLSOmp31 confers protection against *Brucella ovis* infection in rams. *Vaccine*, **27**, 6704–11.
- Fensterbank, R., Pardon, P. & Marly, J. (1982). Efficacy of *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine against *Brucella ovis* infection in rams. *Annales de recherches vétérinaires. Annals of veterinary research*, **13**, 185–90.
- Fernandes, D.M. & Baldwin, C.L. (1995). Interleukin-10 downregulates protective immunity to *Brucella abortus*. *Infection and immunity*, **63**, 1130–3.
- Fernández-Lago, L. & Díaz, R. (1986). Demonstration of antibodies against *Brucella melitensis* 16M lipopolysaccharide and native hapten in human sera by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of clinical microbiology*, **24**, 76–80.
- Fernández-Lago, L., Monte, M., Chordi, A., Araya, L.N., Elzer, P.H., Rowe, G.E., Enright, F.M., Winter, A.J., Zhan, Y., Yang, J., Cheers, C., Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L., Finkelman, F.D., Holmes, J., Katona, I.M., Urban, J.F.J., et al (1996). Endogenous gamma interferon and interleukin-10 in *Brucella abortus* 2308 infection in mice. *FEMS immunology and medical microbiology*, **15**, 109–14.
- Fernández-Lago, L., Orduña, A. & Vizcaíno, N. (2005). Reduced interleukin-18 secretion in *Brucella abortus* 2308-infected murine peritoneal macrophages and in spleen cells obtained from *B. abortus* 2308-infected mice. *Journal of medical microbiology*, **54**, 527–531.
- Fernández-Lago, L., Rodríguez-Tarazona, E. & Vizcaíno, N. (1999). Differential secretion of interleukin-12 (IL-12) subunits and heterodimeric IL-12p70 protein by CD-1 mice and murine macrophages in response to intracellular infection by *Brucella abortus*. *Journal of medical microbiology*, **48**, 1065–73.
- Fernández-Prada, C.M., Nikolich, M., Vemulapalli, R., Sriranganathan, N., Boyle, S.M., Schurig, G.G., Hadfield, T.L. & Hoover, D.L. (2001). Deletion of *wboA* Enhances Activation of the Lectin Pathway of Complement in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Infection and Immunity*, **69**, 4407–4416.
- Fernández-Prada, C.M., Zelazowska, E.B., Nikolich, M., Hadfield, T.L., Roop II, R.M., Robertson, G.L. & Hoover, D.L. (2003). Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O-polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. *Infection and Immunity*, **71**, 2110–2119.
- Ficht, T. (2010). *Brucella* taxonomy and evolution. *Future microbiology*, **5**, 859–66.
- Ficht, T.A., Bearden, S.W., Sowa, B.A. & Adams, L.G. (1988). A 36-kilodalton *Brucella abortus* cell envelope protein is encoded by repeated sequences closely linked in the genomic DNA. *Infection and immunity*, **56**, 2036–2046.
- Ficht, T.A., Bearden, S.W., Sowa, B.A. & Adams, L.G. (1989). DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. *Infection and immunity*, **57**, 3281–3291.
- Ficht, T.A., Bearden, S.W., Sowa, B.A. & Marquis, H. (1990). Genetic variation at the *omp2* porin locus of the brucellae: species-specific markers. *Molecular Microbiology*, **4**, 1135–1142.
- Ficht, T., Kahl-McDonagh, M., Arenas-Gamboa, A. & Rice-Ficht, A. (2009). Brucellosis: the case for live, attenuated vaccines. *Vaccine*, **27 Suppl 4**, D40-3.
- de Figueiredo, P., Ficht, T.A., Rice-Ficht, A., Rossetti, C.A. & Adams, L.G. (2015). Pathogenesis and Immunobiology of Brucellosis: Review of Brucella–Host Interactions. *The American Journal of Pathology*, **185**, 1505–1517.
- Finkelman, F.D., Goroff, D.K., Fultz, M., Morris, S.C., Holmes, J.M. & Mond, J.J. (1990). Polyclonal activation of the murine immune system by an antibody to IgD. X. Evidence that the precursors of IgG1-secreting cells are newly generated membrane IgD+B cells rather than the B cells that are initially activated by anti-IgD antibody. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **145**, 3562–9.

- Fischer, D., Lorenz, N., Heuser, W., Kämpfer, P., Scholz, H.C. & Lierz, M. (2012).** Abscesses associated with a *Brucella inopinata*-like bacterium in a big-eyed tree frog (*Leptopelis vermiculatus*). *Journal of zoo and wildlife medicine: official publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, **43**, 625–628.
- Flannagan, R.S., Jaumouillé, V. & Grinstein, S. (2012).** The Cell Biology of Phagocytosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, **7**, 61–98.
- Fontana, C., Conde-Álvarez, R., Ståhle, J., Holst, O., Iriarte, M., Zhao, Y., Arce-Gorvel, V., Hanniffy, S., Gorvel, J.-P., Moriyón, I. & Widmalm, G. (2016).** Structural studies of lipopolysaccharide-defective mutants from *Brucella melitensis* identify a core oligosaccharide critical in virulence. *The Journal of biological chemistry*, **291**, 7727–41.
- Foster, G., Osterman, B.S., Godfroid, J., Jacques, I. & Cloeckert, A. (2007).** *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **57**, 2688–2693.
- Foulongne, V., Bourg, G., Cazeville, C., Michaux-Charachon, S. & 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. *Infection and immunity*, **68**, 1297–1303.
- Franco, M.P., Mulder, M., Gilman, R.H. & Smits, H.L. (2007).** Human brucellosis. *The Lancet. Infectious diseases*, **7**, 775–86.
- Freer, E., Moreno, E., Moriyón, I., Pizarro-Cerdá, J., Weintraub, A. & Gorvel, J. (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. *Journal of bacteriology*, **178**, 5867–5876.
- Freer, E., Pizarro-Cerdá, J., Weintraub, A., Bengoechea, J.A., Moriyón, I., Hultenby, K., Gorvel, J.P. & Moreno, E. (1999).** The outer membrane of *Brucella ovis* shows increased permeability to hydrophobic probes and is more susceptible to cationic peptides than are the outer membranes of mutant rough *Brucella abortus* strains. *Infection and immunity*, **67**, 6181–6.
- Freer, E., Rojas, N., Weintraub, A., Lindberg, A.A. & Moreno, E. (1995).** Heterogeneity of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Research in microbiology*, **146**, 569–578.
- Fretin, D., Fauconnier, A., Köhler, S., Halling, S., Léonard, S., Nijsskens, C., Ferooz, J., Lestrade, P., Delrue, R.-M., Danese, I., Vandenhoute, J., Tibor, A., DeBolle, X. & Letesson, J.-J. (2005).** The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cellular microbiology*, **7**, 687–98.
- Fugier, E., Salcedo, S.P., de Chastellier, C., Pophillat, M., Muller, A., Arce-Gorvel, V., Fourquet, P. & Gorvel, J.-P. (2009).** The Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase and the Small GTPase Rab 2 Are Crucial for *Brucella* Replication. *PLoS Pathogens*, **5**, e1000487.
- Galdiero, E., Romano Carratelli, C., Vitiello, M., Nuzzo, I., Del Vecchio, E., Bentivoglio, C., Perillo, G. & Galdiero, F. (2000).** HSP and apoptosis in leukocytes from infected or vaccinated animals by *Brucella abortus*. *The new microbiologica*, **23**, 271.
- Gall, D., Nielsen, K., Vigliocco, A., Smith, P., Perez, B., Rojas, X. & Robles, C. (2003).** Evaluation of an indirect enzyme-linked immunoassay for presumptive serodiagnosis of *Brucella ovis* in sheep. *Small Ruminant Research*, **48**, 173–179.
- Gamazo, C. & Moriyón, I. (1987).** Release of outer membrane fragments by exponentially growing *Brucella melitensis* cells. *Infection and immunity*, **55**, 609–15.
- García-Carrillo, C. (1980).** Comparison of *B. melitensis* Rev. 1 and *B. abortus* strain 19 as a vaccine against brucellosis in cattle. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B*, **27**, 131–8.
- García-Yoldi, D., Marín, C.M., de Miguel, M.J., Muñoz, P.M., Vizmanos, J.L. & 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. *Clinical chemistry*, **52**, 779–81.
- Garin-Bastuji, B. & Blasco, J.M. (2013).** *Ovine epididymitis. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)*. Editado por la Organización Mundial de Salud Animal.
- Gay, P., Le Coq, D., Steinmetz, M., Berkelman, T. & Kado, C.I. (1985).** Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology*, **164**, 918–21.
- Giambartolomei, G.H., Delpino, M.V., Cahanovich, M.E., Wallach, J.C., Baldi, P.C., Velikovskiy, C.A. & Fossati, C.A. (2002).** Diminished production of T helper 1 cytokines correlates with T cell unresponsiveness to *Brucella* cytoplasmic proteins in chronic human brucellosis. *The Journal of infectious diseases*, **186**, 252–9.
- Giambartolomei, G.H., Zwerdling, A., Cassataro, J., Bruno, L., Fossati, C.A. & Philipp, M.T. (2004).** Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. *The Journal of Immunology*, **173**, 4635–4642.

