

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Papel de la proteína Amp160 en la invasión y vida intracelular de *Brucella abortus*

2308 Wisconsin

**Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de
Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología para optar
al grado y título de Maestría Académica en Microbiología**

CÉSAR FRANCISCO JIMÉNEZ ROJAS

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2019

Dedicatoria y agradecimientos

Le dedico este proyecto a mi familia, especialmente a mis padres y sobrinas.

Un agradecimiento especial para la familia del PIET, quienes me abrieron las puertas para alcanzar este título, así como a las personas del CIET en donde también se realizó parte del trabajo por su apoyo.

Un agradecimiento a mis compañeras: Amanda, Naza, Olga, Eunice, Lisa y especialmente a Pame por toda la ayuda y el apoyo durante todos los años de realización de la tesis.

Un agradecimiento a Chac por su ayuda con el análisis de los perfiles de ácidos grasos, a Elías por sus contribuciones con el diseño de la infección en ratones así como las pruebas bioquímicas hechas con las cepas generadas en este estudio. Otro agradecimiento a Ricardo por su ayuda con las infecciones de neutrófilos y a Cristina por su colaboración en la infección de los ratones. A David por su ayuda con la purificación de DUF490 Además, a Marcela por su ayuda con la realización de los análisis bioinformáticos.

Un profundo agradecimiento a Doña Daphne, Rey y Don Fernando por tanta ayuda proporcionada con los materiales y técnicas en el laboratorio.

Gracias al apoyo económico brindado por NeTropica, la UCR y Fondos del Sistema del Consejo Nacional de Rectores, en el marco del proyecto “Descifrando la especificidad de hospedero de las bacterias del género *Brucella* la UNA, el ITCR y UCR dentro del Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales (PIET) de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, Costa Rica


“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología”



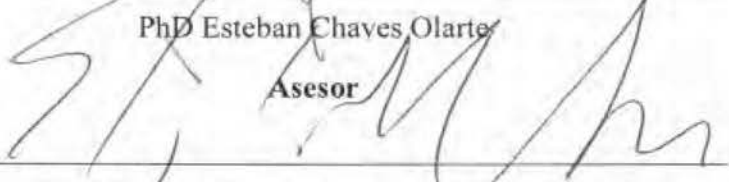
PhD Elias Barquero Calvo
Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado



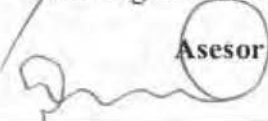
PhD Caterina Guzmán Verri
Directora de Tesis



PhD Esteban Chaves Olarte
Asesor



PhD Edgardo Moreno Robles
Asesor



PhD César Rodríguez Sánchez
Director

Programa de Posgrado en Microbiología



César Francisco Jiménez Rojas
Candidato

Índice

Dedicatoria y agradecimientos	ii
Carta de Aprobación	iii
Resumen.....	vi
Lista de abreviaturas.....	vii
Índice de figuras	viii
Índice de cuadros.....	ix
Anexos	x
1. Antecedentes.....	1
1.1. Generalidades de la Brucelosis	1
1.2. El papel de BAW_10046 en la patogénesis de especies de <i>Brucella</i>	2
1.3 BAW_10046 y su relación con el sistema de dos componentes BvrR/BvrS de <i>Brucella abortus</i> 2308W	4
1.4 El producto de BAW_10046 codifica por la proteína Amp160.....	5
2 Pregunta.....	7
3 Hipótesis.....	7
4 Objetivos	7
5 Materiales y métodos	8
5.1. Cepas bacterianas y sus condiciones de cultivo	8
5.2. Evaluación del perfil de fermentación de carbohidratos mediante API 50CH.....	8
5.3. Electroporación	9
5.4 Ensayos de concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por microdilución para polimixina B.	10
5.5. Purificación de ADN genómico	11
5.6. Generación de la mutante <i>B. abortus</i> 2308W en <i>amp160</i>	11
5.7. Conjugación del plásmido pJQKm en <i>Brucella abortus</i> 2308W.....	20
5.8 Complementación de la cepa mutante con el locus BAW_10046.	20
5.9 Secuenciación de productos de PCR	21
5.10. Reacciones de recombinación con el sistema LR Clonase™ II de Gateway.....	22
5.11. Southern Blot	22
5.12. Generación de un anticuerpo contra el dominio DUF490 de Amp160	25
5.13. Western Blot.....	28
5.14. Evaluación del LPS	28
5.15. Extracción y análisis de ácidos grasos bacterianos	30

5.17. Ensayo de supervivencia en neutrófilos humanos.....	32
5.18. Ensayo de adhesión en células HeLa.....	33
5.19. Infección de macrófagos y células HeLa.....	34
5.20. Inmunofluorescencia Simple.....	35
5.21. Inmunofluorescencia doble.....	36
5.22. Obtención de bacterias intracelulares.....	37
5.23. Infecciones en ratones.....	37
5.24 Permiso para el uso de animales.....	38
5.25 Análisis estadísticos.....	38
6 Resultados.....	39
6.1. Verificación y caracterización de una mutante en el gen <i>amp160</i> de <i>Brucella abortus</i> 2308W.....	39
6.2 <i>B. abortus</i> 2308W Δ Amp160 no expresa la proteína Amp160.....	41
6.2. La mutante de Amp160 presenta un LPS liso.....	43
6.3 La mutante de Amp160 no presenta deficiencias de crecimiento <i>in vitro</i>	45
6.4 El perfil de fermentación de la cepa mutante permanece invariable.....	46
6.5 Perfil de ácidos grasos de membrana.....	46
6.6. Caracterización de la membrana externa.....	47
6.6.1. Sensibilidad a los péptidos catiónicos.....	47
6.6.2. Sensibilidad al complemento.....	48
6.6.3. La expresión de las principales proteínas de membrana externa no se afecta significativamente en ausencia de Amp160.....	49
6.7. La ausencia de Amp160 no afecta la sobrevivencia de <i>B. abortus</i> en neutrófilos humanos.....	50
6.8 La ausencia de Amp160 no afecta la adhesión a células HeLa de <i>B. abortus</i>	52
6.9 La replicación intracelular en células HeLa y macrófagos Raw de <i>B. abortus</i> no se altera en ausencia de Amp160.....	54
6.10. Los mutantes de <i>B. abortus</i> 2308W en Amp160 son atenuados en ratones.....	56
7. Discusión.....	58
8. Conclusiones.....	61
9. Referencias.....	62
10. Anexos.....	67

Resumen

Brucella abortus es un patógeno intracelular capaz de infectar animales y humanos generando infecciones crónicas severas. La virulencia de esta bacteria se basa, entre otros factores, en su capacidad para modificar el perfil de proteínas de la envoltura celular como respuesta a las condiciones que enfrenta durante la infección. Las brucelas fagocitadas por macrófagos sobre expresan una proteína codificada por el locus BAW_10046 de *Brucella abortus* 2308W tres horas después de la internalización manteniéndose la sobreexpresión elevada alrededor de 20 veces 44 horas después de la infección. El propósito de este trabajo fue conocer si esta proteína tiene algún papel en la patogénesis de *B. abortus* 2308W. El análisis de las principales características estructurales de esta proteína, reveló que tiene un peso aproximado de 160 kD y que de acuerdo a sus dominios se asocia a la membrana celular por lo que se le llamó Amp160 (Associated membrane protein 160 kD). Se generó una mutante por delección del gen BAW_10046 codificante de Amp160 en *B. abortus* 2308 Wisconsin, el mutante no mostró diferencias significativas con respecto a la bacteria parental en las pruebas de metabolismo, tasa de crecimiento, expresión de proteínas de membrana externa, resistencia a péptidos catiónicos, complemento, sobrevivencia en neutrófilos, macrófagos y células HeLa, . Sin embargo, cuando se probó la replicación en ratones el mutante mostró una reducción de la sobrevivencia significativa. El conocimiento de brucelas mutantes que no muestran fenotipo en experimentos *in vitro* y *ex vivo*, pero que son atenuadas *in vivo* son valiosos para entender los mecanismos de virulencia, además que son candidatos potenciales para desarrollar vacunas.

Lista de abreviaturas

Amp: Associated Membrane Protein

Amp^r: Resistencia a Ampicilina

ADN: Ácido Desoxirribo Nucléico

Cm^r: Resistencia a Cloranfenicol

DUF: Dominio de Función Desconocida (Domain of Unknown Fuction)

DIG: Digoxigenina

Kan^r: Resistencia a la Kanamicina

SPC^r: Resistencia a la Espectenomicina (Spectinomycin)

MPM: Marcador de Peso Molecular

pb: Pares de Bases

WB: Western Blot

SB: Southern Blot

Δ: Mutante

CTS: Caldo Trypticasa Soya

CLB: Caldo Luria Bertani

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

MOI: Multiplicity of Infection

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

Índice de figuras

Figura 1: Representación gráfica del alineamiento de amp160 en genomas representativos

Figura 2: Representación de la estrategia para generar una mutante por delección de la proteína Amp160 de *Brucella abortus* 2308W.

Figura 3: Estrategia metodológica para la generación de un anticuerpo policlonal contra el dominio de función desconocida DUF490 de la proteína Amp160.

Figura 4: Southern Blot con la sonda F1-R2.

Figura 5: Secuenciación de fragmentos de ADN de las cepas *Brucella abortus* 2308W (WT) Revertida Salvaje (Rev34) y Mutante de Amp160 (Δ Amp160).

Figura 6: SDS Page péptido DUF490 de Amp160

Figura 7: Western Blot evidenciando la proteína Amp160 a partir de lisados de bacterias tras 4 horas vida intracelular.

Figura 8: Tinción de plata del LPS de las cepas estudiadas

Figura 9: Dinámica de replicación de las cepas de *Brucella abortus* 2308W en medio CTS.

Figura 10: Perfil de expresión de ácidos grasos de las diferentes cepas evaluadas.

Figura 11: Sensibilidad de las diferentes cepas evaluadas a la Polimixina B.

Figura 12: Sensibilidad de las cepas estudiadas a la actividad lítica del complemento.

Figura 13: Expresión de las proteínas de membrana externa de las cepas ensayadas.

Figura 14: Supervivencia de las diferentes cepas de *Brucella* a la acción lítica de neutrófilos humanos.

Figura 15: Ensayo de adhesión bacteriana de las cepas en estudio a la superficie de células HeLa.

Figura 16: Ensayo de adhesión competitivo en células HeLa.

Figura 17: Dinámica de replicación de las diferentes cepas evaluadas en células Hela (A) y macrófagos RAW (B).

Figura 18: Dinámica de replicación de las cepas en estudio en ratones BALB/c.

Índice de cuadros

Cuadro 1: Parámetros necesarios para configurar el electroporador BTX™ USA modelo ECM630 para transformar con plásmidos bacterias electrocompetentes.

Cuadro 2: Cepas y plásmidos utilizados para la realización de este estudio.

Cuadro 3: Cebadores utilizados en construcciones y generación del péptido DUF490 y complementación de la cepa mutante.

Cuadro 4: Cebadores utilizados en la verificación de la orientación de los insertos en los vectores.

Anexos

Anexo 1: Perfil de fermentación de carbohidratos de las cepas en estudio.

Anexo 2: Mapa del plásmido pCR2.1 utilizado en la construcción de la mutante en el gen *amp160*.

Anexo 3: Mapa del vector suicida pJQKm utilizado en la construcción de la mutante en el gen *amp160*.

Anexo 4: Mapa del vector de entrada pCR8TOPO@TA utilizado en la creación del péptido DUF490 y complementación de la mutante de Amp160

Anexo 5: Mapa del vector de destino pDEST™17 utilizado en la generación del péptido DUF490 marcado con Histidina.

Anexo 6: Mapa del vector de destino pRH002 utilizado en la complementación de la mutante en Amp160 con el gen BAW_10046 de *Brucella abortus* 2308W.

Anexo 7: Permiso para la experimentación con animales.

1. Antecedentes

1.1. Generalidades de la Brucelosis

La brucelosis es una enfermedad zoonótica, producida por bacterias del género *Brucella*, las cuales presentan una amplia distribución a nivel mundial y son causantes de pérdidas económicas importantes pues afectan a los animales de producción. Estas bacterias colonizan principalmente el sistema reproductor en sus hospederos primarios (Moreno y Moriyón, 2006).