- Gil-Ramírez, Y., Conde-Álvarez, R., Palacios-Chaves, L., Zúñiga-Ripa, A., Grilló, M.-J., Arce-Gorvel, V., Hanniffy, S., Moriyón, I. & Iriarte, M. (2014). The identification of wadB, a new glycosyltransferase gene, confirms the branched structure and the role in virulence of the lipopolysaccharide core of *Brucella abortus*. *Microbial pathogenesis*, **73C**, 53–59.
- Del Giudice, M.G., Döhmer, P.H., Spera, J.M., Laporte, F.T., Marchesini, M.I., Czibener, C. & Ugalde, J.E. (2016). VirJ Is a *Brucella* virulence factor involved in the secretion of type IV secreted substrates. *The Journal of biological chemistry*, **291**, 12383–93.
- Godfroid, F., Taminiau, B., Danese, I., Denoel, P., Tibor, A., Weynants, V., Cloeckaert, A., Godfroid, J. & 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. *Infection and immunity*, **66**, 5485–93.
- Godfroid, J., Cloeckaert, A., Liautard, J.P., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., Garin-Bastuji, B. & Letesson, J.J. (2005). From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Veterinary research*, **36**, 313–326.
- Godfroid, J., Scholz, H., Barbier, T., Nicolas, C., Wattiau, P., Fretin, D., Whatmore, A., Cloeckaert, A., Blasco, J.M., Moriyon, I., Saegerman, C., Muma, J., Dahouk, S., Neubauer, H. & Letesson, J.-J. (2011). Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. *Preventive veterinary medicine*, **102**, 118–131.
- Godlewska, R., Wiśniewska, K., Pietras, Z. & Jagusztyn-Krynicka, E.K. (2009). Peptidoglycan-associated lipoprotein (Pal) of Gram-negative bacteria: function, structure, role in pathogenesis and potential application in immunoprophylaxis. *FEMS microbiology letters*, **298**, 1–11.
- Goenka, R., Parent, M.A., Elzer, P.H. & Baldwin, C.L. (2011). B cell-deficient mice display markedly enhanced resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus*. *The Journal of infectious diseases*, **203**, 1136–46.
- Gómez, L.A., Alvarez, F.I., Fernández, P.A., Flores, M.R., Molina, R.E., Coloma, R.F. & Oñate, A.A. (2016). Immunogenicity and Protective Response Induced by Recombinant Plasmids Based on the BAB1\_0267 and BAB1\_0270 Open Reading Frames of *Brucella abortus* 2308 in BALB/c Mice. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, **6**, 117.
- Gómez-Miguel, M. & Moriyón, I. (1986). Demonstration of a peptidoglycan-linked lipoprotein and characterization of its trypsin fragment in the outer membrane of *Brucella* spp. *Infection and immunity*, **53**, 678–684.
- González, D., Grilló, M.-J., De Miguel, M.-J., Ali, T., Arce-Gorvel, V., Delrue, R.-M., Conde-Alvarez, 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. & 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.
- Goolab, S., Roth, R.L., van Heerden, H. & Crampton, M.C. (2015). Analyzing the molecular mechanism of lipoprotein localization in *Brucella*. *Frontiers in Microbiology*, **6**, 1189.
- Gouletsou, P.G. (2015). Microbial diseases of the genital system of rams or bucks. *Veterinary Microbiology*, **181**, 130–135.
- Greenspan, N.S. & Cooper, L.J. (1992). Intermolecular cooperativity: a clue to why mice have IgG3? *Immunology today*, **13**, 164–8.
- Grilló, M., Bosseray, N. & Blasco, J.M. (2000). In vitro markers and biological activity in mice of seed lot strains and commercial *Brucella melitensis* Rev 1 and *Brucella abortus* B19 vaccines. *Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization*, **28**, 119–127.
- Grilló, M.-J., Blasco, J.M., Gorvel, J., Moriyón, I. & Moreno, E. (2012). What have we learned from brucellosis in the mouse model? *Veterinary research*, **43**, 29.
- Grilló, M.J., Manterola, L., de Miguel, M.J., Muñoz, P.M., Blasco, J.M., Moriyón, I. & López-Goñi, I. (2006a). Increases of efficacy as vaccine against *Brucella abortus* infection in mice by simultaneous inoculation with avirulent smooth bvrS/bvrR and rough wbkA mutants. *Vaccine*, **24**, 2910–6.
- Grilló, M.J., Marín, C.M., Barberán, M. & Blasco, J.M. (1999). Experimental *Brucella ovis* infection in pregnant ewes. *The Veterinary record*, **144**, 555–8.
- Grilló, M.J., De Miguel, M.J., Muñoz, P.M., Marín, C.M., Ariza, J. & Blasco, J.M. (2006b). Efficacy of several antibiotic combinations against *Brucella melitensis* Rev 1 experimental infection in BALB/c mice. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, **58**, 622–6.
- Gross, A., Terraza, A., Ouahrani-Bettache, S., Liautard, J.-P. & Dornand, J. (2000). In vitro *Brucella suis* infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells. *Infection and Immunity*, **68**, 342–351.
- Guilloteau, L.A., Dornand, J., Gross, A., Olivier, M., Cortade, F., Vern, Y. Le & Kerboeuf, D. (2003). Nramp1 is not a major determinant in the control of *Brucella melitensis* infection in mice. *Infection and immunity*, **71**, 621–8.
- Guzmán-Verri, C., Chaves-Olarte, E., Eichel-Streiber, C. von, López-Goñi, I., Thelestam, M., Arvidson, S., Gorvel, J.-P. & Moreno, E. (2001). GTPases of the Rho Subfamily Are Required for *Brucella abortus* Internalization in Nonprofessional Phagocytes. Direct activation of Cdc42. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 44435–44443.

- Guzmán-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, A., Parra, A., Cloeckert, A., Garin, J., Gorvel, J.-P., Moriyon, I., Moreno, E. & Lopez-Goni, I. (2002). The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the *Rhizobiaceae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 12375–12380.
- Hajishengallis, G. & Lambris, J.D. (2010). Crosstalk pathways between Toll-like receptors and the complement system. *Trends in Immunology*, **31**, 154–163.
- Hajishengallis, G. & Lambris, J.D. (2016). More than complementing Tolls: complement-Toll-like receptor synergy and crosstalk in innate immunity and inflammation. *Immunological Reviews*, **274**, 233–244.
- Halling, S.M. & Jensen, A.E. (2006). Intrinsic and selected resistance to antibiotics binding the ribosome: analyses of *Brucella* 23S rrn, L4, L22, EF-Tu1, EF-Tu2, efflux and phylogenetic implications. *BMC microbiology*, **6**, 84.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, **166**, 557–580.
- Hanot-Mambres, D., Machelart, A., Vanderwinden, J.-M., De Trez, C., Ryffel, B., Letesson, J.-J. & Muraille, E. (2015). In Situ Characterization of Splenic *Brucella melitensis* Reservoir Cells during the Chronic Phase of Infection in Susceptible Mice. *PLoS one*, **10**, e0137835.
- Hartigan, P.J. (1997). Human brucellosis-Epidemiology and clinical manifestations. *Irish Veterinary Journal*, **50**, 179–180.
- He, Y., Reichow, S., Ramamoorthy, S., Ding, X., Lathigra, R., Craig, J.C., Sobral, B.W.S., Schurig, G.G., Sriranganathan, N. & Boyle, S.M. (2006). *Brucella melitensis* triggers time-dependent modulation of apoptosis and down-regulation of mitochondrion-associated gene expression in mouse macrophages. *Infection and immunity*, **74**, 5035–46.
- Henderson, I.R. & Nataro, J.P. (2001). Virulence Functions of Autotransporter Proteins. *Infection and Immunity*, **69**, 1231–1243.
- Herrero, M., de Lorenzo, V. & 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. *Journal of bacteriology*, **172**, 6557–67.
- Higgins, C.F. (2001). ABC transporters: physiology, structure and mechanism-an overview. *Research in microbiology*, **152**, 205–10.
- Hinchliffe, P., Symmons, M., Hughes, C. & Koronakis, V. (2013). Structure and operation of bacterial tripartite pumps. *Annual review of microbiology*, **67**, 221–242.
- Ho, S., Hunt, H., Horton, R., Pullen, J. & Pease, L. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, **77**, 51–59.
- Holmes, B., Popoff, M., Kiredjian, M. & Kersters, K. (1988). *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov. from Human Clinical Specimens and Previously Known as Group Vd. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **38**, 406–416.
- Horiyama, T., Yamaguchi, A. & Nishino, K. (2010). TolC dependency of multidrug efflux systems in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, **65**, 1372–1376.
- Hort, G.M., Weisenburger, J., Borsdorf, B., Peters, C., Banai, M., Hahn, H., Jacob, J. & Mielke, M.E.A. (2003). Delayed type hypersensitivity-associated disruption of splenic periarteriolar lymphatic sheaths coincides with temporary loss of IFN-gamma production and impaired eradication of bacteria in *Brucella abortus*-infected mice. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, **5**, 95–106.
- Huddleson, I. (1929). The differentiation of the species of the genus *Brucella*. *Michigan State College Agricultural Experimental Station Technical Bulletin*, **100**, 1–16.
- Iannino, N., Briones, G., Tolmasky, M. & Ugalde, R. (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. *Journal of bacteriology*, **180**, 4392–4400.
- de Iannino, N.I., Briones, G., Iannino, F. & Ugalde, R.A. (2000). Osmotic regulation of cyclic 1,2-beta-glucan synthesis. *Microbiology (Reading, England)*, 1735–42.
- el Idrissi, A.H., Benkirane, A., el Maadoudi, M., Bouslikhane, M., Berrada, J. & Zerouali, A. (2001). Comparison of the efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 and *Brucella melitensis* Rev. 1 live vaccines against experimental infection with *Brucella melitensis* in pregnant ewes. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, **20**, 741–7.
- Iñón de Iannino, N., Briones, G., Tolmasky, M. & 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. *Journal of bacteriology*, **180**, 4392–400.

- Iriarte, M., González, D., Delrue, R.M., Monreal, D., Conde, R., López-Goñi, I., Letesson, J.-J. & Moriyón, I. (2005).** Brucella lipopolysaccharide: structure, biosynthesis and genetics: *Brucella: Molecular and Cellular biology*. Editado por López-Goñi, I. & Moriyón, I. *Horizon Bioscience*. Pamplona, Spain., 159–191.
- Jacques, I., Grayon, M. & Verger, J.-M. (2007).** Oxidative metabolic profiles of *Brucella* strains isolated from marine mammals: contribution to their species classification. *FEMS microbiology letters*, **270**, 245–9.
- Jenssen, H., Hamill, P. & Hancock, R.E.W. (2006).** Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **19**, 491–511.
- Jiménez de Bagüés, M., Elzer, P., Blasco, J.M., Marín, C., Gamazo, C. & Winter, A. (1994).** Protective immunity to *Brucella ovis* in BALB/c mice following recovery from primary infection or immunization with subcellular vaccines. *Infection and immunity*, **62**, 632–638.
- Jiménez de Bagüés, M., Marín, C., Barberán, M. & Blasco, J.M. (1993).** Evaluation of vaccines and of antigen therapy in a mouse model for *Brucella ovis*. *Vaccine*, **11**, 61–66.
- Jiménez de Bagüés, M.P., Barberán, M., Marín, C.M. & Blasco, J.M. (1995).** The *Brucella abortus* RB51 vaccine does not confer protection against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine*, **13**, 301–4.
- de Jong, M.F., Sun, Y.-H., den Hartigh, A.B., van Dijk, J.M. & 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. *Molecular Microbiology*, **70**, 1378–1396.
- Jubier-Maurin, V., Boigegrain, R., Cloeckaert, A., Gross, A., Alvarez-Martinez, M., Terraza, A., Liautard, J., Köhler, S., Rouot, B. & Dornand, J. (2001).** Major outer membrane protein Omp25 of *Brucella suis* is involved in inhibition of tumor necrosis factor alpha production during infection of human macrophages. *Infection and immunity*, **69**, 4823–4830.
- Kahl-McDonagh, M.M., Elzer, P.H., Hagiús, S.D., Walker, J. V, Perry, Q.L., Seabury, C.M., den Hartigh, A.B., Tsolis, R.M., Adams, L.G., Davis, D.S. & Ficht, T.A. (2006).** Evaluation of novel *Brucella melitensis* unmarked deletion mutants for safety and efficacy in the goat model of brucellosis. *Vaccine*, **24**, 5169–77.
- Kahl-McDonagh, M.M. & 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. *Infection and Immunity*, **74**, 4048–4057.
- Kämpfer, P., Wohlgemuth, S. & Scholz, H. (2014).** The Family *Brucellaceae* - *Alphaproteobacteria* and *Betaproteobacteria: The Prokaryotes*. Editado por Rosenberg E. et al. Springer-Verlag. Berlin-eidelberg, Alemania, 155–178.
- Kim, D.H., Son, B.G., Lim, J.J., Lee, J.J., Kim, D.G., Lee, H.J., Min, W., Rhee, M.H., Kim, K.D., Chang, H.H. & Kim, S. (2013).** The role of a *Brucella abortus* lipoprotein in intracellular replication and pathogenicity in experimentally infected mice. *Microbial Pathogenesis*, **54**, 34–39.
- Kim, S., Lee, D.S., Watanabe, K., Furuoka, H., Suzuki, H. & Watarai, M. (2005).** Interferon-gamma promotes abortion due to *Brucella* infection in pregnant mice. *BMC microbiology*, **5**, 22.
- Kim, S., Watarai, M., Suzuki, H., Makino, S., Kodama, T. & Shirahata, T. (2004).** Lipid raft microdomains mediate class A scavenger receptor-dependent infection of *Brucella abortus*. *Microbial Pathogenesis*, **37**, 11–19.
- Kittelberger, R., Diack, D., Vizcaino, N., Zygmunt, M. & Cloeckaert, A. (1998).** Characterization of an immunodominant antigen in *Brucella ovis* and evaluation of its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary microbiology*, **59**, 213–227.
- Kittelberger, R., Hilbink, F., Hansen, M.F., Ross, G.P., de Lisle, G.W., Cloeckaert, A. & de Bruyn, J. (1995).** Identification and characterization of immunodominant antigens during the course of infection with *Brucella ovis*. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.*, **7**, 210–8.
- Knutton, S., Shaw, R.K., Anantha, R.P., Donnenberg, M.S. & Zorgani, A.A. (1999).** The type IV bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal. *Molecular microbiology*, **33**, 499–509.
- Ko, J., Gendron-Fitzpatrick, A. & Splitter, G.A. (2002).** Susceptibility of IFN Regulatory Factor-1 and IFN Consensus Sequence Binding Protein-Deficient Mice to Brucellosis. *The Journal of Immunology*, **168**, 2433–2440.
- Ko, J. & Splitter, G.A. (2003).** Molecular Host-Pathogen Interaction in Brucellosis: Current Understanding and Future Approaches to Vaccine Development for Mice and Humans. *Clinical Microbiology Reviews*, **16**, 65–78.
- Koebnik, R., Locher, K.P. & Van Gelder, P. (2000).** Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology*, **37**, 239–253.

- Köhler, S., Foulongne, V., Ouahrani-Bettache, S., Bourg, G., Teyssier, J., Ramuz, M. & Liautard, J.-P. (2002). The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 15711–6.
- Köhler, S., Michaux-Charachon, S., Porte, F., Ramuz, M. & Liautard, J.P. (2003). What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named *Brucella*? *Trends in microbiology*, **11**, 215–9.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B. & Hughes, C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*, **405**, 914–919.
- Kovacs-Simon, A., Titball, R.W. & Michell, S.L. (2011). Lipoproteins of bacterial pathogens. *Infection and immunity*, **79**, 548–561.
- Kubler-Kielb, J. & Vinogradov, E. (2013a). The study of the core part and non-repeating elements of the O-antigen of *Brucella* lipopolysaccharide. *Carbohydrate research*, **366**, 33–37.
- Kubler-Kielb, J. & Vinogradov, E. (2013b). Reinvestigation of the structure of *Brucella* O-antigens. *Carbohydrate research*, **378**, 144–147.
- Kuge, O., Dascher, C., Orci, L., Rowe, T., Amherdt, M., Plutner, H., Ravazzola, M., Tanigawa, G., Rothman, J.E. & Balch, W.E. (1994). Sar1 promotes vesicle budding from the endoplasmic reticulum but not Golgi compartments. *The Journal of cell biology*, **125**, 51–65.
- Lacerda, T., Cardoso, P., Almeida, L., Camargo, I., Afonso, D., Trant, C., Macedo, G., Campos, E., Cravero, S., Salcedo, S., Gorvel, J.-P. & Oliveira, S. (2010). Inactivation of formyltransferase (wbkC) gene generates a *Brucella abortus* rough strain that is attenuated in macrophages and in mice. *Vaccine*, **28**, 5627–5634.
- Lacerda, T.L.S., Salcedo, S.P. & Gorvel, J.-P. (2013). *Brucella* T4SS: the VIP pass inside host cells. *Current Opinion in Microbiology*, **16**, 45–51.
- Lamontagne, J.†, Heather Butler, †, Esteban Chaves-Olarte, ‡, Joanna Hunter, †, Michael Schirm, †, Caroline Paquet, †, Mei Tian, †, Paul Kearney, †, Lyes Hamaidi, †, Daniel Chelsky, †, Ignacio Moriyón, §, Edgardo Moreno, ¶ and Eustache Paramithiotis\*, † (2007). Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*. *Journal of Proteome Research*, **6**, 1519–1529.
- Lamontagne, J., Forest, A., Marazzo, E., Denis, F., Butler, H., Michaud, J.-F., Boucher, L., Pedro, I., Villeneuve, A., Sitnikov, D., Trudel, K., Nassif, N., Boudjelti, D., Tomaki, F., Chaves-Olarte, E., Guzmán-Verri, C., Brunet, S., Côté-Martin, A., Hunter, J., Moreno, E., et al (2009). Intracellular adaptation of *Brucella abortus*. *Journal of Proteome Research*, **8**, 1594–1609.
- Lapaque, N., Forquet, F., de Chastellier, C., Mishal, Z., Jolly, G., Moreno, E., Moriyon, I., Heuser, J.E., He, H.-T. & Gorvel, J.-P. (2006). Characterization of *Brucella abortus* lipopolysaccharide macrodomains as mega rafts. *Cellular Microbiology*, **8**, 197–206.
- Lapaque, N., Moriyon, I., Moreno, E. & Gorvel, J.P. (2005). *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Current opinion in microbiology*, **8**, 60–6.
- Lavín, J.L., Binnewies, T.T., Pisabarro, A.G., Ussery, D.W., García-Lobo, J.M. & Oguiza, J.A. (2010). Differences in two-component signal transduction proteins among the genus *Brucella*: Implications for host preference and pathogenesis.
- López-Goñi, I., García-Yoldi, D., Marín, C., Miguel, M., Barquero-Calvo, E., Guzmán-Verri, C., Albert, D. & Garin-Bastuji, B. (2011). New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Veterinary microbiology*, **154**, 152–155.
- 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. & Garin-Bastuji, B. (2008). Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *Journal of clinical microbiology*, **46**, 3484–7.
- López-Goñi, I., Guzmán-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, A., Moriyón, I. & Moreno, E. (2002). Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS. *Veterinary Microbiology*, **90**, 329–339.
- Ma, D., Cook, D.N., Alberti, M., Pon, N.G., Nikaido, H. & Hearst, J.E. (1995). Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, **16**, 45–55.
- Macedo, A.A., Silva, A.P.C., Mol, J.P.S., Costa, L.F., Garcia, L.N.N., Araújo, M.S., Martins Filho, O.A., Paixão, T.A. & Santos, R.L. (2015). The abcEDCBA-encoded ABC transporter and the virB operon-encoded Type IV Secretion System of *Brucella ovis* are critical for intracellular trafficking and survival in ovine monocyte-derived macrophages. *PloS one*, **10**, e0138131.
- Maisnier-Patin, S., Berg, O.G., Liljas, L. & Andersson, D.I. (2002). Compensatory adaptation to the deleterious effect of antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium*. *Molecular microbiology*, **46**, 355–66.

- Malo, D., Vogan, K., Vidal, S., Hu, J., Cellier, M., Schurr, E., Fuks, A., Bumstead, N., Morgan, K. & Gros, P. (1994). Haplotype Mapping and Sequence Analysis of the Mouse Nramp Gene Predict Susceptibility to Infection with Intracellular Parasites. *Genomics*, **23**, 51–61.
- Mancilla, M., Grilló, M.-J., Miguel, M.-J., López-Goñi, I., San-Román, B., Zabalza-Baranguá, A. & Moriyón, I. (2013). Deletion of the GI-2 integrase and the wbkA flanking transposase improves the stability of *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine. *Veterinary research*, **44**, 105.
- Manterola, L., Guzmán-Verri, C., Chaves-Olarte, E., Barquero-Calvo, E., Miguel, M.-J., Moriyón, I., Grilló, M.-J., López-Goñi, I. & Moreno, E. (2007). BvrR/BvrS-controlled outer membrane proteins Omp3a and Omp3b are not essential for *Brucella abortus* virulence. *Infection and immunity*, **75**, 4867–4874.
- Manterola, L., Moriyón, I., Moreno, E., Sola-Landa, A., Weiss, D.S., Koch, M.H.J., Howe, J., Brandenburg, K. & Lopez-Goni, I. (2005). The Lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR Mutants Contains Lipid A Modifications and Has Higher Affinity for Bactericidal Cationic Peptides. *Journal of Bacteriology*, **187**, 5631–5639.
- Manterola, L., Tejero-Garcés, A., Ficapal, A., Shopayeva, G., Blasco, J.M., Marin, C.M. & López-Goñi, I. (2003). Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. *Veterinary microbiology*, **92**, 65–72.
- Marchesini, M.I., Herrmann, C.K., Salcedo, S.P., Gorvel, J.-P. & Comerci, D.J. (2011). In search of *Brucella abortus* type IV secretion substrates: screening and identification of four proteins translocated into host cells through VirB system. *Cellular microbiology*, **13**, 1261–74.
- Marín, C., Barberán, M., Bagüés, M. & Blasco, J.M. (1990). Comparison of subcutaneous and conjunctival routes of Rev 1 vaccination for the prophylaxis of *Brucella ovis* infection in rams. *Research in veterinary science*, **48**, 209–215.
- Marquis, H. & Ficht, T.A. (1993). The *omp2* gene locus of *Brucella abortus* encodes two homologous outer membrane proteins with properties characteristic of bacterial porins. *Infection and Immunity*, **61**, 3785–3790.
- Martín, F., Posadas, D., Carrica, M., Cravero, S., O'Callaghan, D. & Zorreguieta, Á. (2009). Interplay between two RND systems mediating antimicrobial resistance in *Brucella suis*. *Journal of bacteriology*, **191**, 2530–2540.
- Martínez de Tejada, G. & Moriyón, I. (1993). The outer membranes of *Brucella* spp. are not barriers to hydrophobic permeants. *Journal of bacteriology*, **175**, 5273–5.
- Martínez de Tejada, G., Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E. & Moriyón, I. (1995). The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infection and immunity*, **63**, 3054–3061.
- Martínez-Núñez, C., Altamirano-Silva, P., Alvarado-Guillén, F., Moreno, E., Guzmán-Verri, C. & Chaves-Olarte, E. (2010). The two-component system BvrR/BvrS regulates the expression of the type IV secretion system VirB in *Brucella abortus*. *Journal of bacteriology*, **192**, 5603–8.
- Martín-Martín, A., 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 and infection / Institut Pasteur*, **10**, 706–710.
- Martín-Martín, A., Caro-Hernández, P., Sancho, P., Tejedor, C., Cloeckert, A., Fernández-Lago, L. & Vizcaíno, N. (2009). Analysis of the occurrence and distribution of the Omp25/Omp31 family of surface proteins in the six classical *Brucella* species. *Veterinary microbiology*, **137**, 74–82.
- Martín-Martín, A., Sancho, P., Miguel, M., Fernández-Lago, L. & Vizcaíno, N. (2012). Quorum-sensing and BvrR/BvrS regulation, the type IV secretion system, cyclic glucans, and BacA in the virulence of *Brucella ovis*: similarities to and differences from smooth brucellae. *Infection and immunity*, **80**, 1783–1793.
- Martín-Martín, A., Sancho, P., Tejedor, C., Fernández-Lago, L. & Vizcaíno, N. (2011). Differences in the outer membrane-related properties of the six classical *Brucella* species. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, **189**, 103–105.
- Martín-Martín, A., Vizcaíno, N. & Fernández-Lago, L. (2010). Cholesterol, ganglioside GM1 and class A scavenger receptor contribute to infection by *Brucella ovis* and *Brucella canis* in murine macrophages. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, **12**, 246–251.
- Martins, R.D.C., Irache, J.M. & Gamazo, C. (2012). Acellular vaccines for ovine brucellosis: a safer alternative against a worldwide disease. *Expert Review of Vaccines*, **11**, 87–95.
- Martirosyan, A., Moreno, E. & Gorvel, J.-P. (2011). An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. *Immunological reviews*, **240**, 211–234.
- Martirosyan, A., Pérez-Gutiérrez, C., Banchereau, R., Dutartre, H., Lecine, P., Dullaers, M., Mello, M., Salcedo, S.P., Muller, A., Leserman, L., Levy, Y., Zurawski, G., Zurawski, S., Moreno, E., Moriyón, I., Klechevsky, E., Banchereau, J., Oh, S. & Gorvel, J.-P. (2012). *Brucella*  $\beta$  1,2 cyclic glucan is an activator of human and mouse dendritic cells. *PLoS pathogens*, **8**, e1002983.