Las brucelas son agentes que tienen un gran potencial para infectar animales domésticos que están en estrecho contacto con los humanos. Tienen gran impacto en salud pública, ya que en humanos, genera cuadros febriles y algunas complicaciones como artritis y sacroileítis (Moreno y Moriyón, 2002; Moreno y Moriyón, 2006). Las especies del género *Brucella* están incluso presentes en ambientes silvestres, afectando a roedores y a mamíferos marinos (Ko et al., 2003).

Estas bacterias son cocobacilos intracelulares, extracelulares facultativos, aeróbicos, Gram-negativos pertenecientes a la clase Alfa 2 proteobacterias. Cuando estas bacterias invaden las mucosas son fagocitadas por células dendríticas y macrófagos como parte de la inmunidad innata. Sin embargo, una vez dentro de estas células, las bacterias son capaces de sobrevivir en células dendríticas y macrófagos ya que pueden multiplicarse manipulando el tráfico intracelular de manera que evitan la fusión con los lisosomas (Celli *et al.*, 2003; Pizarro-Cerda et al., 1998). Una vez dentro de los fagocitos, las brucelas pueden distribuirse por los linfáticos a los ganglios regionales, pasando luego al torrente sanguíneo, con lo que se desarrolla una bacteremia y la diseminación del patógeno en todo el

hospedero (Edmonds *et al.*, 2001). A pesar de la diseminación sistémica, las bacterias presentan tropismo por los órganos del tracto reproductivo y la glándula mamaria (Alexander *et al.*, 1981; Moreno y Moriyón, 2006).

Muchos de los mecanismos que tienen las brucelas para invadir y replicarse en las células no se comprenden. El análisis genómico de las especies de brucelas revela que no poseen factores de virulencia clásicos tales como toxinas, plásmidos, cápsulas y adhesinas (Delrue *et al.*, 2005). Así sus verdaderos factores de virulencia son aquellos que le ayudan a evadir la respuesta inmune, invadir las células del hospedero, modificar el medio intracelular y alcanzar su nicho replicativo. Entre los factores de virulencia están el lipopolisacárido (LPS), conjuntamente con sistemas de secreción de molécula como el sistema de secreción tipo IV, factores de transcripción como lo es VjbR, entre otros (Gorvel y Moreno, 2002; Lapaque *et al.*, 2005; Caro-Hernández *et al.*, 2007).

1.2. El papel de BAW_10046 en la patogénesis de especies de *Brucella*

Al evaluar el perfil de proteínas expresadas por *Brucella abortus* 2308W dentro de macrófagos se observó que una proteína en particular de peso molecular cerca de 160000 daltons, presentó un aumento en su expresión a las tres horas de 80 veces o más. A las 20 horas posinfección los niveles de esta proteína se mantenían elevados, aunque había disminuido unas 20 veces respecto al punto anterior. Después de 44 horas, aún se mantenía elevada cerca de 10 veces con respecto a la referencia extracelular. La proteína se le llamó Amp160 y se identificó como Bab1_0046, la cual corresponde a BAW_10046 en *B. abortus* 2308W (Lamontagne *et al.*, 2009). En el año 2006 Wu y

colaboradores (Wu et al., 2006) realizaron un experimento en *Brucella melitensis* que consistía en la inactivación aleatoria mediante transposición de genes con el propósito de identificar mecanismos asociados a virulencia y sobrevivencia de *Brucella*. Para evaluar el efecto de las transposiciones se realizaron infecciones y ensayos de supervivencia en ratones. Una de las mutantes que tenía una interrupción en el gen BMI1894, tenía un radio de sobrevivencia en macrófagos de 1.5 y en ratones de 0.9. Al realizar un análisis de la secuencia de aminoácidos de dicho gen mencionado y compararlo contra el genoma de *Brucella abortus* 2308W, se observó que su producto presenta 100% de identidad con los residuos de aminoácidos codificados por BAW_10046 (Wu et al, 2006). De Bolle y colaboradores (2018) generaron una librería de mutantes mediante transposición de alta saturación con un sistema Kan^R::mini-Tn5. Una de las mutantes no presentaba desviaciones en el crecimiento *in vitro*, tampoco mostraba disminución de replicación a 2 y 5 horas de infección en macrófagos. Sin embargo, se observó que a las 24 horas postinfección había una disminución en el número total de bacterias. Esta mutante tiene el locus BAW_10046 interrumpido. Del mismo modo, este efecto se observó en la mutante que tiene interrumpido el locus corriente arriba al gen anteriormente mencionado BAW_10045. Según los autores estos dos genes corresponden a un operon y juntos constituyen un sistema de secreción tipo V pues se encargan de la secreción de proteínas de membrana. Una mutante de *B. canis* bcanCR12 por delección en el gen que codifica por Amp160 fue evaluada como candidato para una cepa vacunal. La cinética de crecimiento *in vitro* de este mutante en medio CTS, el perfil de resistencia a la polimixina B, la replicación en células HeLa y en macrófagos RAW 264.7 no tuvieron diferencia alguna comparada con la cepa parental silvestre. Sin embargo, al realizar una curva de replicación esplénica en ratones, se observó que la deficiencia de la proteína Amp160 en

el mutante de *B. canis* produce un fenotipo de atenuación *in vivo*, el cual se observó como un menor número de UFC a las 3 semanas y 9 semanas postinfección (Bermúdez-Espinoza, comunicación personal).

1.3 BAW_10046 y su relación con el sistema de dos componentes BvrR/BvrS de *Brucella abortus* 2308W

Brucella abortus tiene la capacidad de modular su expresión génica en respuesta a los diferentes ambientes a los que es expuesta a lo largo de la infección. Es debido a esta modulación que la bacteria tiene la capacidad de realizar un remodelamiento reversible en la composición de su envoltura celular, además, presenta adaptaciones fisiológicas que responden a los diversos microambientes encontrados durante la vida intracelular (Lamontagne et al., 2009). Estas respuestas adaptativas están bajo el control de sistemas de dos componentes (TCS, conocido así por sus siglas en el idioma inglés). Dentro de los posibles 15 TCSs codificados en el genoma de *B. abortus* 2308 (Lavín et al., 2010) el sistema BvrR/BvrS es el mejor estudiado. El TCS BvrR/BvrS es un sistema similar al encontrado en patógenos y endosimbiontes de plantas del grupo alfa-2 proteobacterias como *Agrobacterium tumefaciens* y *Sinorhizobium meliloti*. En estas dos especies los sistema ortólogos a BvrR/BvrS tienen un papel muy importante en el control de la transición de la vida extracelular a la intracelular, modulando la fisiología de la bacteria ante el cambio de hábitat (Lamontagne et al., 2007; Viadas et al., 2010).

Existe evidencia que la expresión de BAW_10046 está regulada por el sistema de dos componentes BvrR/BvrS de *Brucella abortus* 2308W (Castillo-Zeledón, comunicación personal) ya que hay una interacción entre la región corriente arriba del gen *amp160* y la

proteína BvrR fosforilada (BvrR-P). Aunque no hay interacción de la proteína BvrR-P con la sonda sin desnaturalizar, tras aplicar calor y desnaturalizarla se observó la unión con la BvrR-P. Lo anterior sugiere que es necesaria una pérdida de la topología del ADN para que se dé la interacción de la proteína BvrR-P con la región reguladora del locus BAW_10046 (Castillo- Zeledón, datos sin publicar). Existe evidencia indirecta que sugiere que este gen se encuentra bajo el control del sistema de dos componentes BvrR/BvrS. Esto es debido a que hay un aumento en la expresión de la Amp160 al analizar las vesículas de membrana externa (Blebs) de una cepa de *B. abortus* 2308 portadora de un plásmido que expresa BvrR de manera constitutiva (Lamontagne *et al.*, 2007).

1.4 El producto de BAW_10046 codifica por la proteína Amp160

El análisis bioinformático muestra que esta proteína de 1515 residuos de aminoácidos posee un 100% de cobertura con una familia de proteínas del grupo OMP85 conocidas como TamB (Translocation and Assembly Module B) (Blastp, 2019). Debido a que esta proteína en *B. abortus* 2308W pesa alrededor de 160 kD y se encuentra asociada a la membrana interna se le llamó Amp160. Esta proteína está ampliamente distribuida con su característico dominio en su extremo carbonilo terminal, el cual se llama DUF490. Otros investigadores plantean que Amp160 posee similitudes con proteínas como AsmA y otros grupos que contienen los dominios DUF748 y DUF3971 y establecen que esta proteína está ampliamente distribuida entre bacterias Gram negativas (Selkrig *et al.*, 2012).

Al analizar la variabilidad del gen *amp160* locus BAW_10046, contra *B. suis* st. 1330 se observa que a pesar su dimensión (casi 5000 pares de bases) tan sólo hay 7 sitios variables (posiciones 654, 1331, 1405, 1425, 3324, 3361 y 4228) siendo estas regiones conservadas

dentro de la misma especie (ver Figura 1), este hecho sugiere que en términos generales esta proteína es conservada.

Al analizar el gen BAW_10045, el cual está corriente arriba de la Amp160, se observa que éste presenta homología del 100% por TamA la cual es otro integrante de la misma familia al que pertenece Amp160 (Blastp, 2019), lo que podría sugerir que estos dos genes conforman un operon como se reporta en la literatura en otras especies bacterianas (Selkrig et al., 2012).

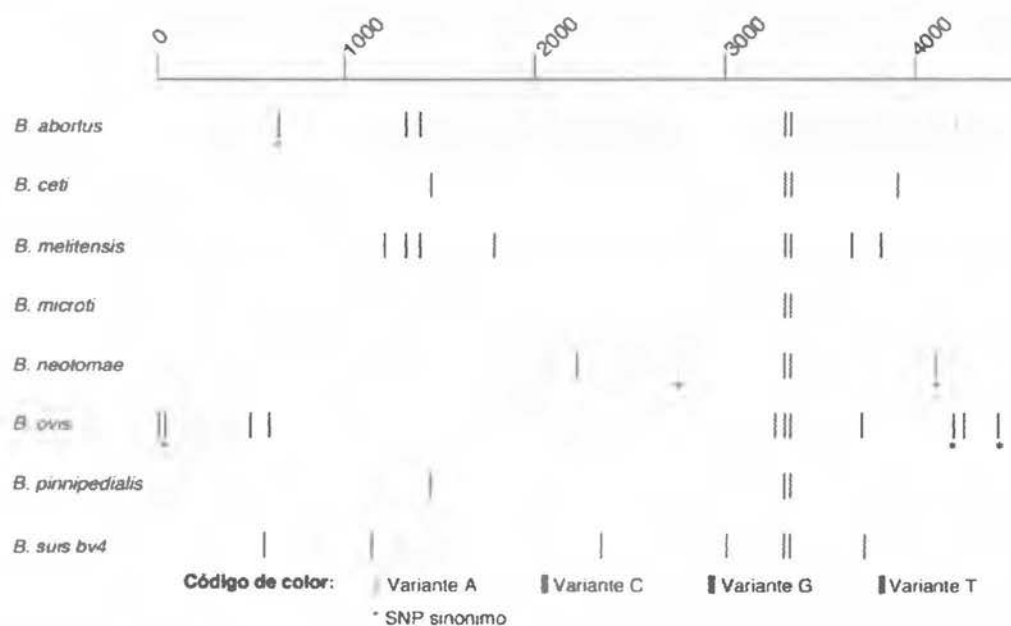


Figura 1: Representación gráfica del alineamiento de *amp160* en genomas representativos. Las secuencias fueron alineadas con el locus BR0049 que codifica Amp160 en *B. suis* st. 1330. La línea superior indica las coordenadas aproximadas del alineamiento en pares de bases. El esquema de color es el siguiente: variante A= verde, variante G= azul, variante T= negro, variante C= rojo.

2 Pregunta

¿Afecta la proteína Amp160 la capacidad de *Brucella abortus* 2308W para replicarse en células e inducir virulencia en ratones?

3 Hipótesis

La mutante de *Brucella abortus* 2308W carente de *amp160* es atenuada porque es menos eficiente en la invasión y tráfico intracelular.

4 Objetivos

4.1. Objetivo General:

- Determinar el papel que tiene la proteína Amp160 en la virulencia de *B. abortus* 2308W.

4.2. Objetivos específicos:

- Determinar las características fenotípicas y el perfil de crecimiento del mutante de *B. abortus* Amp160.
- Caracterizar la capacidad de invasión y sobrevivencia intracelular de la mutante *B. abortus amp160* mediante modelos de infección de células *in vitro*.
- Caracterizar el grado de virulencia de la mutante *B. abortus amp160* mediante modelos de infección *in vivo* en un modelo murino.