- Meyer, K. & Shaw, E. (1920).** A Comparison of the Morphologic, Cultural and Biochemical Characteristics of *B. abortus* and *B. melitensis*: Studies on the Genus *Brucella* Nov. Gen. I. *The Journal of infectious diseases*, **27**, 137–184.
- Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Jumas-Bilak, E., Guigue-Talet, P., Allardet-Servent, A., O'Callaghan, D. & Ramuz, M. (1997).** Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. *Journal of bacteriology*, **179**, 3244–9.
- Miller, C. & Celli, J. (2016).** Avoidance and subversion of eukaryotic homeostatic autophagy mechanisms by bacterial pathogens. *Journal of Molecular Biology*.
- Miller, J.H. (1972).** Experiments in molecular genetics, pp. 352-355. *Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.*
- Misra, R. & Bavro, V.N. (2009).** Assembly and transport mechanism of tripartite drug efflux systems. *Biochimica et biophysica acta*, **1794**, 817–825.
- Mobasher, H., Ficht, T.A., Marquis, H., Lea, E.J., Lakey, J.H. & Hakenback, J.R. (1997).** *Brucella* Omp2a and Omp2b porins: single channel measurements and topology prediction. *FEMS microbiology letters*, **155**, 23–30.
- Monreal, D., Grilló, M., González, D., Marín, C., Miguel, M., López-Goñi, I., Blasco, J.M., Cloeckeaert, A. & 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. *Infection and immunity*, **71**, 3261–3271.
- Moreno, E. (2014).** Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Frontiers in microbiology*, **5**, 213.
- Moreno, E. & Gorvel, J.P. (2004a).** Invasion, intracellular trafficking and replication of *Brucella* organisms in professional and non-professional phagocytes. In *Brucella: Molecular Microbiology and Genomics*, López-Goñi I & Moriyón I (eds) pp 287–312. Horizon Bioscience, Norfolk.
- Moreno, E. & Gorvel, J.-P. (2004b).** Invasion, intracellular trafficking and replication of *Brucella* organisms in professional and non-professional phagocytes. *Brucella: Molecular and Cellular Biology*. Editado por López-Goñi, I. & Moriyón, I. Norfolk, UK. , 280–305.
- Moreno, E. & Moriyón, I. (2002).** *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 1–3.
- Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M. & Mayer, H. (1990).** *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *Journal of bacteriology*, **172**, 3569–76.
- Moriyón, I. & Berman, D.T. (1982).** Effects of nonionic, ionic, and dipolar ionic detergents and EDTA on the *Brucella* cell envelope. *Journal of bacteriology*, **152**, 822–828.
- Moriyón, I., Grilló, M., Monreal, D., González, D., Marín, C., López-Goñi, I., Mainar-Jaime, R., Moreno, E. & Blasco, J.M. (2004).** Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Veterinary research*, **35**, 1–38.
- Moriyón, I. & López-Goñi, I. (1998).** Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, **1**, 19–26.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. & Coffman, R.L. (2005).** Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **175**, 5–14.
- Moustacas, V.S., Silva, T.M., Costa, L.F., Xavier, M.N., Carvalho, C.A., Costa, É.A., Paixão, T.A., Santos, R.L., Burgess, G., Júnior, C.C., Xavier, M., Costa, L., Silveira, S., Sant'Anna, F., Borges, A., Gouveia, A., Santos, R., Walker, L., Leamaster, R., Díaz-Aparicio, E., et al (2013).** Species-specific multiplex PCR for the diagnosis of *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis*, and *Histophilus somni* infection in rams. *BMC Veterinary Research*, **9**, 51.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, **51**, 263–73.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E. & Yamaguchi, A. (2002).** Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature*, **419**, 587–593.
- Murphy, E.A., Sathiyaseelan, J., Parent, M.A., Zou, B. & Baldwin, C.L. (2001).** Interferon-gamma is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice. *Immunology*, **103**, 511–8.
- Murphy, T.F., Kirkham, C. & Lesse, A.J. (2006).** Construction of a mutant and characterization of the role of the vaccine antigen P6 in outer membrane integrity of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infection and immunity*, **74**, 5169–76.
- Myeni, S., Child, R., Ng, T.W., Kupko, J.J., Wehrly, T.D., Porcella, S.F., Knodler, L.A. & Celli, J. (2013).** *Brucella* modulates secretory trafficking via multiple type IV secretion effector proteins. *PLoS pathogens*, **9**, e1003556.

- Nan, W., Zhang, Y., Tan, P., Xu, Z., Chen, Y., Mao, K. & Chen, Y. (2016). A rapid cycleave PCR method for distinguishing the vaccine strain *Brucella abortus* A19 in China. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **28**, 214–218.
- Narita, S., Matsuyama, S. & Tokuda, H. (2004). Lipoprotein trafficking in *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*, **182**, 1–6.
- Naroeni, A. & Porte, F. (2002). Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry and short-term survival of *Brucella suis* in murine macrophages. *Infection and immunity*, **70**, 1640–4.
- Nicoletti, P. (1990). Vaccination against *Brucella*. *Advances in biotechnological processes*, **13**, 147–68.
- Nikaido, H. (1996). Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology*, **178**, 5853–9.
- Nikaido, H. (2003). Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **67**, 593–656.
- Nikaido, H. (2011). Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, **77**, 1–60.
- Norihisa Tamura, ‡,§, Satoshi Murakami, ‡,§,‡, Yoshiaki Oyama, ‡, Masaji Ishiguro, # and Akihito Yamaguchi\*, ‡,§ (2005). Direct Interaction of Multidrug Efflux Transporter AcrB and Outer Membrane Channel TolC Detected via Site-Directed Disulfide Cross-Linking†.
- O’Callaghan, D., Cazeville, C., Allardet-Servent, A., Boschioli, M.L., Bourg, G., Foulongne, V., Frutos, P., Kulakov, Y. & 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*. *Molecular Microbiology*, **33**, 1210–1220.
- OIE (2008). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Vol 2.: Bovine brucellosis Paris.
- OIE (2015). Epididimitis ovina (*Brucella ovis*). *Manual de la Organización Mundial de Salud Animal sobre Animales Terrestres. Editado por la Organización Mundial de Salud Animal*.
- Ojeda, J.F., Martinson, D.A., Menscher, E.A. & Roop, R.M. (2012). The bhuQ gene encodes a heme oxygenase that contributes to the ability of *Brucella abortus* 2308 to use heme as an iron source and is regulated by Irr. *Journal of bacteriology*, **194**, 4052–8.
- Oliveira, S.C., de Oliveira, F.S., Macedo, G.C., de Almeida, L.A. & Carvalho, N.B. (2008). The role of innate immune receptors in the control of *Brucella abortus* infection: Toll-like receptors and beyond. *Microbes and Infection*, **10**, 1005–1009.
- 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. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **56**, 1173–1175.
- Paixão, T., Roux, C., Hartigh, A., Sankaran-Walters, S., D, S., Dandekar, S., ekar, Santos, R. & Tsolis, R. (2009). Establishment of systemic *Brucella melitensis* infection through the digestive tract requires urease, the type IV secretion system, and lipopolysaccharide O antigen. *Infection and immunity*, **77**, 4197–4208.
- Palacios-Chaves, L., Conde-Álvarez, R., Gil-Ramírez, Y., Zúñiga-Ripa, A., Barquero-Calvo, E., Chacón-Díaz, C., Chaves-Olarte, E., Arce-Gorvel, V., Gorvel, J.-P., Moreno, E., de Miguel, M.-J., Grilló, M.-J., Moriyón, I. & Iriarte, M. (2011). *Brucella abortus* ornithine lipids are dispensable outer membrane components devoid of a marked pathogen-associated molecular pattern. *PLoS one*, **6**, e16030.
- Palomares-Resendiz, E., Arellano-Reynoso, B., Hernández-Castro, R., Tenorio-Gutiérrez, V., Salas-Téllez, E., Suárez-Güemes, F. & Díaz-Aparicio, E. (2012). Immunogenic response of *Brucella canis* virB10 and virB11 mutants in a murine model. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, **2**, 35.
- Pandey, A., Cabello, A., Akoolo, L., Rice-Ficht, A., Arenas-Gamboa, A., McMurray, D., Ficht, T.A. & de Figueiredo, P. (2016). The Case for Live Attenuated Vaccines against the Neglected Zoonotic Diseases Brucellosis and Bovine Tuberculosis. *PLoS neglected tropical diseases*, **10**, e0004572.
- Paolicchi, F., Paolicchi, O., Nuñez, M., Fiorentino, M., Malena, R., Trangoni, M., Cravero, S. & Estein, S. (2013). Immune response and reproductive consequences in experimentally infected ewes with *Brucella ovis* during late pregnancy. *Revista Argentina de microbiología*, **45**, 13–20.
- Pappas, G., Panagopoulou, P., Christou, L. & Akritidis, N. (2006). *Brucella* as a biological weapon. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **63**, 2229–36.
- Paquet, J.-Y., Diaz, M.A., Genevrois, S., Grayon, M., Verger, J.-M., De Bolle, X., Lakey, J.H., Letesson, J.-J. & Cloeckert, A. (2001). Molecular, Antigenic, and Functional Analyses of Omp2b Porin Size Variants of *Brucella* spp. *Journal of Bacteriology*, **183**, 4839–4847.
- Paranavitana, C., Zelazowska, E., Izadjoo, M. & Hoover, D. (2005). Interferon-gamma associated cytokines and chemokines produced by spleen cells from *Brucella*-immune mice. *Cytokine*, **30**, 86–92.

- Pardon, P. & Marly, J. (1976).** Resistance of *Brucella abortus* infected mice to intravenous or intraperitoneal *Brucella* reinfection. *Annales d'immunologie*, **127**, 57–70.
- Pasquali, P., Adone, R., Gasbarre, L.C., Pistoia, C. & Ciuchini, F. (2001).** Mouse cytokine profiles associated with *Brucella abortus* RB51 vaccination or *B. abortus* 2308 infection. *Infection and immunity*, **69**, 6541–4.
- Pasquali, P., Adone, R., Gasbarre, L.C., Pistoia, C. & Ciuchini, F. (2002).** Effect of exogenous interleukin-18 (IL-18) and IL-12 in the course of *Brucella abortus* 2308 infection in mice. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, **9**, 491–2.
- Pasquevich, K.A., Ibañez, A.E., Coria, L.M., García Samartino, C., Estein, S.M., Zwerdling, A., Barrionuevo, P., Oliveira, F.S., Seither, C., Warzecha, H., Oliveira, S.C., Giambartolomei, G.H. & Cassataro, J. (2011).** An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against *B. abortus* mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice. *PLoS one*, **6**, e16203.
- Pasquevich, K., García Samartino, C., Coria, L.M., Estein, S.M. & Zwerdling, A. (2010).** The protein moiety of *Brucella abortus* outer membrane protein 16 is a new bacterial pathogen-associated molecular pattern that activates dendritic cells in vivo, induces a Th1 immune response, and is a promising self-adjuvanting vaccine against sys. *The Journal of Immunology*, **184**, 5200–5212.
- Paulley, J.T., Anderson, E.S. & Roop, R.M. (2007).** *Brucella abortus* Requires the Heme Transporter BhuA for Maintenance of Chronic Infection in BALB/c Mice. *Infection and Immunity*, **75**, 5248–5254.
- 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., et al (2002).** The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 13148–53.
- Pei, J. & Ficht, T.A. (2004).** *Brucella abortus* rough mutants are cytopathic for macrophages in culture. *Infection and Immunity*, **72**, 440–450.
- Pei, J., Turse, J.E. & Ficht, T.A. (2008).** Evidence of *Brucella abortus* OPS dictating uptake and restricting NF-kappaB activation in murine macrophages. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, **10**, 582–90.
- Pei, J., Turse, J.E., Wu, Q. & Ficht, T.A. (2006).** *Brucella abortus* Rough Mutants Induce Macrophage Oncosis That Requires Bacterial Protein Synthesis and Direct Interaction with the Macrophage. *Infection and Immunity*, **74**, 2667–2675.
- Perry, M.B. & Bundle, D.R. (1990).** Antigenic relationships of the lipopolysaccharides of *Escherichia hermannii* strains with those of *Escherichia coli* O157:H7, *Brucella melitensis*, and *Brucella abortus*. *Infection and immunity*, **58**, 1391–5.
- Phillips, M., Pugh, G.W. & Deyoe, B.L. (1989).** Duration of strain 2308 infection and immunogenicity of *Brucella abortus* lipopolysaccharide in five strains of mice. *American journal of veterinary research*, **50**, 318–22.
- Picard-Hagen, N., Berthelot, X., Champion, J., Eon, L., Lyazrhi, F., Marois, M., Peglion, M., Schuster, A., Trouche, C. & Garin-Bastuji, B. (2015).** Contagious epididymitis due to *Brucella ovis*: relationship between sexual function, serology and bacterial shedding in semen. *BMC veterinary research*, **11**, 125.
- Pike, L.J. (2003).** Lipid rafts: bringing order to chaos. *The Journal of Lipid Research*, **44**, 655–667.
- Pizarro-Cerdá, J., Méresse, S., Parton, R.G., van der Goot, G., Sola-Landa, A., Lopez-Goñi, I., Moreno, E. & Gorvel, J.P. (1998a).** *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infection and immunity*, **66**, 5711–24.
- Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E. & Gorvel, J.-P. (2000).** Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. *Microbes and Infection*, **2**, 829–835.
- Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E., Sanguedolce, V., Mege, J.L. & Gorvel, J.P. (1998b).** Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infection and immunity*, **66**, 2387–92.
- Plommet, M. & Bosseray, N. (1984).** [Proposed general method of controlling the activity of brucella vaccines]. *Developments in biological standardization*, **56**, 247–55.
- Plommet, M. & Plommet, A.M. (1988).** Virulence of *Brucella*: bacterial growth and decline in mice. *Annales de recherches vétérinaires. Annals of veterinary research*, **19**, 65–7.
- Poester, F.P., Samartino, L.E. & Santos, R.L. (2013).** Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. *Revue Scientifique et Technique*, **32**, 105–115.
- Porte, F., Liautard, J.P. & Köhler, S. (1999).** Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infection and immunity*, **67**, 4041–7.
- Posadas, D., Martín, F., García, J., Spera, J., Delpino, M., Baldi, P., Campos, E., Cravero, S. & Zorreguieta, A. (2007).** The TolC homologue of *Brucella suis* is involved in resistance to antimicrobial compounds and virulence. *Infection and immunity*, **75**, 379–389.

- Posadas, D., Ruiz-Ranwez, V., Bonomi, H., Martín, F. & Zorreguieta, Á. (2012). BmaC, a novel autotransporter of *Brucella suis*, is involved in bacterial adhesion to host cells. *Cellular microbiology*, **14**, 965–982.
- Praud, A., Champion, J.-L., Corde, Y., Drapeau, A., Meyer, L. & Garin-Bastuji, B. (2012). Assessment of the diagnostic sensitivity and specificity of an indirect ELISA kit for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *BMC veterinary research*, **8**, 68.
- Pugsley, A.P. (1993). The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiological reviews*, **57**, 50–108.
- Qin, Q.-M., Pei, J., Ancona, V., Shaw, B.D., Ficht, T.A. & Figueiredo, P. de (2008). RNAi screen of endoplasmic reticulum-associated host factors reveals a role for IRE1 $\alpha$  in supporting *Brucella* replication. *PLoS Pathog*, **4**, 673–679.
- Quintana, F.J., Solomon, A., Cohen, I.R. & Nussbaum, G. (2008). Induction of IgG3 to LPS via Toll-Like Receptor 4 Co-Stimulation. *PLoS ONE*, **3**, e3509.
- Radhakrishnan, G.K., Yu, Q., Harms, J.S. & Splitter, G.A. (2009). Brucella TIR Domain-containing Protein Mimics Properties of the Toll-like Receptor Adaptor Protein TIRAP. *The Journal of biological chemistry*, **284**, 9892–8.
- Raetz, C.R.H., Reynolds, C.M., Trent, M.S. & Bishop, R.E. (2007). Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annual review of biochemistry*, **76**, 295–329.
- Ridler, A.L. & West, D.M. (2011). Control of *Brucella ovis* infection in sheep. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, **27**, 61–6.
- Ridler, A.L., West, D.M. & Collett, M.G. (2012). Pathology of *Brucella ovis* infection in red deer stags (*Cervus elaphus*). *New Zealand veterinary journal*, **60**, 146–9.
- Ridler, A.L., West, D.M., Stafford, K.J. & Wilson, P.R. (2006). Persistence, serodiagnosis and effects on semen characteristics of artificial *Brucella ovis* infection in red deer stags. *New Zealand veterinary journal*, **54**, 85–90.
- Ried, J.L. & 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.
- Riezu-Boj, J.I., Moriyón, I., Blasco, J.M., Marín, C.M. & Diaz, R. (1986). Comparison of lipopolysaccharide and outer membrane protein-lipopolysaccharide extracts in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection. *Journal of clinical microbiology*, **23**, 938–942.
- Riquelme-Neira, R., Retamal-Díaz, A., Acuña, F., Riquelme, P., Rivera, A., Sáez, D. & Oñate, A. (2013). Protective effect of a DNA vaccine containing an open reading frame with homology to an ABC-type transporter present in the genomic island 3 of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Vaccine*, **31**, 3663–7.
- Robles, C. (2008). Brucelosis en carneros por *Brucella ovis*. Grupo de de Salud Animal. Estación Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental Agropecuaria, Bariloche. Argentina.
- Rocha-Gracia, R., Castañeda-Roldán, E.I., Giono-Cerezo, S., Girón, J.A., Corbel, M.J., Enrigh, F.M., Anderson, T.D., Cheville, F.D., Detilleux, P.G., Deyoe, B.L., Cheville, N.F., Baldwin, C.L., Winter, A.J., Detilleux, P.G., Deyoe, B.L., Cheville, N.F., Pizarro-Cerdá, J., Méresse, S., Parton, R.G., Goot, F.G. van der, et al (2002). *Brucella sp.* bind to sialic acid residues on human and animal red blood cells. *FEMS microbiology letters*, **213**, 219–224.
- Roop, R., Gaines, J., Anderson, E., Caswell, C. & Martin, D. (2009). Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Medical microbiology and immunology*, **198**, 221–238.
- Roop, R.M. (2012). Metal acquisition and virulence in *Brucella*. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, **13**, 10–20.
- Roop, R.M. & Caswell, C.C. (2013). Bacterial Persistence: Finding the ‘Sweet Spot’. *Cell Host & Microbe*, **14**, 119–120.
- Roop, R.M., Robertson, G.T., Ferguson, G.P., Milford, L.E., Winkler, M.E. & 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. *Veterinary microbiology*, **90**, 349–63.
- Roset, M.S., Ciocchini, A.E., Ugalde, R.A. & Inon de Iannino, N. (2004). Molecular Cloning and Characterization of cgt, the *Brucella abortus* Cyclic -1,2-Glucan Transporter Gene, and Its Role in Virulence. *Infection and Immunity*, **72**, 2263–2271.
- Roset, M.S., Ciocchini, A.E., Ugalde, R.A. & Inon de Iannino, N. (2006). The *Brucella abortus* Cyclic -1,2-Glucan Virulence Factor Is Substituted with O-Ester-Linked Succinyl Residues. *Journal of Bacteriology*, **188**, 5003–5013.
- Roset, M.S., Ibañez, A.E., de Souza Filho, J.A., Spera, J.M., Minatel, L., Oliveira, S.C., Giambartolomei, G.H., Cassataro, J., Briones, G., Pappas, G., Papadimitriou, P., Christou, L., Akritidis, N., Andersen-Nissen, E., Smith, K., Strobe, K., Barrett, S., Cookson, B., Lapaque, N., Takeuchi, O., et al (2014). *Brucella* cyclic  $\beta$ -1,2-glucan plays a critical role in the induction of splenomegaly in mice. *PLoS ONE*, **9**, e101279.
- Ross, H.M., Foster, G., Reid, R.J., Jahans, K.L. & MacMillan, A.P. (1994). *Brucella* species infection in sea-mammals. *The Veterinary record*, **134**, 359.