5 Materiales y métodos

5.1. Cepas bacterianas y sus condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas que se utilizaron en este estudio están enlistadas en el Cuadro 2.

Las cepas *B. abortus* 2308 Wisconsin, *B. canis* 206-10 (bcanCR12), *B. neotomae* 5K33 y de *Escherichia coli* S117, *E. coli* Top10 y *E. coli* Match, BL21AI fueron facilitadas por el Laboratorio de Bioquímica de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional. Las cepa *B. abortus* 2308 Wisconsin, *B. canis* 206-10 y *B. neotomae* 5k33 fueron mantenidas a -70°C y crecidas a 37°C en caldo tripticasa soya (CTS, Difco™) en agitación (250 rpm) durante 24 horas. Los plásmidos pDest17 y pRH002, pCR®8/GW/TOPO® pJQKm, y así como pCR2.1TOPO fueron facilitados de igual manera por el Laboratorio de Bioquímica del Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales de la Escuela de Medicina Veterinaria de la UNA.

Las cepas *E. coli* S17-1 λpir, *E. coli* BL21 AI, *E. coli* Match1™-T1^R así como *E. coli* Top10 fueron mantenidas a -70°C y crecidas a 37°C por 14 – 18 horas en medio Luria Bertani (LB, 10 g/L Triptona, 5 g/L extracto de levadura y 5 g/L NaCl) en agitación (250 rpm) con el agregado de antibióticos según el requerimiento de cada cepa. Los antibióticos utilizados fueron: Ampicilina (Amp) 100 µg/ml, Cloranfenicol (Cm) 30 µg/ml, Espectinomicina (Spc) 100 µg/ml y Kanamicina (Kan) 50 µg/m según fue requerido.

5.2. Evaluación del perfil de fermentación de carbohidratos mediante API

50CH

Para esto se utilizó una prueba API ®50 CH bioMérieux. Se inoculó un caldo de fenol rojo con 6×10^8 UFC de las cepas *B. abortus* 2308W *B. abortus* 2308W Rev34 y *B. abortus* 2308W ΔAmp160, para posteriormente inocular con este caldo cada uno de los 50 pocillos

que posee la prueba. La misma se incubó durante 24 y 48 horas en cámara húmeda para posteriormente leer el resultado. El mismo se evalúa mediante la observación del fenómeno de metabolización por un viraje del color del medio de amarillo a rojo (debido a acidificación del medio) y asimilación por medio de un aumento de la turbidez. Posteriormente, se generó una matriz binaria en donde se anotó con un 1 si la prueba dio positivo o un 0 si la fue negativa.

5.3. Electroporación

Bacterias crecidas en una placa de ATS fueron retiradas con un asa de plástico y colocadas en 1 ml de agua de grado molecular a 4°C. Luego se suspende y se centrifuga a 4° durante 5 minutos a 10000 RPM, posterior a esto se descarta el sobrenadante y el botón de células se resuspende en 1 ml de agua y se repite el proceso un total de tres veces. Una vez cumplidos los tres lavados, se resuspende el precipitado en 200 µl de agua. Luego se toman 40 µl de esta mezcla de células y se le agrega de 1 a 5 µl de la preparación del plásmido de interés, dejando reposar la mezcla 5 minutos en hielo. Luego se traslada la cámara de electroporación previamente fría donde se coloca la muestra y se le da un pulso bajo las condiciones descritas en el Cuadro 2. Posteriormente, se le agregó 1 ml de medio SOC a 37°C dentro de la cámara y se mezcló para recoger el producto de la electroporación. Luego este producto se depositó en tubo Falcon de 15 ml y se dejó en agitación entre 1 y 6 horas a 37°C. Finalmente, se hicieron diluciones seriadas y se platearon en placas de ATS con el antibiótico adecuado.

Cuadro 1: Parámetros necesarios para configurar el electroporador BTX™ USA modelo ECM630 para transformar con plásmidos bacterias electrocompetentes

Especie	Voltaje	Capacitancia	Resistencia	Fuerza del campo	Gap de la cámara de electroporación.
<i>Escherichia coli</i>	1900	25 μ F	200 ohms	19 kV/cm	1mm
<i>Brucella abortus</i>	2500	50 μ F	250 ohms	19 kV/cm	2mm

5.4 Ensayos de concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por microdilución para polimixina B.

Se preparó una suspensión de 3×10^8 UFC/ml de las cepas *B. abortus* 2308W *B. abortus* 2308W Rev34 y *B. abortus* 2308W Δ Amp160. Posteriormente, se hizo una dilución 1:100 de los inóculos preparados en medio CTS. En placas de 96 hoyos se agregaron 100 μ l de CTS a todos los pocillos excepto a la primera columna, en la última columna se agregó 200 μ l de CTS, como control negativo de inóculo. Posteriormente, se agregó en los pozos de la primera columna 200 μ l de la solución del antibiótico y se hicieron diluciones seriadas del antibiótico en un volumen final de 100 μ l. Luego se agregó 100 μ l de la solución bacteriana a cada uno de los pocillos de la placa excepto en la última columna que corresponde a un control negativo. Cada cepa se ensayó por duplicado en medio CTS a pH 7 y pH 6. La CMI se calculó observando la placa de 96 pozos a 48 y 72 horas de incubación a 37°C, al observar la mayor dilución del antibiótico con la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano. El resultado se registró como la concentración más baja de antibiótico del pocillo que logró inhibir el crecimiento bacteriano.

5.5. Purificación de ADN genómico

La extracción de ADN de las cepas se ejecutó a partir de cultivos bacterianos en medio de cultivo Tripticasa Soya (CTS) crecidos por al menos 17 horas, en agitación y a 37°C, en el caso de las bacterias pertenecientes al género *Brucella*, mientras que las que pertenecen al género *Escherichia* se crecieron en medio Luria Bertani (LB). La extracción se llevó a cabo siguiendo el protocolo sugerido del DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen®) en una cámara de bioseguridad nivel 2. El resultado de la extracción se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% con 5 µl de cada muestra (Sambrook y Russell, 2001). Los geles se observaron en un transiluminador con luz ultravioleta (Benchtop® M-20). Adicionalmente, se cuantificó la concentración de ADN obtenida mediante espectrofotometría utilizando un NanoDrop® 2000c (ThermoFischer Scientific).

5.6. Generación de la mutante *B. abortus* 2308W en *amp160*

Para la generación de esta mutante, se utilizó el protocolo descrito por Zuñiga- Ripa. El ADN genómico de *Brucella abortus* 2308 Wisconsin fue extraído a partir de cultivos de 17 horas en CTS utilizando el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, mediante PCR, se amplificaron dos regiones flanqueantes de aproximadamente 200 pb, la región en el extremo 5' utilizando los cebadores F1- R2 y la región en el extremo 3' utilizando los cebadores F3-R4 (ver secuencias en cuadro 3) como lo muestra la Figura 2 en el paso 1. Estos dos productos de PCR que contienen las dos regiones flanqueantes a *amp160* se utilizaron como molde para sintetizar un único fragmento que fusiona ambos usando los cebadores F1-R4 (Figura 2, paso 2). Posteriormente, este producto de aproximadamente 413 pb se clonó en el vector PCR 2.1 (Figura 2 paso3) que contiene un cassette de resistencia a la kanamicina y un gen

con actividad B-galactosidasa. Luego de una incubación de 12 horas, se seleccionó el clon que integró el producto de interés y se confirmó su integración mediante PCR con los cebadores F1-R4. Luego, se obtuvo el plásmido con la construcción y se realizó una doble digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I (Fermentas®). El producto de la digestión se ligó con el vector pJQKm usando una T4 DNA Polimerasa (Fermentas®) previamente digerido con las mismas enzimas (Figura 2 paso 4). El plásmido pJQKm es suicida en *Brucella* y es además conjugable y contiene un cassette de resistencia a la kanamicina y otro de susceptibilidad a las altas concentraciones de sacarosa (Zúñiga-Ripa *et al.*, 2014). Este constructo fue luego electroporado en *E. coli* SI7 y se corroboró por PCR usando los cebadores F1-R4 que la clonación hubiese sido exitosa. Luego se realizó la conjugación (Figura 2, paso 5 y sección 5.4). El vector pJQKm le confiere a *Brucella* un fenotipo de resistencia a la kanamicina y de sensibilidad a la sacarosa, lo que permite su selección al platearse en medio ATS suplementado tanto con kanamicina como con ácido nalidíxico, este paso elimina la *E. coli* y *Brucella* no transformadas (Figura 2, paso 6). A continuación, se tomó una bacteria transformante, se puso a crecer en CTS a 37°C en agitación por 17 hrs (Figura 2, paso 7) y se platearon diluciones en ATS con sacarosa al 5% para inducir la recombinación (figura 1 paso 8) (Zúñiga-Ripa *et al.*, 2014).

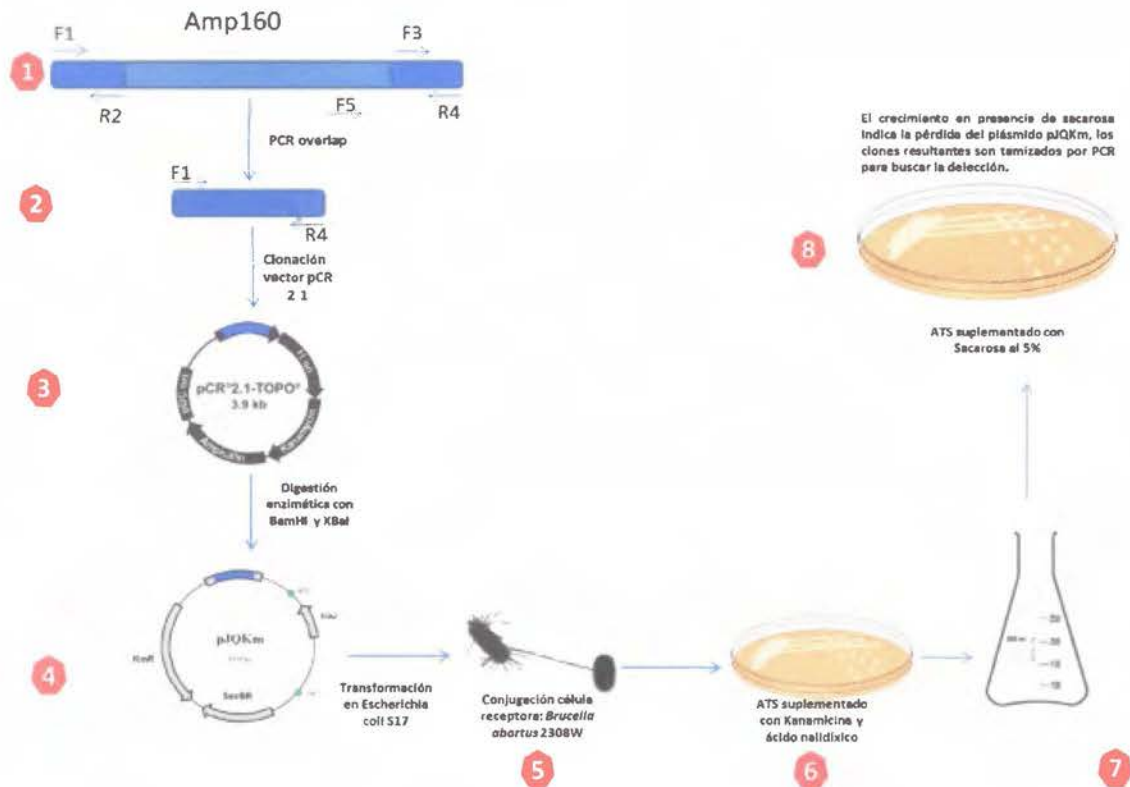


Figura 2: Representación para generar una mutante por deleción de la proteína Amp160 de *Brucella abortus* 2308W. Los cebadores F1 y R2 amplifican una región corriente arriba del gen de interés de 200 pb. De la misma manera, pero en la región corriente abajo lo hacen los cebadores F3-R4. Ambos productos de PCR se fusionan en uno solo el cual es clonado en el vector de entrada pCR 2.1 TOPO. Dicho vector es digerido con las enzimas BamHI y XbaI. Luego el producto de la digestión es ligado en el vector suicida pJQKm. Este vector, que confiere resistencia a la kanamicina, es electroporado en *Escherichia coli* S17, la cual por medio de conjugación transfiere el mismo a *Brucella abortus* 2308W. La selección de las cepas que contienen el vector integrado se consigue al platear las bacterias en un medio ATS suplementado con kanamicina y ácido nalidíxico. El

Cuadro 2: cepas y plásmidos utilizados para la realización de este estudio.