- Rossetti, C.A., Drake, K.L. & Adams, L.G. (2012). Transcriptome analysis of HeLa cells response to *Brucella melitensis* infection: a molecular approach to understand the role of the mucosal epithelium in the onset of the *Brucella* pathogenesis. *Microbes and Infection*, **14**, 756–767.
- Rossetti, C.A., Drake, K.L., Siddavatam, P., Lawhon, S.D., Nunes, J.E.S., Gull, T., Khare, S., Everts, R.E., Lewin, H.A., Adams, L.G., Foster, G., Osterman, B., Godfroid, J., Jacques, I., Cloeckeaert, A., Scholz, H., Hubalek, Z., Sedlacek, I., Vergnaud, G., Tomaso, H., et al (2013). Systems Biology Analysis of *Brucella* Infected Peyer's Patch Reveals Rapid Invasion with Modest Transient Perturbations of the Host Transcriptome. *PLoS ONE*, **8**, e81719.
- Rouot, B., Alvarez-Martinez, M.-T., Marius, C., Menanteau, P., Guilloteau, L., Boigegrain, R.-A., Zumbihl, R., O'Callaghan, D., Domke, N. & Baron, C. (2003). Production of the type IV secretion system differs among *Brucella* species as revealed with VirB5- and VirB8-specific antisera. *Infection and immunity*, **71**, 1075–82.
- Ruiz-Ranwez, V., Posadas, D.M., Estein, S.M., Abdian, P.L., Martín, F.A. & Zorreguieta, A. (2013a). The BtaF trimeric autotransporter of *Brucella suis* is involved in attachment to various surfaces, resistance to serum and virulence. *PloS one*, **8**, e79770.
- Ruiz-Ranwez, V., Posadas, D.M., Van der Henst, C., Estein, S.M., Arocena, G.M., Abdian, P.L., Martín, F.A., Sieira, R., De Bolle, X. & Zorreguieta, A. (2013b). BtaE, an adhesin that belongs to the trimeric autotransporter family, is required for full virulence and defines a specific adhesive pole of *Brucella suis*. *Infection and immunity*, **81**, 996–1007.
- Sá, J.C., Silva, T.M.A., Costa, É.A., Silva, A.P.C., Tsolis, R.M., Paixão, T.A., Carvalho Neta, A. V. & Santos, R.L. (2012). The virB-encoded type IV secretion system is critical for establishment of infection and persistence of *Brucella ovis* infection in mice. *Veterinary Microbiology*, **159**, 130–140.
- Salas-Téllez, E., Núñez del Arco, A., Tenorio, V., Díaz-Aparicio, E., de la Garza, M. & Suárez-Güemes, F. (2005). Subcellular fractions of *Brucella ovis* distinctively induce the production of interleukin-2, interleukin-4, and interferon-gamma in mice. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire*. **69**, 53–7.
- Salcedo, S.P., Chevrier, N., Lacerda, T.L.S., Ben Amara, A., Gerart, S., Gorvel, V.A., de Chastellier, C., Blasco, J.M., Mege, J.-L. & Gorvel, J.-P. (2013a). Pathogenic brucellae replicate in human trophoblasts. *The Journal of infectious diseases*, **207**, 1075–83.
- Salcedo, S.P., Marchesini, M.I., Degos, C., Terwagne, M., Von Bargen, K., Lepidi, H., Herrmann, C.K., Santos Lacerda, T.L., Imbert, P.R.C., Pierre, P., Alexopoulou, L., Letesson, J.-J., Comerci, D.J. & Gorvel, J.-P. (2013b). BtpB, a novel *Brucella* TIR-containing effector protein with immune modulatory functions. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, **3**, 28.
- 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. & Gorvel, J.-P. (2008). *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. *PLoS pathogens*, **4**, e21.
- Salhi, I., Boigegrain, R.-A., Machold, J., Weise, C., Cloeckeaert, A. & Rouot, B. (2003). Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella spp.* *Infection and immunity*, **71**, 4326–4332.
- Sancho, P. (2014). Desarrollo de vacunas recombinantes específicas frente a infecciones producidas por *Brucella ovis*.
- Sancho, P., Tejedor, C., Sidhu-Muñoz, R.S., Fernández-Lago, L. & Vizcaíno, N. (2014). Evaluation in mice of *Brucella ovis* attenuated mutants for use as live vaccines against *B. ovis* infection. *Veterinary research*, **45**, 61.
- Sangari, F.J., Cayón, A.M., Seoane, A. & García-Lobo, J.M. (2010). *Brucella abortus* ure2 region contains an acid-activated urea transporter and a nickel transport system. *BMC microbiology*, **10**, 107.
- Sangari, F.J., Seoane, A., Rodríguez, M.C., Agüero, J. & Garcia Lobo, J.M. (2007). Characterization of the Urease Operon of *Brucella abortus* and Assessment of Its Role in Virulence of the Bacterium. *Infection and Immunity*, **75**, 774–780.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**, 5463–7.
- Santos, J.M., Verstrete, D.R., Perera, V.Y. & Winter, A.J. (1984). Outer membrane proteins from rough strains of four *Brucella* species. *Infection and immunity*, **46**, 188–94.
- Saraiva, M. & O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, **10**, 170–181.
- Sathiyaseelan, J., Goenka, R., Parent, M., Benson, R.M., Murphy, E.A., Fernandes, D.M., Foulkes, A.S. & Baldwin, C.L. (2006). Treatment of *Brucella*-susceptible mice with IL-12 increases primary and secondary immunity. *Cellular immunology*, **243**, 1–9.
- Saunders, V.F., Reddacliff, L.A., Berg, T. & Hornitzky, M. (2007). Multiplex PCR for the detection of *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni* in ram semen. *Australian veterinary journal*, **85**, 72–7; quiz 85.

- Scholz, H., Kämpfer, P. & Cloeckert, A. (2012). *Brucella*. Relationship to Other Alphaproteobacteria, Current Taxonomy and the Emergence of New Species: *Brucella: Molecular Microbiology and Genomics*. Editor por López-Goñi, I. & O'Callaghan, D. Horizon Bioscience. Norfolk, UK, 1–11.
- Scholz, H., Nöckler, K., Göllner, C., Bahn, P., Vergnaud, G., Tomaso, H., Dahouk, S., Kämpfer, P., Cloeckert, A., Maquart, M., Zygmunt, M., Whatmore, A., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H.-J. & Kumar, B. (2010). *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **60**, 801–808.
- Scholz, H.C., Hofer, E., Vergnaud, G., Le Fleche, P., Whatmore, A.M., Al Dahouk, S., Pfeffer, M., Krüger, M., Cloeckert, A. & Tomaso, H. (2009). Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, **9**, 153–156.
- Scholz, H.C., Hubalek, Z., Nesvadbova, J., Tomaso, H., Vergnaud, G., Le Flèche, P., Whatmore, A.M., Al Dahouk, S., Krüger, M., Lodri, C. & Pfeffer, M. (2008a). Isolation of *Brucella microti* from soil. *Emerging infectious diseases*, **14**, 1316–1317.
- Scholz, H.C., Hubalek, Z., Sedláček, I., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Melzer, F., Kämpfer, P., Neubauer, H., Cloeckert, A., Maquart, M., Zygmunt, M.S., Whatmore, A.M., Falsen, E., Bahn, P., Göllner, C., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H.-J. & Nöckler, K. (2008b). *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **58**, 375–82.
- Scholz, H.C., Revilla-Fernández, S., Al Dahouk, S., Hammerl, J.A., Zygmunt, M.S., Cloeckert, A., Koylass, M., Whatmore, A.M., Blom, J., Vergnaud, G., Witte, A., Aistleitner, K. & Hofer, E. (2016). *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **66**, 2090–8.
- Schurig, G.G., Sriranganathan, N. & Corbel, M.J. (2002). Brucellosis vaccines: past, present and future. *Veterinary microbiology*, **90**, 479–96.
- Scian, R., Barrionuevo, P., Rodriguez, A.M., Arriola Benitez, P.C., Garcia Samartino, C., Fossati, C.A., Giambartolomei, G.H. & Delpino, M. V. (2013). *Brucella abortus* invasion of synoviocytes inhibits apoptosis and induces bone resorption through RANKL expression. *Infection and Immunity*, **81**, 1940–1951.
- Sengupta, D., Koblansky, A., Gaines, J., Brown, T., West, A.P., Zhang, D., Nishikawa, T., Park, S.-G., Roop, R.M. & Ghosh, S. (2010). Subversion of innate immune responses by *Brucella* through the targeted degradation of the TLR signaling adapter, MAL. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **184**, 956–64.
- Sharif, M.N., Tassioulas, I., Hu, Y., Mecklenbräuker, I., Tarakhovskiy, A. & Ivashkiv, L.B. (2004). IFN-alpha priming results in a gain of proinflammatory function by IL-10: implications for systemic lupus erythematosus pathogenesis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **172**, 6476–81.
- Sidhu-Muñoz, R.S., Sancho, P. & Vizcaíno, N. (2016). *Brucella ovis* PA mutants for outer membrane proteins Omp10, Omp19, SP41, and BepC are not altered in their virulence and outer membrane properties. *Veterinary Microbiology*, **186**, 59–66.
- Sieira, R., Comerci, D.J., Sanchez, D.O. & Ugalde, R.A. (2000). A Homologue of an Operon Required for DNA Transfer in *Agrobacterium* Is Required in *Brucella abortus* for Virulence and Intracellular Multiplication. *Journal of Bacteriology*, **182**, 4849–4855.
- Silva, A., Macedo, A., Costa, L., Rocha, C., Garcia, L., Farias, J., Gomes, P., Teixeira, G., Fonseca, K., Maia, A., Neves, G., Romão, E., Silva, T., Mol, J., Oliveira, R., Araújo, M., Nascimento, E., Martins-Filho, O., Br, H., Brandão, H., et al (2015a). Encapsulated *Brucella ovis* lacking a putative ATP-Binding Cassette transporter ( $\Delta abcBA$ ) protects against wild type *Brucella ovis* in Rams. *PloS one*, **10**, e0136865.
- Silva, A., Macêdo, A., Silva, T., Ximenes, L., Br, H., Brandão, H., Paixão, T. & Santos, R. (2015b). Protection Provided by an Encapsulated Live Attenuated  $\Delta abcBA$  Strain of *Brucella ovis* against Experimental Challenge in a Murine Model. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, **22**, 789–797.
- Silva, A.P.C., Macêdo, A.A., Costa, L.F., Turchetti, A.P., Bull, V., Pessoa, M.S., Araújo, M.S.S., Nascimento, E.F., Martins-Filho, O.A., Paixão, T.A. & Santos, R.L. (2013a). *Brucella ovis* lacking a species-specific putative ATP-binding cassette transporter is attenuated but immunogenic in rams. *Veterinary Microbiology*, **167**, 546–553.
- Silva, T., Paixão, T., Costa, E., Xavier, M., Sá, J., Moustacas, V., Hartigh, A., Neta, A., Oliveira, S., Tsolis, R. & Santos, R. (2011a). Putative ATP-binding cassette transporter is essential for *Brucella ovis* pathogenesis in mice. *Infection and immunity*, **79**, 1706–1717.
- Silva, T.M.A., Costa, E.A., Paixão, T.A., Tsolis, R.M. & Santos, R.L. (2011b). Laboratory animal models for brucellosis research. *Journal of biomedicine & biotechnology*, **2011**, 518323.

- Simons, R.W., Houman, F. & Kleckner, N. (1987).** Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene*, **53**, 85–96.
- Skalsky, K., Yahav, D., Bishara, J., Pitlik, S., Leibovici, L. & Paul, M. (2008).** Treatment of human brucellosis: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ (Clinical research ed.)*, **336**, 701–4.
- Snapper, C.M., McIntyre, T.M., Mandler, R., Pecanha, L.M., Finkelman, F.D., Lees, A. & Mond, J.J. (1992).** Induction of IgG3 secretion by interferon gamma: a model for T cell-independent class switching in response to T cell-independent type 2 antigens. *The Journal of experimental medicine*, **175**, 1367–71.
- Snapper, C.M. & Paul, W.E. (1987).** B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **139**, 10–7.
- Snyder, G.A., Deredge, D., Waldhuber, A., Fresquez, T., Wilkins, D.Z., Smith, P.T., Durr, S., Cirl, C., Jiang, J., Jennings, W., Luchetti, T., Snyder, N., Sundberg, E.J., Wintrobe, P., Miethke, T. & Xiao, T.S. (2014).** Crystal structures of the Toll/Interleukin-1 receptor (TIR) domains from the *Brucella* protein TcpB and host adaptor TIRAP reveal mechanisms of molecular mimicry. *The Journal of biological chemistry*, **289**, 669–79.
- Sohlenkamp, C. & Geiger, O. (2016).** Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS microbiology reviews*, **40**, 133–159.
- Sola-Landa, A., Pizarro-Cerda, J., Grillo, M.-J., Moreno, E., Moriyon, I., Blasco, J.-M., Gorvel, J.-P. & Lopez-Goni, 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. *Molecular Microbiology*, **29**, 125–138.
- Soler-Lloréns, P., Yol, Gil-Ramírez, Y., Gil-Ramírez, A., Zabalza-Baranguá, A., Iriarte, M., Conde-Álvarez, R., Zúñiga-Ripa, A., Román, B., Zygmunt, M., Vizcaíno, N., Cloeckert, A., Grilló, M.-J., Moriyón, I. & López-Goni, I. (2014).** Mutants in the lipopolysaccharide of *Brucella ovis* are attenuated and protect against *B. ovis* infection in mice. *Veterinary research*, **45**, 72.
- de Souza Filho, J.A., de Paulo Martins, V., Campos, P.C., Alves-Silva, J., Santos, N. V, de Oliveira, F.S., Menezes, G.B., Azevedo, V., Cravero, S.L. & Oliveira, S.C. (2015).** Mutant *Brucella abortus* membrane fusogenic protein induces protection against challenge infection in mice. *Infection and immunity*, **83**, 1458–1464.
- Starr, T., Child, R., Wehrly, T.D., Hansen, B., Hwang, S., López-Otin, C., Virgin, H.W. & Celli, J. (2012).** Selective Subversion of Autophagy Complexes Facilitates Completion of the *Brucella* Intracellular Cycle. *Cell Host & Microbe*, **11**, 33–45.
- Starr, T., Ng, T.W., Wehrly, T.D., Knodler, L.A. & Celli, J. (2008).** *Brucella* Intracellular Replication Requires Trafficking Through the Late Endosomal/Lysosomal Compartment. *Traffic*, **9**, 678–694.
- Stoenner, H.G. & Lackman, D.B. (1957).** A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida* Thomas. *American journal of veterinary research*, **18**, 947–51.
- Suárez, C.E., Pacheco, G.A. & Vigliocco, A.M. (1991).** Immunochemical studies on a *Brucella ovis* specific protein antigen. *Veterinary microbiology*, **27**, 125–31.
- Sun, Y.-H., Rolán, H.G., den Hartigh, A.B., Sondervan, D. & Tsolis, R.M. (2005).** *Brucella abortus* virB12 is expressed during infection but is not an essential component of the type IV secretion system. *Infection and immunity*, **73**, 6048–54.
- Thanabalu, T., Koronakis, E., Hughes, C., Koronakis, V., Dinh, T., Paulsen, I., Saier, M., Duong, F., Eichler, J., Price, A., Leonard, M., Wickner, W., Felmlee, T., Welch, R., Gadsby, D., Nairn, A., Gentschev, I., Goebel, W., Gunderson, K., Kopito, R., et al (1998).** Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E.coli*: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *The EMBO Journal*, **17**, 6487–6496.
- Thiele, O.W. & Schwinn, G. (1973).** The free lipids of *Brucella melitensis* and *Bordetella pertussis*. *European journal of biochemistry / FEBS*, **34**, 333–44.
- Tibor, A., Decelle, B. & Letesson, J. (1999).** Outer membrane proteins Omp10, Omp16, and Omp19 of *Brucella spp.* are lipoproteins. *Infection and immunity*, **67**, 4960–4962.
- Tibor, A., Saman, E., Wergifosse, P., Cloeckert, A., Limet, J. & Letesson, J. (1996).** Molecular characterization, occurrence, and immunogenicity in infected sheep and cattle of two minor outer membrane proteins of *Brucella abortus*. *Infection and immunity*, **64**, 100–107.
- Tibor, A., Wansard, V., Bielartz, V., Delrue, R.M., Danese, I., Michel, P., Walravens, K., Godfroid, J. & Letesson, J.J. (2002).** Effect of omp10 or omp19 deletion on *Brucella abortus* outer membrane properties and virulence in mice. *Infection and immunity*, **70**, 5540–5546.
- Tibor, A., Weynants, V., Denoel, P., Lichtfouse, B., Bolle, X., Saman, E., Limet, J. & Letesson, J. (1994).** Molecular cloning, nucleotide sequence, and occurrence of a 16.5-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus* with similarity to pal lipoproteins. *Infection and immunity*, **62**, 3633–3639.

- Tiller, R. V, Gee, J.E., Lonsway, D.R., Gribble, S., Bell, S.C., Jennison, A. V, Bates, J., Coulter, C., Hoffmaster, A.R. & De, B.K. (2010). Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia. *BMC Microbiology*, **10**, 23.
- Tobias, L., Cordes, D.O. & Schurig, G.G. (1993). Placental pathology of the pregnant mouse inoculated with *Brucella abortus* strain 2308. *Veterinary pathology*, **30**, 119–29.
- Touzé, T., Eswaran, J., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C. & Koronakis, V. (2004). Interactions underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB-TolC multidrug efflux system. *Molecular Microbiology*, **53**, 697–706.
- Tsolis, R.M., Seshadri, R., Santos, R.L., Sangari, F.J., Lobo, J.M.G., 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. & Paulsen, I.T. (2009). Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. *PLoS one*, **4**, e5519.
- Ugalde, J.E., Czibener, C., Feldman, M.F. & Ugalde, R.A. (2000). Identification and characterization of the *Brucella abortus* phosphoglucosyltransferase gene: role of lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication. *Infection and immunity*, **68**, 5716–23.
- Valderas, M.W., Alcantara, R.B., Baumgartner, J.E., Bellaire, B.H., Robertson, G.T., Ng, W.-L., Richardson, J.M., Winkler, M.E. & Roop, R.M. (2005). Role of HdeA in acid resistance and virulence in *Brucella abortus* 2308.
- Velasco, J., Bengoechea, J.A., Brandenburg, K., Lindner, B., Seydel, U., González, D., Zähringer, U., Moreno, E. & Moriyón, I. (2000). *Brucella abortus* and its closest phylogenetic relative, *Ochrobactrum* spp., differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance. *Infection and immunity*, **68**, 3210–8.
- Vemulapalli, R., Cravero, S., Calvert, C.L., Toth, T.E., Sriranganathan, N., Boyle, S.M., Rossetti, O.L. & Schurig, G.G. (2000). Characterization of specific immune responses of mice inoculated with recombinant vaccinia virus expressing an 18-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, **7**, 114–118.
- Verger, J.M., Grayon, M., Zundel, E., Lechopier, P. & Olivier-Bernardin, V. (1995). Comparison of the efficacy of *Brucella suis* strain 2 and *Brucella melitensis* Rev. 1 live vaccines against a *Brucella melitensis* experimental infection in pregnant ewes. *Vaccine*, **13**, 191–6.
- Verger, J.M., Grimont, F., Grimont, P.A.D. & Grayon, M. (1985). *Brucella*, a Monospecific Genus as Shown by Deoxyribonucleic Acid Hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **35**, 292–295.
- Verstrete, D.R., Creasy, M.T., Caveney, N.T., Baldwin, C.L., Blab, M.W. & Winter, A.J. (1982). Outer membrane proteins of *Brucella abortus*: isolation and characterization. *Infection and immunity*, **35**, 979–989.
- Viadas, C., Rodríguez, M.C., Sangari, F.J., Gorvel, J.-P., García-Lobo, J.M. & López-Goñi, I. (2010). Transcriptome analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS two-component regulatory system. *PLoS ONE*, **5**, e10216.
- Vidal, S., Tremblay, M.L., Govoni, G., Gauthier, S., Sebastiani, G., Malo, D., Skamene, E., Olivier, M., Jothy, S. & Gros, P. (1995). The *Ity/Lsh/Bcg* locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. *The Journal of experimental medicine*, **182**, 655–66.
- Vieira, A.L.S., Silva, T.M.A., Mol, J.P.S., Oliveira, S.C., Santos, R.L. & Paixão, T.A. (2013). MyD88 and TLR9 are required for early control of *Brucella ovis* infection in mice. *Research in veterinary science*, **94**, 399–405.
- Vitry, M.-A., De Trez, C., Goriely, S., Dumoutier, L., Akira, S., Ryffel, B., Carlier, Y., Letesson, J.-J. & Muraille, E. (2012). Crucial role of gamma interferon-producing CD4+ Th1 cells but dispensable function of CD8+ T cell, B cell, Th2, and Th17 responses in the control of *Brucella melitensis* infection in mice. *Infection and immunity*, **80**, 4271–80.
- Vitry, M., Hanot-Mambres, D., De Trez, C., Akira, S., Ryffel, B., Letesson, J.-J. & Muraille, E. (2014). Humoral immunity and CD4+ Th1 cells are both necessary for a fully protective immune response upon secondary infection with *Brucella melitensis*. *The Journal of Immunology*, **192**, 3740–3752.
- 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 and infection / Institut Pasteur*, **6**, 821–834.
- Vizcaíno, N., Chordi, A. & Fernández-Lago, L. (1991). Characterization of smooth *Brucella* lipopolysaccharides and polysaccharides by monoclonal antibodies. *Research in microbiology*, **142**, 971–978.
- Vizcaíno, N. & Cloeckaert, A. (2012). Biology and Genetics of the *Brucella* Outer Membrane. *Brucella: Molecular Microbiology and Genomics*, 133–161.
- Vizcaíno, N., Cloeckaert, A., Dubray, G. & Zygmunt, M. (1996a). Cloning, nucleotide sequence, and expression of the gene coding for a ribosome releasing factor-homologous protein of *Brucella melitensis*. *Infection and immunity*, **64**, 4834–4837.