Cepa	Descripción	Uso en el estudio	Referencia
<i>Brucella abortus</i>			
2308 Wisconsin	Cepa silvestre virulenta, Na ^r	Cepa modelo para el estudio	Suárez- Esquivel et al., 2016
2308 $\Delta amp160$	Cepa derivada de 2308 Wisconsin con mutación por delección en el gen BAW_10046	Cepa para evaluar mutación	Este estudio
2308 Rev34	Cepa derivada de 2308 Wisconsin Revertida salvaje	Control de atenuación por pasajes	Este estudio
2308	Cepa mutante complementada con el gen <i>amp160</i>	Permite evaluar la restauración del fenotipo por mutación en <i>amp160</i>	Este estudio
$\Delta amp160$ pRH002_ <i>amp160</i>			
2308pGFP	Cepa silvestre virulenta con plásmido que codifica por GFP, Na ^r	Cepa modelo para el estudio con fluorescencia	Chacón-Díaz et al., 2011
<i>Brucella neotomae</i> 5K33			
	Cepa silvestre aislada de <i>Neotoma lepida</i> (ATCC® 23459 TM)	Utilizad en la caracterización por perfil de ácidos grasos	Stoenner & Lackman, 1957
<i>Brucella canis</i> 206-10			
	Cepa silvestre virulenta aislada de un aborto canino	Utilizada en la caracterización por perfil de ácidos grasos	Chacón-Díaz et al., 2015
<i>Escherichia coli</i>			
BL21 AI	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) [malB⁺]_K</i>	Expresión de proteínas de fusión	Studier y Moffatt, 1986

		$\lambda_2(\lambda^S)$		
Match1™-T1 ^R	F- $\phi 80(lacZ) \Delta lacX74 hsdR(r_K m_K^+) \Delta recA1398 endA1 tonA$		Cepa de receptora del vector PCR [®] 8/GW/TOPO [®]	Invitrogen
S17-1 λ pir	TpR SmR recA, thi, pro, hsdR-M+RP4: 2-Tc:Mu: Km Tn7, fago lisógeno λ pir		Cepa de clonación que posee un pili sexual que permite realizar conjugación	Conde-Álvarez et al., 2012
Top10	- mcrA $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi 80 lacZ \Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139 \Delta(araleu)7697 galU galK rpsL(StrR) endA1 nupG$		Cepa receptora del vector de clonaje TOPO [®] TA cloning	Invitrogen
Plásmidos				
pCR [®] 8/GW/TOPO [®]	Vector de clonación de entrada sistema GateWay [®]		Clonación de productos de PCR con extremos poli AAA.	Invitrogen
pCR [®] 8/GW/TOPO [®] DUF490	Vector de entrada con DUF490		Clonación de DUF 490 hacia pDest17	Invitrogen
pCR [®] 8/GW/TOPO [®] amp160	Vector de entrada con Amp160		Clonación de Amp160 en pRH002	
pCR2.1TOPO	Vector de clonación Amp ^r , Neo ^r , Kan ^r		Clonación de productos de PCR con extremos poli AAA.	Invitrogen
pCR2.1TOPO_F1-R4	Vector Fragmento de 413 pb flanqueante de amp160		Incorporación del sitio de corte EcoRI en fragmento de 413 pb	Este estudio
pJQm	Vector suicida conjugable Sac ^s , Kan ^R		Se incorpora al genoma pues no es	Scupham &

pDEST17	Vector expresión de proteínas de fusión. Amp ^r	replicable en <i>Brucella</i> Expresa el péptido clonado controlado por la inducción con L-arabinosa	Triplett. 1997. Invitrogen
pDEST17_DUF490	Vector de destino sistema Gateway [®]	Producción del péptido 6Hys_DUF490	Este estudio
pRH002amp160	Vector de destino sistema Gateway [®]	Plásmido de mediano número de copias en <i>Brucella</i> con el gen BAW_10046 clonado	Este estudio

Cuadro 3: Cebadores utilizados para generar mutante en *Amp160*, cepa complementada y expresar el péptido DUF490.

Cebadores	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplicón (pb)	Uso en el estudio
<i>Amp160</i> (BAW_10046)			
F1	GGCTTGCGCTATCTTACCG	201	Amplifica una región de 200 pb de bases corriente arriba de <i>amp160</i> .
R2	GCATTGACCTTTTGTTCA		
F3	TGAACAAAAGGTGCAAATGCATCTCGACATTTCCGTAACC	217	Amplifica una región de 217 pb de bases corriente abajo de <i>amp160</i> .
R4	GAGCTGCCAGGAAACAGCTA		
F5	GCTCCAACAATTCGCTCATA	364	Permite amplificar un producto de PCR de 405 pb junto con el cebador R4 si el gen no ha sido delecionado, de lo contrario no produce amplificación.
+omp160INIF	GTGGAAAACAAGCTTTCCGC		
+omp160INIR	TCAATAGTCCTTTTCATAGA	4548	Amplifica <i>amp160</i> manteniendo el marco de lectura

+omp160domF	ATAGTCCTTTTCATAGAAGA	1068	Amplifican el dominio de
+omp160domR	CGCCAGGTAAATGCAAATTT		función desconocida (DUF490) de Amp160 conservando el marco de lectura.

Cuadro 4: Cebadores utilizados para corroborar la orientación de productos de PCR en vectores de entrada

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)	Uso en el estudio
<i>Amp160 (BAW_10046)</i>			
Amp160upF	GTTTTCCCAGTCACGACGTT	356	Permite corroborar la orientación de <i>amp160</i> en el vector pCR [®] 8/GW/TOPO [®] en extremo 5'
Amp160upR	CTGAGACGGCCAAGAAAAAG		
Amp160 dwF	ATGTCGTCACCAACAGCAAG	382	Permite corroborar la orientación de <i>amp160</i> en el vector pCR [®] 8/GW/TOPO [®] en extremo 3'
Amp160dwR	GAGCTGCCAGGAAACAGCTA		
Amp160DomupR	GAGCTGCCAGGAAACAGCTA	364	Permite corroborar la orientación de DUF490 en el vector pCR [®] 8/GW/TOPO [®] en extremo 5'
Amp160upF	GTTTTCCCAGTCACGACGTT		
Amp160 dwF	ATGTCGTCACCAACAGCAAG	379	Permite corroborar la orientación de DUF490 en el vector pCR [®] 8/GW/TOPO [®] en extremo 3'
Amp160DomdwR	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC		

5.7. Conjugación del plásmido pJQKm en *Brucella abortus* 2308W

Inicialmente, con las condiciones de cultivo anteriormente descritas, se realizaron precultivos de *Brucella abortus* 2308W y de *Escherichia coli* S17-1 λ pir, los cuales contienen construcción deseada. Del precultivo de *E. coli* se tomó 1 ml y se colocó en 10 ml de medio fresco y se incubó durante 3 horas con el propósito de tener bacterias en fase exponencial. Luego se mezclaron 200 μ l del cultivo de *E. coli* con 500 μ l del cultivo de *Brucella*, para centrifugar a 7000 rpm durante 3 minutos y precipitar las bacterias. Posteriormente, se hicieron 2 lavados con 1 ml de MgSO₄ 10 μ M y al final se resuspendió el precipitado en 30 μ l de la misma solución. Luego se recogió todo el material, se colocó en el centro de una placa de ATS y se dejó incubar a 37°C durante 6 horas sin mover. Después de transcurrido ese tiempo, se tomó lo que creció y se resuspendió en 200 μ l de MgSO₄ 10 μ M, para luego realizar diluciones plateando por duplicado en placas con ácido nalidíxico 25 μ M y kanamicina 50 μ M. Las placas se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Y los clones que crecieron en la presencia de ambos antibióticos fueron los seleccionados para trabajar.

5.8 Complementación de la cepa mutante con el locus BAW_10046.

Para generar la cepa mutante complementada, se amplificó por PCR usando los cebadores omp160 INIF y omp160INIR (ver secuencias en Cuadro 3) un producto de PCR de 4548 pb con el kit Dream Taq PCR Master Mix (Fermentas®). El producto de PCR fue purificado utilizando el kit Quiaquick Gel Extraction kit (Qiagen®), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Luego se clonó en el vector de entrada PCR 8/GW/TOPO

siguiendo las instrucciones del fabricante. La correcta orientación del producto de PCR en el vector de entrada se corroboró usando los cebadores Amp160upF- Amp160 upR para el extremo 5' y Amp160dwF-Amp160upR para el extremo 3' (Cuadro 4). Se electroporó la construcción anteriormente mencionada en *E. coli* Match1TM-T1^R. Se seleccionó por PCR uno de los clones transformantes que contenía la construcción con la orientación adecuada y se purificó su plásmido. Luego se realizó una reacción de recombinación con el sistema de clonasa de Gateway (ver sección 5.7) el cual traslada el gen *amp160* al vector pRH002. La construcción generada, pRH002amp160, se electroporó en la cepa *B. abortus* 2308WΔamp160. La selección de la cepa complementada se hizo analizando por PCR los clones de *B. abortus* que crecieron en presencia de cloranfenicol con los cebadores F1-R4 (cuadro 3).

5.9 Secuenciación de productos de PCR

La secuenciación del ADN se llevó a cabo en un secuenciador ABI Prism 3100® (ThermoFisher Scientific). Para esto, se corrió un gel de agarosa con el producto de PCR de interés y se cortó la banda de ADN del peso de adecuado para luego purificarla con el kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Luego el producto de PCR purificado se sometió a la reacción de secuenciación con los reactivos Bigdye Terminator 3.1 (Applied BioSystems). Cada reacción de secuenciación se ejecutó en el sentido 5' → 3' y 3' → 5'. Para obtener el ensamblaje de los 2 fragmentos en una secuencia consenso se usó el software DNAbaser (DNA Sequence Assembler v4 (2013), Heracle BioSoft, www.DnaBaser.com).

5.10. Reacciones de recombinación con el sistema LR Clonase™ II de

Gateway

Para realizar las reacciones de recombinación se siguieron las sugerencias proporcionadas por el fabricante. Para esto se mezcló entre 1-7 μl de plásmido purificado que contiene la construcción de interés en el vector de entrada pCR®8/GW/TOPO® a una concentración de entre 50-150 ng con 1 ml del vector de destino a una concentración de 100 ng/ μl , junto con amortiguador TE pH 8.0 para alcanzar un volumen final de 8 μl . A esta mezcla se le agregó 2 μl de LR Clonase II y se incubó cada reacción a 25 °C por una hora. Tras este tiempo se detuvo la reacción mediante la adición de 1 μl de proteinasa K e incubando la muestra a 37°C por 10 minutos en un baño húmedo. Posteriormente se procede al paso de electroporación en la cepa receptora *E. coli* One Shot®.

5.11. Southern Blot

Para hacer el análisis por Southern Blot se realizaron extracciones de ADN genómico de las cepas *Brucella abortus* 2308W, *B. abortus* Rev34 y *B. abortus* $\Delta\text{amp}160$, luego se sometió a digestión enzimática con XbaI (Fermentas®) por 12 horas a 37°C bajo las condiciones de pH establecidas por el fabricante. Posteriormente, el ADN digerido fue colocado en cada uno de los pozos en un gel de agarosa al 0,6% a 100 V por 90 minutos. Luego el gel fue teñido en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y observado en un transiluminador para corroborar la digestión y corrida del ADN. Para depurinizar el ADN del gel se sumergió el mismo en una solución de HCl 0.25 mol/l durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se hizo un lavado rápido en agua ultrapura estéril, para posteriormente desnaturalizar el ADN durante 45 minutos en una solución 1,5 M de NaCl y

0,5 M de NaOH. Luego se realizó otro lavado rápido igual al anterior y se incubó el gel en una solución de neutralización (0,5 M TrisHCl, 1,5 M NaCl) durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación. Esta solución se sustituyó por otro volumen de la misma y posteriormente se incubó 15 minutos más en agitación. Para hacer la transferencia, se tomó una membrana de Nylon positivamente cargada (Sigma Aldrich) y se sumergió en agua destilada estéril. Se colocó luego un soporte cubierto con un papel Whatman N° 3 y llenando con amortiguador de transferencia (citrato de sodio 0,15M Cloruro de sodio 1,5 M) dejando 1 cm fuera del amortiguador. Encima del papel se colocó el gel y sobre éste la membrana prelavada. Finalmente, se coloca una pila de papel sumamente absorbente de 8 cm de grosor y sobre la pila de papel se coloca un vidrio y luego un artefacto de al menos 500 g de peso sobre éste. Luego se incubó toda la noche a temperatura ambiente.

Con el propósito de marcar la sonda se colocó 1 µg de ADN amplificado y purificado usando los cebadores F1 y R2 (cuadro 3) en agua bidestilada estéril para llevar la muestra a un volumen final de 16 µl, se colocó en un tubo de microcentrífuga a hervir 10 minutos para desnaturalizar el ADN, y luego se pasó rápidamente a un recipiente con agua con hielo. Luego se tomó 4 µl de una mezcla de marcaje con digoxigenina Dig High Prime (Roche®) se agregó al vial y se centrifugó brevemente para luego incubar a toda la noche a 37°C. Luego la reacción se detuvo agregando al vial 2 µl de 0,2 M EDTA (pH 8) y calentando a 65°C durante 10 minutos. Posteriormente, se evaluó la eficiencia del marcaje de la sonda haciendo diluciones seriadas de la misma y colocando 10 µl de cada dilución en una membrana para posteriormente hibridizar y revelar mediante exposición de una película de rayos X durante 20 minutos.

Para realizar la hibridación, se precalentó un volumen de 10 ml de amortiguador de hibridación (Dig Easy Hyb Roche) a una temperatura de 40°C y a la membrana se le colocó este volumen y se dejaron prehibridizando en agitación constante a 30 rpm. Luego se desnaturalizó la sonda marcada hirviéndola durante 5 minutos para luego mantenerla en hielo. Se le agregó esta sonda desnaturalizada al amortiguador anteriormente mencionado. La solución prehibridizante fue sustituida por la solución que contiene la sonda y se incubó toda la noche en agitación. Al día siguiente se lavó 2 veces durante 5 minutos en amortiguador SCC 2X con 0,1% SDS a temperatura ambiente y luego dos lavados iguales a los anteriores pero de 15 minutos y a 67°C en agitación.

La detección, inició con un lavado de la membrana durante 5 minutos con amortiguador de lavado y se incubó 30 minutos en 100 µl de solución de bloqueo. La membrana se pasó a una solución de 20 ml que contiene un anticuerpo anti-digoxigenina (2,5 µl de anticuerpo diluidos en 25 ml de solución de bloqueo). La membrana se lavó dos veces durante 15 minutos con 100 ml de amortiguador de lavado cada uno. Posteriormente, se incubó la membrana en 20 ml de amortiguador de detección para luego poner 1 ml de sustrato quimioluminiscente CSPD (Roche) y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente eliminando el exceso de líquido. Finalmente, se incubó la membrana a 37°C durante 10 minutos y luego exponer la membrana a una película de rayos X por 20 minutos.

5.12. Generación de un anticuerpo contra el dominio DUF490 de Amp160

Para generar un anticuerpo contra la proteína Amp160 se utilizaron los últimos 375 residuos de aminoácidos del extremo carboxilo terminal, los cuales son parte del dominio conservado conocido como DUF490. Para esto, se usaron los cebadores Amp160DomF y Amp160DomR (cuadro 3) que permiten amplificar la región que codifica por este dominio de 1071 pb manteniendo el marco de lectura. Se amplificó por PCR un producto de PCR que se clonó en un vector de entrada del sistema Gateway (Life Technologies®) generando el constructo pCR2.1TOPODUF490. La correcta orientación del inserto en el nuevo constructo se confirmó mediante PCR con los pares de cebadores específicos diseñados para este propósito llamados Amp160DomupR-Amp160upF para corroborar el extremo 5' y Amp160 dwF-Amp160DomdwR para corroborar el extremo 3' (cuadro 4). Una vez que se corroboró la orientación se realizó la reacción de recombinación mediada por la mezcla de enzimas para trasladar el inserto al vector pDest17, generando el constructo pDest17DUF490 (figura 2 paso 1). Dicho vector, le confiere a la bacteria receptora del mismo el fenotipo de resistencia a la ampicilina, lo que permite su selección. Al incorporar el fragmento de 1021 pb en este vector se le añade al péptido 6 residuos de histidinas en el extremo amino terminal, lo que permite su purificación utilizando el sistema de columnas Ni-NTA de Qiagen. Para esto se transforma la cepa bacteriana *Escherichia coli* Match1™-T1^R. Una vez que se obtuvieron los clones que tenían la construcción necesaria corroborados por PCR con los cebadores Amp160DomF y Amp160DomR, se realizó una preparación de plásmido, y se transformó la bacteria receptora conocida como *E. coli* BL21AI (Figura 2, paso2). Se seleccionaron 8 clones con base en su resistencia a ampicilina. Para corroborar la expresión de la proteína de interés se realizó una expresión piloto con los clones. Para esto, se puso el clon a crecer en el medio 2XYT a pH 7.0 con

100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de Ampicilina hasta alcanzar un OD600 de entre 0,6 y 0,8, para hacer una inducción con arabinosa al 20%. Tras la inducción se tomaron muestras de un 1ml de cultivo cada hora durante 4 horas, se centrifugaron y se analizaron por SDS-PAGE (Laemmli et al., 1970). Tras esto, se determinaron las mejores condiciones de inducción, al observarse el clon que mejor expresó la inducción de una proteína de 40 kD. Una vez purificada utilizando el sistema de purificación anteriormente descrito, la proteína se precipitó con 4 volúmenes de acetona a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se dejó toda la noche a -20°C . Luego se centrifugó a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C . El precipitado se lavó con una solución acetona/agua 3 veces y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones anteriormente descritas. Al final se resuspendió el precipitado con la proteína en 300 μl de PBS 1X para mezclarlo con 300 μl de adyuvante de Freund (Figura 2, paso 4) la concentración de la proteína era de 250 μg en 100 μl .

Para inducir la inmunización de un conejo, el primer inóculo se realizó con adyuvante de Freund completo por vía subcutánea en la región cervical (figura 2 paso 5) inyectando 500 μl de la preparación. 15 días después se realizó un segundo inóculo de 500 μl con adyuvante incompleto por vía intramuscular, luego se hicieron 4 inóculos más de esta misma manera con la misma distancia en el tiempo. Posteriormente, se sangró el conejo y se obtuvo su suero por centrifugación para utilizarlo en el Western Blott.

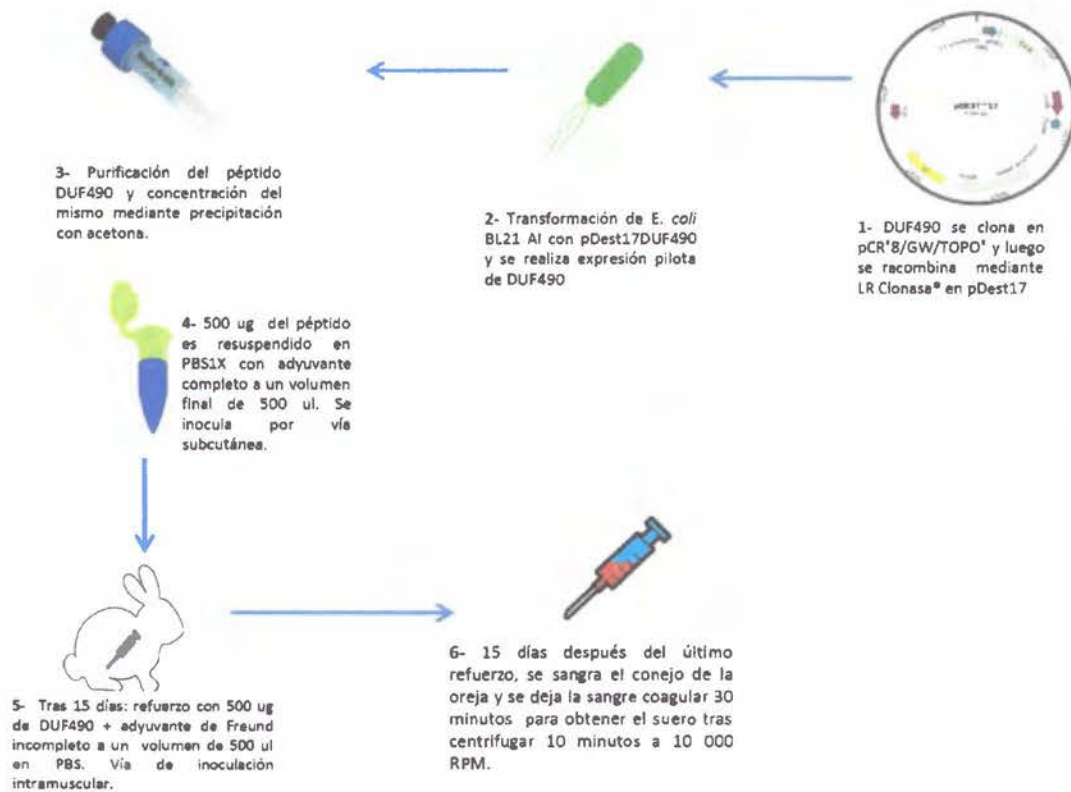


Figura 2: Estrategia metodológica para la generación de un anticuerpo policlonal contra el dominio de función desconocida DUF490 de Amp160 de *Brucella abortus* 2308W en un conejo. A partir de una plásmido que porta la construcción que expresa DUF490 con una cola de poli-Histidina, se produce la proteína recombinante en *E. coli* BL21 AI, luego ésta se purifica en una columna de afinidad para inocularla en el conejo mezclada con adyuvante, durante varios puntos de inoculación a 15 días de separación.

5.13. Western Blot.

Se prepararon lisados de bacterias *Brucella abortus* 2308W, *B. abortus* 2308W Rev34, *B. abortus* 2308W Δ amp160 y *B. abortus* 2308 Δ amp160+amp160 resuspendiéndolas en 100 μ l de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 2% y calentándolas a 95 °C por 20 minutos. Posteriormente se centrifugó a 25 000 \times g y se trabajó con el sobrenadante. La concentración de proteínas en los lisados se determinó con el kit Bio-Rad DCTM Protein Assay (BIO-RAD) según las instrucciones del fabricante. Un total de 20 μ g de proteína de los lisados fueron separados en geles de SDS-PAGE al 12%. Después, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF, incubadas con anticuerpos policlonales contra el fragmento de Amp160 que codifica el dominio DUF490 producido en conejo a una dilución 1/250 y posteriormente con un anticuerpo contra conejo conjugado con peroxidasa a una dilución 1/1000 (Pierce). El anticuerpo monoclonal anti Omp25 fue utilizado como control de carga. Para la detección de las proteínas de membrana externa se usaron anticuerpos monoclonales contra Omp10, Omp16, Omp19, Omp25, y Omp31 y posteriormente un conjugado con peroxidasa contra ratón a razón de 1/1000 (Pierce). Las bandas correspondientes al peso molecular esperado para DUF490 (160 kD) y cada anticuerpo monoclonal fueron visualizadas mediante quimioluminiscencia por medio del sustrato de duración extendida (Roche®) según las instrucciones de la casa comercial.

5.14. Evaluación del LPS

Para la purificación del LPS se utilizó el método de Hitchcock & Brown con algunas modificaciones (Hitchcock & Brown 1983). Se partió con 40 ml de cultivo de bacterias crecidas en medio CTS durante 16 horas en agitación a 37 °C para cada cepa, los cuales se

centrifugaron. Luego el pellet se resuspendió en un amortiguador 0.0625 M Tris (pH 6.8) el cual contenía 2% (wt/wt). Posteriormente, la mezcla se calentó por 10 minutos a 100 °C y se dejó enfriar a 55°C. Se agregó proteinasa K a razón de 0.15 mg/ml, se incubó cada muestra a 55°C por tres horas y luego toda la noche a 20°C. Al día siguiente se agregó SDS a razón de 0.02g/ml y se calentó la mezcla a 100 °C por 10 minutos. Posteriormente, la preparación se centrifugó a 12,000 XG por 30 minutos a 20 °C. Para precipitar el LPS se adicionó al sobrenadante 3 volúmenes de isopropanol a 4°C y se dejó reposar la preparación durante 30 minutos para cosechar el precipitado mediante la centrifugación de la muestra a 12,000 x g durante 30 minutos a 4°C. El precipitado se disolvió en 10 ml de agua destilada estéril. Se precipitó con isopropanol y el precipitado se trató con ARNasa y ADNasa I ambos a una concentración de 0.01 mg/ml a 37 °C por 30 minutos y después se adicionó proteinasa K a 0.01 mg /ml a 55°C por 3 horas y luego a 20 °C toda la noche. Para finalizar se precipitó de nuevo en isopropanol y se recuperó en 1 ml de agua destilada.