- Vizcaíno, N., Cloeckaert, A., Verger, J., Grayon, M. & Fernández-Lago, L. (2000). DNA polymorphism in the genus *Brucella*. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, **2**, 1089–1100.
- Vizcaíno, N., Cloeckaert, A., Zygmunt, M. & Dubray, G. (1996b). Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis omp31* gene coding for an immunogenic major outer membrane protein. *Infection and immunity*, **64**, 3744–3751.
- Vizcaíno, N., Cloeckaert, A., Zygmunt, M. & 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. *Infection and immunity*, **69**, 6738–6748.
- Vizcaíno, N., Kittelberger, R., Cloeckaert, A., Marín, C. & 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. *Infection and immunity*, **69**, 7020–7028.
- 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**, 1047–60.
- Walker, R.L., LeaMaster, B.R., Stellflug, J.N. & Biberstein, E.L. (1986). Association of age of ram with distribution of epididymal lesions and etiologic agent. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **188**, 393–6.
- Waring, W., Elberg, S., Schneider, P. & Green, W. (1953). The role of iron in the biology of *Brucella suis*. I. Growth and virulence. *Journal of bacteriology*, **66**, 82–91.
- Watanabe, K., Iwai, N., Tachibana, M., Furuoka, H., Suzuki, H. & Watarai, M. (2008). Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted (RANTES) contributes to abortion caused by *Brucella abortus* infection in pregnant mice. *The Journal of veterinary medical science*, **70**, 681–6.
- Watarai, M., Makino, S.-I., Fujii, Y., Okamoto, K. & Shirahata, T. (2002). Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cellular microbiology*, **4**, 341–55.
- Wattam, A., Foster, J., Mane, S., Beckstrom-Sternberg, S., Beckstrom-Sternberg, J., Dickerman, A., Keim, P., Pearson, T., Shukla, M., Ward, D., Williams, K., Sobral, B., Tsolis, R., Whatmore, A. & O'Callaghan, D. (2014). Comparative phylogenomics and evolution of the *Brucellae* reveal a path to virulence. *Journal of bacteriology*, **196**, 920–930.
- Wattam, A.R., Inzana, T.J., Williams, K.P., Mane, S.P., Shukla, M., Almeida, N.F., Dickerman, A.W., Mason, S., Moriyón, I., O'Callaghan, D., Whatmore, A.M., Sobral, B.W., Tiller, R. V., Hoffmaster, A.R., Frace, M.A., De Castro, C., Molinaro, A., Boyle, S.M., De, B.K. & Setubal, J.C. (2012). Comparative genomics of early-diverging *Brucella* strains reveals a novel lipopolysaccharide biosynthesis pathway. *mBio*, **3**, e00246-11.
- Wattam, A.R., Williams, K.P., Snyder, E.E., Almeida, N.F., Shukla, M., Dickerman, A.W., Crasta, O.R., Kenyon, R., Lu, J., Shallom, J.M., Yoo, H., Ficht, T.A., Tsolis, R.M., Munk, C., Tapia, R., Han, C.S., Detter, J.C., Bruce, D., Brettin, T.S., Sobral, B.W., et al (2009). Analysis of ten *Brucella* genomes reveals evidence for horizontal gene transfer despite a preferred intracellular lifestyle. *Journal of bacteriology*, **191**, 3569–79.
- Weiss, G. (2005). Modification of iron regulation by the inflammatory response. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, **18**, 183–201.
- de Wergifosse, P., Lintermans, P., Limet, J.N. & Cloeckaert, A. (1995). Cloning and nucleotide sequence of the gene coding for the major 25-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*. *Journal of bacteriology*, **177**, 1911–4.
- Whatmore, A., Davison, N., Cloeckaert, A., Dahouk, S., Zygmunt, M., Brew, S., Perrett, L., Koylass, M., Vergnaud, G., Quance, C., Scholz, H., Dick, E., Hubbard, G. & Schlabritz-Loutsevitch, N. (2014). *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **64**, 4120–4128.
- WHO (2006). Brucellosis in humans and animals. Editor por la Organización Mundial de la Salud.
- Winter, A. (1987). Outer membrane proteins of *Brucella*. *Annales de l'Institut Pasteur. Microbiology*, **138**, 87–89.
- Xavier, M., Paixão, T., Den Hartigh, A., Tsolis, R.M. & Santos, R.L. (2010a). Pathogenesis of *Brucella* spp. *The Open Veterinary Science Journal*, **4**, 109–118.
- Xavier, M.N., Silva, T.M.A., Costa, É.A., Paixão, T.A., Moustacas, V.S., Carvalho Júnior, C.A., Sant'Anna, F.M., Robles, C.A., Gouveia, A.M.G., Lage, A.P., Tsolis, R.M. & Santos, R.L. (2010b). Development and evaluation of a species-specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams.
- Xavier, M.N., Winter, M.G., Spees, A.M., den Hartigh, A.B., Nguyen, K., Roux, C.M., Silva, T.M.A., Atluri, V.L., Kerrinnes, T., Keestra, A.M., Monack, D.M., Luciw, P.A., Eigenheer, R.A., Bäumlner, A.J., Santos, R.L. & Tsolis, R.M. (2013a). PPAR $\gamma$ -mediated increase in glucose availability sustains chronic *Brucella abortus* infection in alternatively activated macrophages. *Cell host & microbe*, **14**, 159–70.

- Xavier, M.N., Winter, M.G., Spees, A.M., Nguyen, K., Atluri, V.L., Silva, T.M.A., Bäumlér, A.J., Müller, W., Santos, R.L. & Tsois, R.M. (2013b). CD4+ T cell-derived IL-10 promotes *Brucella abortus* persistence via modulation of macrophage function. *PLoS pathogens*, **9**, e1003454.
- Yao, J. & Rock, C.O. (2013). Phosphatidic acid synthesis in bacteria. *Biochimica et biophysica acta*, **1831**, 495–502.
- Yeh, Y.-C., Comolli, L.R., Downing, K.H., Shapiro, L. & McAdams, H.H. (2010). The caulobacter Tol-Pal complex is essential for outer membrane integrity and the positioning of a polar localization factor. *Journal of bacteriology*, **192**, 4847–58.
- Zhan, Y. & Cheers, C. (1995). Differential induction of macrophage-derived cytokines by live and dead intracellular bacteria in vitro. *Infection and immunity*, **63**, 720–3.
- Zhan, Y., Kelso, A. & Cheers, C. (1995). Differential activation of *Brucella*-reactive CD4+ T cells by *Brucella* infection or immunization with antigenic extracts. *Infection and immunity*, **63**, 969–75.
- Zhan, Y.F., Stanley, E.R. & Cheers, C. (1991). Prophylaxis or treatment of experimental brucellosis with interleukin-1. *Infection and immunity*, **59**, 1790–4.
- Zhang, K., Wang, H., Guo, F., Yuan, L., Zhang, W., Wang, Y. & Chen, C. (2016). OMP31 of *Brucella melitensis* 16M impairs the apoptosis of macrophages triggered by TNF- $\alpha$ . *Experimental and Therapeutic Medicine*, **12**.
- Zúñiga-Ripa, A., Barbier, T., Conde-Álvarez, R., Martínez-Gómez, E., Palacios-Chaves, L., Gil-Ramírez, Y., Grilló, M., Letesson, J.J., Iriarte, M. & Moriyón, I. (2014). *Brucella abortus* depends on pyruvate phosphate dikinase and malic enzyme but not on Fbp and GlpX fructose-1,6-bisphosphatases for full virulence in laboratory models. *Journal of bacteriology*, 1–13.
- Zwerdling, A., Delpino, M.V., Barrionuevo, P., Cassataro, J., Pasquevich, K.A., García Samartino, C., Fossati, C.A. & Giambartolomei, G.H. (2008). *Brucella* lipoproteins mimic dendritic cell maturation induced by *Brucella abortus*. *Microbes and Infection*, **10**, 1346–1354.
- Zygmunt, M., Cloeckert, A. & Dubray, G. (1994). *Brucella melitensis* cell envelope protein and lipopolysaccharide epitopes involved in humoral immune responses of naturally and experimentally infected sheep. *Journal of clinical microbiology*, **32**, 2514–2522.
- Zygmunt, M.S., Dubray, G., Bundle, D.R. & Perry, M.P. (1998). Purified native haptens of *Brucella abortus* B19 and *B. melitensis* 16M reveal the lipopolysaccharide origin of the antigens. *Annales de l'Institut Pasteur. Microbiology*, **139**, 421–433.
- Zygmunt, M.S., Hagiús, S.D., Walker, J. V. & Elzer, P.H. (2006). Identification of *Brucella melitensis* 16M genes required for bacterial survival in the caprine host. *Microbes and Infection*, **8**, 2849–2854.
- Zygmunt, M.S., Jacques, I., Bernardet, N. & Cloeckert, A. (2012). Lipopolysaccharide heterogeneity in the atypical group of novel emerging *Brucella* species. *Clinical and Vaccine Immunology*, **19**, 1370–1373.

# Apéndice



<b>ABC</b>	Transportador de la familia ABC ( <i>ATP binding cassette</i> )
<b>Amp</b>	Ampicilina
<b>BCCN</b>	Colección de cultivos de <i>Brucella</i> de Nouzilly ( <i>Brucella Culture Collection of Nouzilly</i> )
<b>BCV</b>	Vacuola portadora de <i>Brucella</i> ( <i>Brucella-Containing vacuole</i> )
<b>BrEt</b>	Brumuro de etidio
<b>CβGs</b>	Glucanos cíclicos ( <i>Cyclic β Glucans</i> )
<b>CDs</b>	Células Dendríticas
<b>CPAs</b>	Células Presentadoras de Antígeno
<b>CV</b>	Cristal Violeta
<b>DAPI</b>	4',6-diamino-2-fenilindol
<b>DE</b>	Desviación Estándar
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado por Dulbecco ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DO</b>	Densidad Óptica
<b>ERES</b>	Dominios de salida del retículo endoplásmico ( <i>Endoplasmic Reticulum Exit Sites</i> )
<b>Estrep</b>	Estreptomina
<b>FBS</b>	Suero bovino fetal ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
<b>HS</b>	Suero de caballo ( <i>Horse serum</i> )
<b>i-ELISA</b>	Enzimoimmunoanálisis Indirecto ( <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IP</b>	Intraperitoneal
<b>IP</b>	Intraperitoneal
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
<b>IV</b>	Intravenosa
<b>Kan</b>	Kanamicina
<b>KO</b>	<i>Knock Out</i>
<b>Lamp-1</b>	Proteína de membrana asociada a lisosomas ( <i>Lysosomal-Associated Membrane Protein 1</i> )
<b>LB</b>	Medio Luria Bertani
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MAbs</b>	Anticuerpos monoclonales
<b>ME</b>	Membrana Externa
<b>MFP</b>	Proteína de fusión de membrana ( <i>Membrane Fusion Protein</i> )
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
<b>MI</b>	Membrana Interna
<b>OIE</b>	Organización Mundial de la Salud Animal ( <i>World Organisation for Animal Health</i> )
<b>Omps</b>	Proteínas de membrana externa ( <i>Outer membrane proteins</i> )
<b>p.i.</b>	Post-inoculación
<b>p.vac.</b>	Post-vacunación

<b>p/v</b>	Relación peso/volumen
<b>PAL</b>	Proteína Asociada al Peptidoglucano ( <i>Peptidoglycan-Associated Lipoprotein</i> )
<b>PAMP</b>	Patrones Moleculares Asociados a Patógeno ( <i>Pathogen-associated molecular patterns</i> )
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PG</b>	Peptidoglucano
<b>PL</b>	Fosfolípidos ( <i>Phospholipids</i> )
<b>PLSD</b>	Test estadístico de mínimas diferencias protegidas de Fisher
<b>PRR</b>	Receptor de reconocimiento de patrones ( <i>Pattern recognition receptors</i> )
<b>R-LPS</b>	Lipopolisacárido rugoso ( <i>Rough-Lipopolysaccharide</i> )
<b>RND</b>	Bombas de expulsión de la familia Resistencia-Nodulación-División Celular ( <i>Resistance-Nodulation-Division</i> )
<b>RT</b>	Retro Transcriptasa
<b>Sac</b>	Sacarosa
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>S-LPS</b>	Lipopolisacárido liso ( <i>Smooth-Lipopolysaccharide</i> )
<b>SOC</b>	Caldo de cultivo rico ( <i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i> )
<b>T4SS</b>	Sistema de Secreción Tipo IV ( <i>Type IV Secretion System</i> )
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$ ( <i>Tumor necrosis factor alpha</i> )
<b>TSA</b>	Agar Trypticaseína de Soja ( <i>Trypticasein Soy Agar</i> )
<b>TSB</b>	Caldo Trypticaseína de Soja ( <i>Trypticasein Soy Broth</i> )
<b>VVA</b>	Vacuna/s viva/s atenuada/s
<b>WHO</b>	Organización Mundial de la Salud ( <i>World Health Organization</i> )
<b>WM</b>	Marcador de peso molecular ( <i>Molecular Weight Marker</i> )
<b>X-Gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido
<b>YE</b>	Extracto de Levadura ( <i>Yeast Extract</i> )