Finalmente, se procedió con el proceso de análisis de la muestra mediante SDS-PAGE. Para esto, se montaron 15 µl de la muestra de cada preparación con 5 µl de amortiguador de muestra. Se utilizó un gel de poliacrilamida a una concentración de 12%, las muestras corrieron a un voltaje constante de 150V durante una hora y 15 minutos. La tinción de plata específica para carbohidratos se realizó según el protocolo establecido por Tsai & Frasch, 1982. La cristalería utilizada debe ser tratada con una solución de ácido nítrico al 30% durante 5 minutos y posteriormente lavada 5 veces con agua destilada, este paso es crítico para evitar la contaminación del gel que generaría muchos artefactos. Para iniciar se fijó el gel por dos horas en agitación leve y constante con la solución fijadora la cual se constituye de 10 ml de ácido acético glacial, 80 ml de etanol absoluto y 110 ml de agua destilada.

Luego, se reemplaza la solución anterior por una solución de 10 ml de ácido acético glacial, 80 ml de etanol absoluto, 110 ml de agua destilada y 1,4 ml de ácido periódico. Posteriormente, se hicieron 4 lavados de 15 minutos cada uno con 500 ml de agua destilada cada uno, luego se aplica la solución de tinción por 20 minutos. Se hacen 4 lavados con 500 ml de agua destilada y finalmente se pone 200 ml del reactivo revelador (preparado con 400 ml de ácido cítrico y 1 ml de formaldehído al 37%). Para detener la reacción de revelado, se lava con abundante agua del tubo y se adiciona 500 μ l de ácido clorhídrico al 10%. El resultado se registró mediante la toma de fotografías en el equipo Chemidoc de Biorad.

Para determinar si los clones eran lisos o rugosos se utilizaron las técnicas de aglutinación con acriflavina y tinción con cristal violeta. Para la primera, se tomaron tres clones al azar crecidos en ATS y se mezclaron de manera independiente cada uno de ellos con una gota (20 μ l) de acriflavina y se mezclaron con el colorante, el LPS se considera rugoso si se genera un aglomerado y liso si no lo hace. Para la tinción con acriflavina, se tomaron placas con alrededor de 10^2 UFC y se les colocó el colorante directamente en la placa, usándose como control la cepa rugosa *B. canis* 206-10.

5.15. Extracción y análisis de ácidos grasos bacterianos

La extracción de los ácidos grasos se inició cosechando con un asa bacteriológica las bacterias crecidas en ATS durante 72 horas, tratando de recolectar como mínimo 40 mg de células bacterianas en tubos de vidrio. Posteriormente se procede al paso de saponificación, en donde se le coloca a las bacterias 1 ml de reactivo de saponificación (45 g de hidróxido de sodio, 150 ml de metanol y 150 ml de agua destilada). Una vez mezclado el tubo se sella

fuertemente con tapas de teflón y se calienta en un baño de agua hirviendo por 5 minutos. Tras este tiempo los tubos se sacan y se vortexean de 5 a 10 segundos, para volverlos a poner en el agua y dejarlos en el baño hasta completar 30 minutos de calentamiento. Posteriormente se desarrolla la metilación, para esto los tubos del paso anterior se dejan enfriar luego se destapan y se les agrega 2 ml del reactivo de metilación (325 ml de HCl 6N y 275 ml de alcohol metílico) luego los tubos se calientan a 80°C considerando que este paso es crítico tanto en temperatura como en tiempo. Luego se realizó el paso de la extracción agregando a cada tubo 1.25 ml del reactivo de extracción (200 ml de hexano y 200 ml de metil-terbutil-éter) tras este paso los ácidos grasos metilesterificados son extraídos en la fase orgánica, por lo que la fase acuosa inferior se saca del tubo. Posteriormente, se realiza el lavado básico, para esto se tomó 3 ml del reactivo de lavado básico (10,8 g de NaOH disueltos en 900 ml de agua destilada) y se agregaron a cada tubo para luego agitar suavemente por 5 minutos. Finalmente, 2/3 partes de la fase orgánica es pipeteada en un vial tipo GC para ser analizada. Para el análisis se usó un cromatógrafo de gas (Agilent Technologies 6850) colocando la extracción en una columna capilar HP 19091B-102 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA Inc). Para hacer el análisis de los datos basados en los tiempos de retención de los acil-metil-esters de los ácidos grasos, se utilizó un sistema de clusterización aglomerativa jerárquica, utilizando el programa Microsoft Excel 2000/XLSTAT-Pro (Versión 4.09,2016, Addinsoft, Inc., Brooklyn, NY, USA). Las proximidades fueron calculadas utilizando la distancia Euclídea cuadrada y la agregación fue calculada usando grupos de pares sin utilizar un promedio no ponderado.

5.16 Ensayo actividad lítica del complemento

Se preparó una suspensión de 1×10^4 UFC/ml de las cepas *B. abortus* 2308W y *B. abortus* 2308W Δ Amp160 en PBS. Se obtuvo la muestra de suero sangrando un donante y dejando la sangre coagular por 30 minutos, luego se recuperó el suero centrifugando 10 minutos a 4500 rpm. Posteriormente, se le agregó a 1 ml de suero, una punta de espátula de levadura deshidratada de *Saccharomyces cerevisiae* y se incubó durante una hora a 37°C. Se centrifugó el suero a 14000 rpm durante 5 minutos para separar la levadura. Para montar el ensayo, se colocó 200 μ l de la suspensión bacteriana con 400 μ l de suero humano y otro con suero control el cual está inactivado con levadura y calor. Se incubó durante 45 minutos. Se tomaron muestras de 100 μ l a los 0 y 45 minutos posteriores al contacto de la bacteria con el suero y el suero control. Se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-5} . Se sembró 10 μ l de cada dilución en placas de Agar Soya (ATS) por triplicado. Finalmente, se hizo un recuento bacteriano y se comparó la UFC/ml del suero control contra el suero activado.

5.17. Ensayo de supervivencia en neutrófilos humanos

Se empezó por poner un cultivo de las bacterias a ensayar en CTS desde el día antes, se determinó la OD a 420nm y con esto se calculó la cantidad de bacterias por utilizar para tener un MOI de 5. Se colectaron 5 ml sangre en un tubo heparinizado junto a 5 ml en un tubo sin anticoagulante para determinar la presencia de anticuerpos en el suero. En un tubo falcon de 15 ml estéril se cargó 5 ml de Polymorphprep TM (Axis Shield) y se dejó atemperar. Luego se cargó con una pipeta Pasteur 5 ml de la sangre anticoagulada sobre el

preparado anteriormente mencionado y se tapó el tubo falcon. Luego se centrifugó 35 minutos a 20 °C a una velocidad de 500 g. Para colectar los neutrófilos se aspira hasta 0,5 cm arriba de la segunda marca blanca y se colecta hasta 0,5 cm por debajo de la misma. Los neutrófilos se colocaron en un falcon estéril y se colocaron en una solución isotónica de NaCl a una relación de volumen 1:1. Luego se cosechan los neutrófilos mediante una centrifugación a 400 g por 10 minutos a 20°C. Posteriormente se determinó el número de neutrófilos presentes en la muestra para calcular la cantidad de bacterias necesarias para tener un MOI de 5. Para realizar el ensayo propiamente dicho, se ponen las bacterias con medio DMEM sin células y se platea el tiempo cero para establecer el control de carga. Por otro lado se colocan las células con bacterias y 20 µl de suero (complemento), se agita levemente y se coloca en la incubadora de agitación con movimientos lentos. Tras pasar los tiempos de incubación de 45 y 90 minutos se toman 100 µl de cada pozo a evaluar y se colocan en 900 µl de PBS Tritón 0,05% y se incuba 10 minutos. Tras este tiempo de lisis, se hacen diluciones seriadas 1/10 y se platea dos veces por triplicado en gotas de 20 µl en ATS las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} -y 10^{-5} . Las UFC se contaron 72 horas después.

5.18. Ensayo de adhesión en células HeLa

Se partió de cultivos independientes con cada una de las bacterias que se ensayaron tras haberse crecido por 16 horas en CTS. Posteriormente se cuantifica el número de bacterias que hay en el cultivo mediante absorbancia a 420 nm. Se realizó los cálculos para obtener una MOI de 100 en medio DMEM+ 5% FBS en 500 µl de volumen final de cultivo que se le agregó a cada pozo con células HeLa a una confluencia de 90%. Luego de hecho esto, se

tomaron los pocillos con las células y se hacen 3 lavados con 1 ml en cada pozo con PBS 1X. Luego se agrega 500 μ l de la cepa bacteriana a ensayar y se centrifuga 5 minutos a 1600 rpm a 4 °C parando sin freno. Posteriormente, se incuba 3 horas a 4 °C. Luego de la incubación se lavó 6 veces con 500 μ l de PBS 1X cada pocillo y luego se lisaron las células con 500 μ l de Tritón 0.1% a cada pocillo y esperando que actúe 10 minutos a temperatura ambiente. El contenido del pozo se pasó a un tubo de microcentrífuga tomándose 50 μ l del mismo para hacer diluciones seriadas 1 en 10. De cada una de estas diluciones se plateó por duplicado 100 μ l en gotas largas en placas de ATS incubándolas 72 horas a 37°C para hacer el debido conteo. A manera de control, se hizo inmunofluorescencia doble para verificar la ubicación de las bacterias.

Adicionalmente, se realizó un ensayo de adhesión competitivo, el cual se basa en la misma metodología, solo que las células eucariotas son expuestas a combinaciones de bacterias, con el propósito de evaluar si hay un fenómeno de desplazamiento por competencia.

5.19. Infección de macrófagos y células HeLa.

Se inició con un cultivo de 16 horas en CTS de cada una de las bacterias por ensayar. Se cuantifica por absorbancia a 420 nm. Luego se realizaron los cálculos para obtener una solución que tenga una MOI de 100 en 10 ml de DMEM + 5 % de FBS para macrófagos RAW y de 500 para células HeLa. Cada pozo con células en una confluencia de 90% evaluada mediante observación de 10 campos al aleatoriamente utilizando microscopía invertida. Se lavó tres veces con 1 ml de PBS 1X y luego se le colocó 500 μ l de la solución con cada una de las bacterias por ensayar. Posteriormente, se centrifugó 5 minutos a 1600 rpm a 4°C sin freno. Luego se incubó 30 minutos a 37 °C. Después de la incubación se lavó

3 veces con 500 μ l de PBS 1X cada pocillo. Se agregó 500 μ l de medio DMEM + 5% FBS + 100 μ g/ml de gentamicina a cada pocillo y se incubó una hora. Se sustituyó el medio por DMEM + 5% FBS + 5 μ g/ml de gentamicina y se incubó en diferentes intervalos de tiempo según se necesitó. Para cosechar, se lavaron los pozos 3 veces con 1 ml de PBS 1X y se colocaron 500 μ l de PBS 1X + Tritón 0,1% incubando 10 minutos. Luego se raspó y se colocó todo el contenido del pocillo en un tubo y se hicieron diluciones seriadas 1/10, plateando por triplicado gotas de 20 μ l de cada dilución en ATS. Posteriormente, se realizaron conteos para determinar las UFC y se graficó el resultado.

5.20. Inmunofluorescencia Simple

Las células de las 3 cepas bacterianas *B. abortus* 2308W, *B. abortus* 2308W Rev34 así como *B. abortus* 2308W Δ Amp160 fueron puestas a crecer sobre un cubreobjetos localizado en el fondo de un pozo, y fueron expuestas al mismo proceso de crecimiento e infección al que se pusieron las células de los experimentos con macrófagos y células HeLa. Se lava el pozo tres veces con PBS 1X, para posteriormente agregar 500 μ l de paraformaldehído al 3,5% el cual se deja actuar durante 10 minutos. Después de esto, se agrega 500 μ l de NH_4Cl el cual se mantiene durante 10 minutos. Luego, para permeabilizar la membrana de la célula eucariota se agrega tritón al 0,1% por 10 minutos. Luego se saca el cubreobjetos del pocillo con una pinza y se pone vuelto hacia abajo en contacto directo con una gota de 50 μ l de una solución de suero de caballo con 10% de anticuerpo anti *Brucella* hecho en vaca y marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) diluido 1/150 dejando que se una durante 30 minutos. Luego se lava de manera seriada 30 veces en 3 beakers con PBS, el primero de ellos con Tritón al 0,1%. Finalmente, se seca en servilleta y se pone en un portaobjetos con Prolog® + DAPI y se deja secar a 37°C protegido de la luz

directa. Se almacena luego en un lugar oscuro y a 4°C para su posterior observación mediante microscopía de fluorescencia.

5.21. Inmunofluorescencia doble

Las inmunofluorescencias dobles fueron hechas con las células de las 3 cepas *B. abortus* 2308W, *B. abortus* 2308W Rev34 así como *B. abortus* 2308W Δ Amp160 crecidas sobre cubreobjetos de vidrio (12 mm) y procesadas con el mismo protocolo del ensayo de adhesión anteriormente descrito. Para esto, se lavaron las células tres veces con PBS 1X. Se colocó en cada pozo 300 μ l de DMEM + anticuerpo anti *Brucella* hecho en vaca y marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) 1/150 dejando el anticuerpo unirse durante media hora en hielo. Luego se lavó tres veces con PBS 1X, se colocó 500 μ l de paraformaldehído al 3,5% dejándolo actuar durante 10 minutos. Posteriormente, se puso 500 μ l de NH₄Cl y se deja actuar 10 minutos, para permeabilizar se agregó luego 500 μ l de Tritón 0,1% durante 10 minutos. Luego se colocó una gota de 50 μ l de suero de caballo al 10% con anticuerpo anti *Brucella* hecho en conejo y marcado con 1/200 y se incubó durante media hora. Luego se lavó de manera seriada 30 veces en 3 beaker con PBS el primero de ellos con Tritón al 0,1%. Luego se coloca en una gota de 50 μ l de anticuerpo anticonejo hecho en cabra con el fluorocromo Alexa Fluor® 594 (Invitrogen), dejándolo en la solución por 30 minutos. Finalmente, se secó en una servilleta y se puso en un portaobjetos con Prolog R + DAPI y se dejó secar a 37°C protegido de la luz directa. Se almacenó luego en un lugar oscuro y a 4°C. Posteriormente, se realizaron conteos mediante microscopía de fluorescencia.

5.22. Obtención de bacterias intracelulares

Macrófagos RAW 264.2 infectados con las cepas de *B. abortus* 2308W, *B. abortus* 2308WRev34, *B. abortus* 2308W Δ Amp160 y *B. abortus* 2308W Δ Amp160+Amp160 fueron incubados por 4 horas. Posterior al tiempo de incubación, las células se lavaron con PBS 1X y se desprendieron del plato de cultivo con un raspador de células. La suspensión de células se centrifugó a 4 000 rpm a 4°C. El precipitado de células se resuspendió en sucrosa 0.3 M (Lamontagne et al., 2009). Con el propósito de romper las células y con ello liberar las bacterias intracelulares esta solución se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente a una presión correspondiente a 300 psi con nitrógeno en un contenedor de disrupción de células. Al lisado de células se le agregó benzonasa para degradar el ADN. La preparación fue depositada sobre una solución de sucrosa 0.8 M que fue centrifugada a 500× g por 5 minutos. El sobrenadante se resuspendió en una solución de imidazol 3 mM y se colocó sobre un gradiente de sucrosa de 1.5 M a 0.8 M el cual se centrifugó a 50 000 × g obteniéndose en el botón las bacterias intracelulares. Dicho botón fue congelado a -70°C para ser utilizado posteriormente (Lamontagne et al., 2009).

5.23. Infecciones en ratones

Se tomaron cultivos bacterianos de cada una de las cepas a ensayar (*B. abortus* 2308WRev34, *B. abortus* 2308W Δ Amp160 y *B. abortus* 2308W Δ Amp160+Amp160) tras 17 horas de crecimiento según las condiciones que se describen al inicio de la sección de materiales y métodos. Se determinó el número de UFC utilizando como base la absorbancia a 420 nm. Tras esto, se hicieron las diluciones necesarias para tener un total de un millón de bacterias en 100 μ l de solución PBS 1X. Se realizó la infección de los ratones por vía

intraperitoneal y se sacrificaron en diferentes intervalos de tiempo post infección. Para hacer la determinación de UFC por gramo de bazo del ratón, se cosecharon los mismos haciendo una incisión en la región abdominal tras desinfectar la piel del animal con alcohol a 70%. Una vez obtenidos los bazos, se pesó cada uno de manera individual con el propósito de determinar la cantidad de PBS1X Triton 0,1% por utilizar para hacer una dilución 1 en 10. Luego se hicieron diluciones seriadas y se platearon gotas de 20 μ l por triplicado de cada dilución en ATS para 72 horas después contar las UFC y determinar la replicación bacteriana mediante un gráfico.

5.24 Permiso para el uso de animales

Todos los experimentos realizados se sometieron a consideración de la Comisión de Bienestar Animal de la Escuela de Medicina Veterinaria de Universidad Nacional, en donde se aprobó el uso de los animales en las diferentes etapas de experimentación según consta en el oficio FCSA-EMV_CBAB-009-2015.

5.25 Análisis estadísticos

Los resultados se reportarán con el promedio \pm la desviación estándar y las diferencias significativas se analizarán con la prueba de t de Student para comparar las medias de dos poblaciones. Para probar la normalidad de los datos, se utilizará el método de Anderson Darling. Por otro lado, con el propósito de demostrar que la varianzas son iguales se utilizará el estadístico de Levene. Cuando se vayan a comparar más de dos grupos se realizará un análisis de variancias específicamente Turkey. Se tomará un nivel de significancia estadística de < 0.05 o 0.005 dependiendo del caso.

6 Resultados

6.1. Verificación y caracterización de una mutante en el gen *amp160* de *Brucella abortus* 2308W

El mutante de *B. abortus* Amp160 muestra una delección casi completa de *amp160*, que va desde el nucleótido de la posición 50235 a la posición 54797, constituyendo una delección de 4561 pb desde el residuo de aminoácido 1 al 1486 (delección del 99,6% de los nucleótidos). Una vez identificado el clon mutante, se sometió su ADN a una serie de PCR adicionales que permitieron confirmar la delección del gen de interés con más precisión. Adicionalmente, durante el tamizaje del clon mutante se seleccionó también el revertante, que fue aquel que haya sufrido los mismos pasos de manipulación en laboratorio que la mutante, pero que conserva el gen en cuestión íntegro. Además, para una confirmación adicional se realizó un Southern Blot con el ADN del clon mutante, un clon revertante (*B. abortus* 2308W Rev34) y *B. abortus* 2308W el cual es la cepa silvestre (Fig 4) en donde se observa que el ADN del clon mutante migró más rápido debido a que la delección hace que tenga un mejor tamaño. En la figura 5, se puede observar que no existió ningún tipo de alteración en el marco de lectura del genoma de la cepa mutante tanto en la región del extremo 5' así como en el de la región 3'. Además se puede apreciar que la cepa mutante en el interior de los puntos de delección tampoco presenta ninguna inserción o delección.

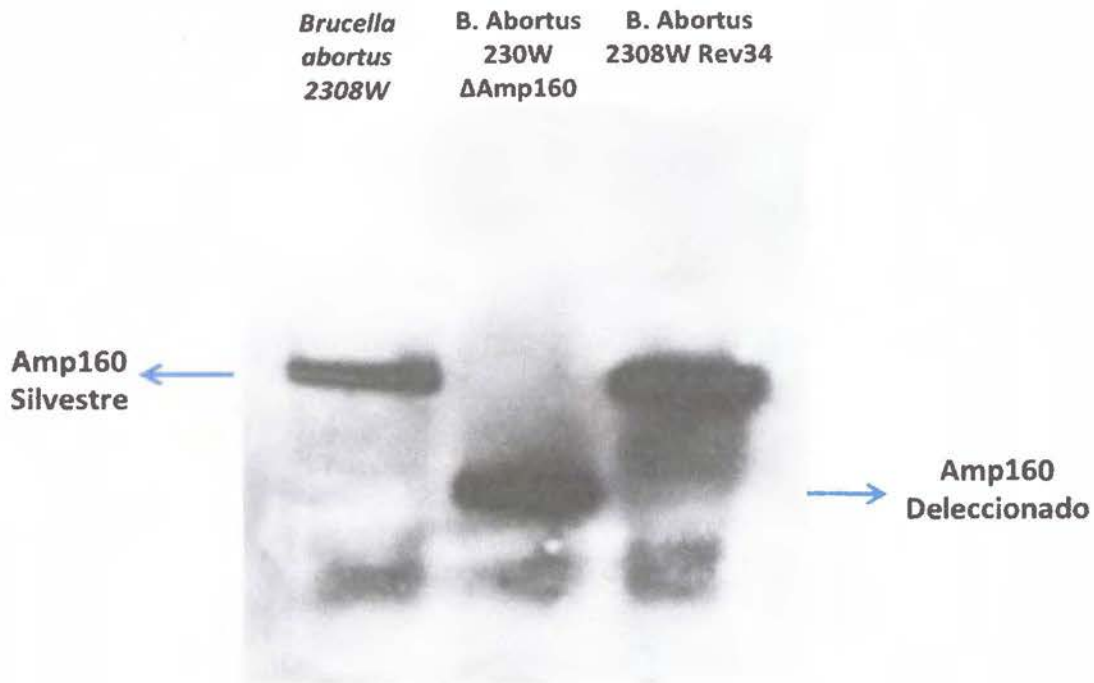


Figura 4: Southern Blot mostrando la deleción del gen *amp160*. ADN genómico de cada una de las cepas a evaluar fue purificado y digerido con la enzima XbaI. Posteriormente, tras una electroforesis en agarosa, se hizo un ensayo de hibridación con la sonda de 201 pb generada con los cebadores F1-R2. Como se observa en la imagen, el ADN de la cepa mutante migró más rápido, debido a la deleción, que las otras dos cepas que presentan el gen silvestre.

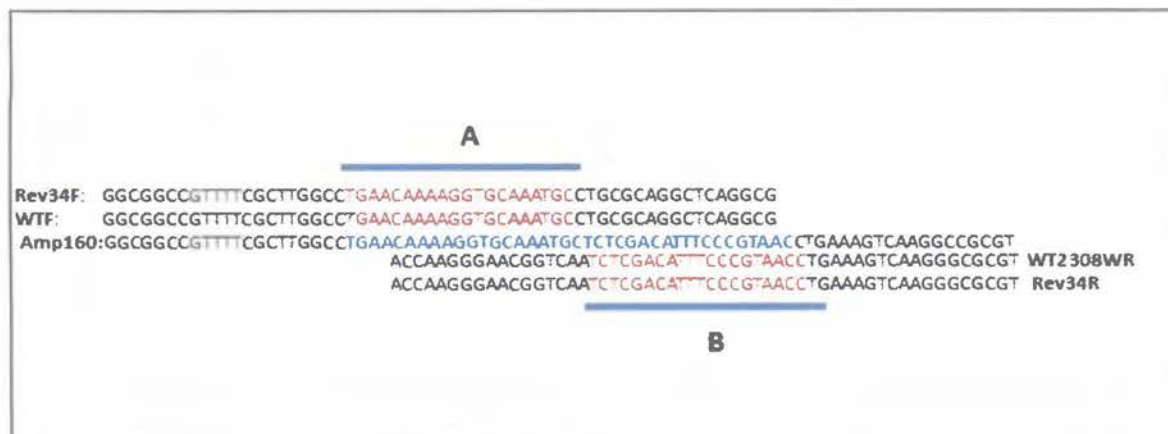


Figura 5: Secuencia de las cepas *Brucella abortus* 2308W (WT2308W), *B. abortus* 2308W Revertida Salvaje (Rev34) y Mutante de Amp160 (Amp160). Se secuenciaron las regiones extremas 5' y 3' involucradas en la técnica para realizar la delección. Como muestra la imagen, la secuencia de la cepa mutante corresponde a la unión del segmento A y B, donde se observa que no se dio la inserción o delección de ningún nucleótido. Adicionalmente, se observa que no hay inserciones o delecciones en los extremos 5' y 3' en ninguna de las cepas.

6.2 *B. abortus* 2308W Δ Amp160 no expresa la proteína Amp160

Como lo muestra la Figura 6, el dominio de DUF490 se purificó y se utilizó para obtener anticuerpos policlonales hechos en conejo. Estos anticuerpos se utilizaron para hacer un WB con lisados totales de bacterias intracelulares tras 4 horas de infección en macrófagos el cual es un punto conocido en el que la expresión de Amp160 es máxima (Lamontagne et al., 2007). Como se observa en la figura 7, *B. abortus* 2308W, *B. abortus* 2308W Rev34, así como la cepa mutante complementada, producen una proteína de alto peso molecular de

cerca 160 kDa, mientras que *B. abortus* 2308W Δ Amp160 es incapaz de producir dicha proteína bajo estas condiciones. Este resultado además demuestra que la cepa complementada produce la proteína Amp160 que está clonada en un vector, a pesar de no tener el gen que codifica por ella cromosomalmente.

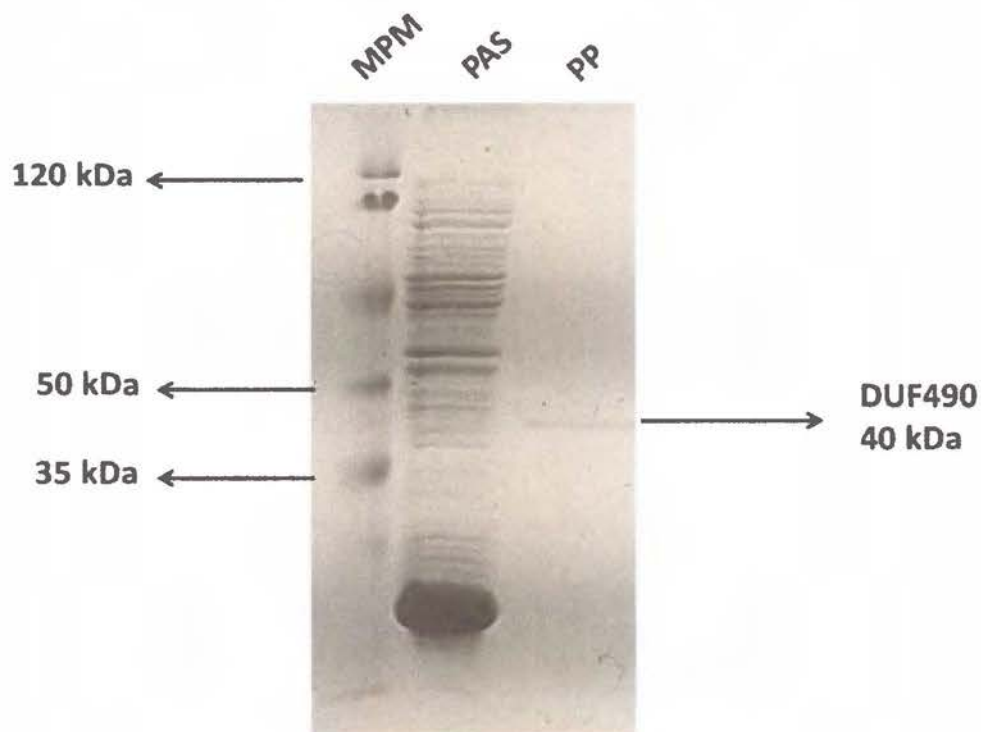


Figura 6: SDS PAGE mostrando el péptido DUF490 utilizado en la inmunización de un conejo para la generación de un anticuerpo contra la proteína Amp160. MPM: Marcador de peso molecular SM 26612 de Fermentas®. PAS: lisado bacteriano total de *Escherichia coli* BL21AI con el plásmido pDest17DUF490 tras 4 horas de inducción con L-arabinosa. PP: péptido 6HYS-DUF490 de 40 kD tras ser purificado con el sistema Ni-NTA de Qiagen®.

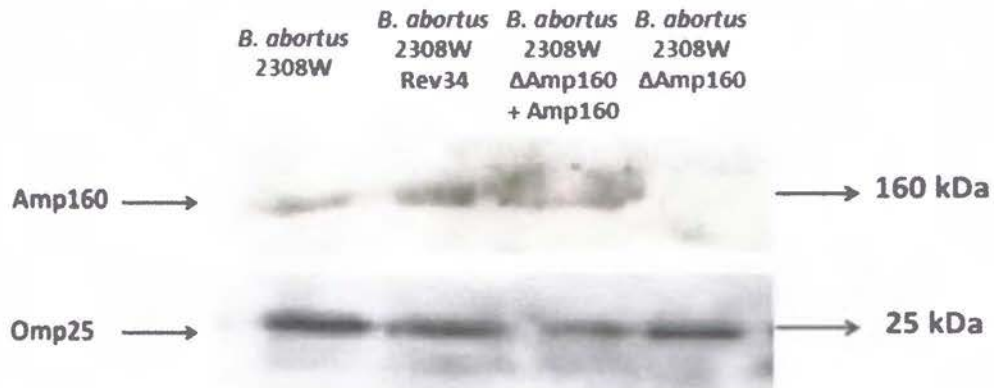


Figura 7: WB evidenciando la proteína Amp160 a partir de lisados de bacterias tras 4 horas vida intracelular. Se purificaron bacterias tras 4 horas de infección en macrófagos RAW. Los lisados de estas bacterias fueron separados por SDS-PAGE y se realizó un WB para ver la expresión de Amp160 con un anticuerpo policlonal.

6.2. La mutante de Amp160 presenta un LPS liso

La figura 8 muestra la tinción de plata del LPS purificado de las cepas *B. abortus* 2308W y *B. abortus* 2308W Δ Amp160 tras ser corrido en un gel de SDS-PAGE. Como se observa en la misma ambos lipopolisacáricos presentan la porción superior que es la porción lisa del LPS así como una inferior que corresponde a la región rugosa. Adicionalmente, se analizaron clones directamente crecidos en ATS mediante aglutinación con el colorante

acriflavina siendo todos lisos. Así mismo, por medio de la técnica de cristal violeta se evaluó el LPS de las dos cepas, obteniéndose en ambos casos un 100% de bacterias con LPS liso. Estos datos muestran que la mutación en el gen BAW_10046 no está involucrada en la síntesis del LPS en *Brucella abortus* 2308W.

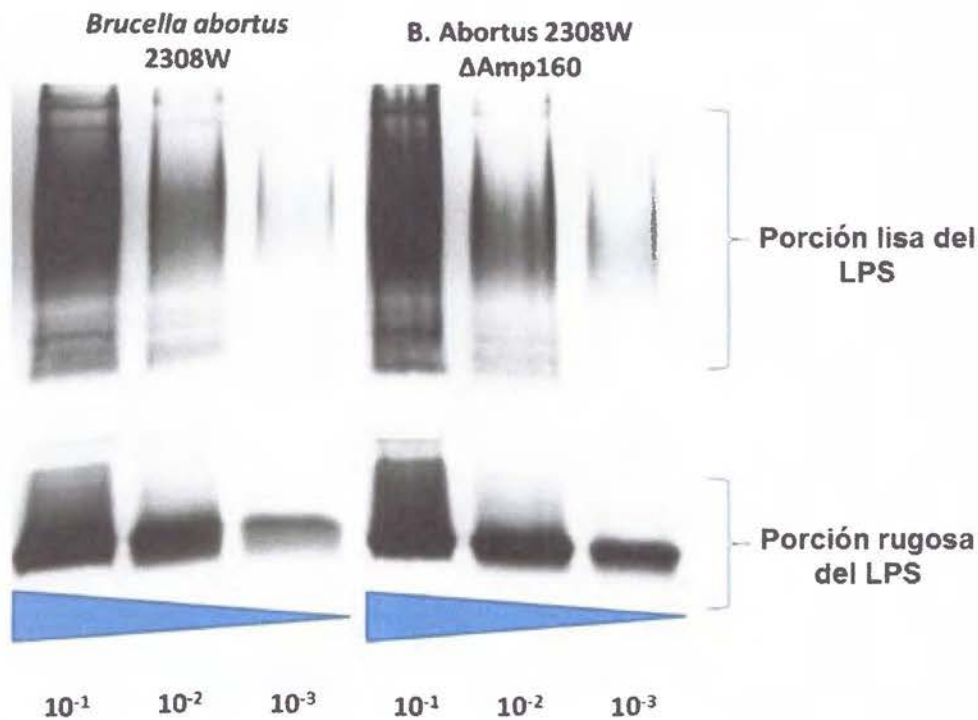


Figura 8: Tinción de plata del LPS de las cepas estudiadas tras diluciones seriadas.

A: El LPS de las cepas de estudio fue extraído, luego separado por SDS-PAGE y teñido con una tinción de plata específica para carbohidratos. En la imagen se observa una región superior que corresponde a la porción lisa del LPS y una inferior perteneciente a la porción rugosa.

6.3 La mutante de Amp160 no presenta deficiencias de crecimiento *in vitro*

Se desarrollaron curvas de crecimiento en CTS. Como se observa en la Figura 9, las cepas de *Brucella abortus* 2308W, *B. abortus* 2308W Rev34, *B. abortus* 2308W Δ Amp160 y *B. abortus* 2308W Δ Amp160+Amp160 presentan la misma dinámica de replicación. Este comportamiento observado sugiere que bajo estas condiciones Amp160 no es necesaria para que la bacteria tenga una replicación normal en cultivos bacteriológicos.

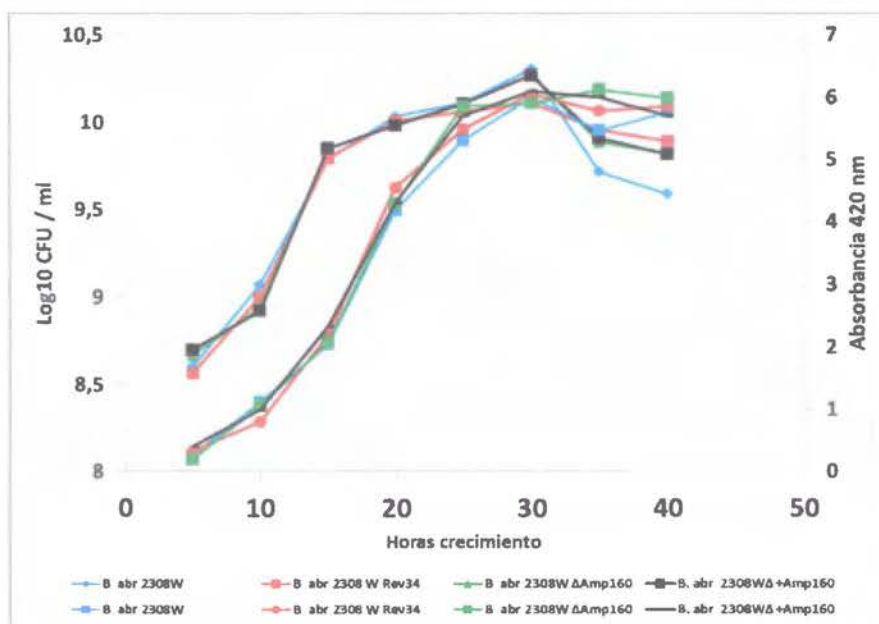


Figura 9: Dinámica de replicación de las diferentes cepas de *Brucella abortus* 2308W en medio CTS durante el tiempo. Eje vertical izquierdo: conteo UFC en placas. Eje vertical derecho: Absorbancias a 420 nm.

6.4 El perfil de fermentación de la cepa mutante permanece invariable

Se evaluó el perfil de fermentación de las cepas *B. abortus* 2308W, *B. abortus* 2308W Rev34 y *B. abortus* 2308W Δ Amp160. En el caso que un carbohidrato fuese utilizado como fuente de energía se produciría una acidificación del medio con un consecuente viraje en el color del mismo (paso de color rojo a amarillo). En este caso, las 3 cepas evaluadas presentaron cambio de color en los pocillos que contenían Eritritol, L-arabinosa, Galactosa, Esculina y D-Fucosa, lo que indica que la ausencia del gen *amp160* en la cepa mutante no afecta la capacidad de las misma para fermentar los mismos carbohidratos que utilizan las cepas silvestres en el sistema API 50CH.

6.5 Perfil de ácidos grasos de membrana

Como se observa en la figura 10 la cepa *B. abortus* 2308W Δ Amp160 forma un mismo grupo junto a las cepas *B. abortus* 2308W Rev34 y *B. abortus* 2308W, dicho grupo se encuentra separado de otras cepas como *B. neotomae* y *B. canis*. Esto demuestra que la deleción del gen *amp160* no altera la síntesis de ácidos grasos de la membrana de la cepa mutante de manera significativa.

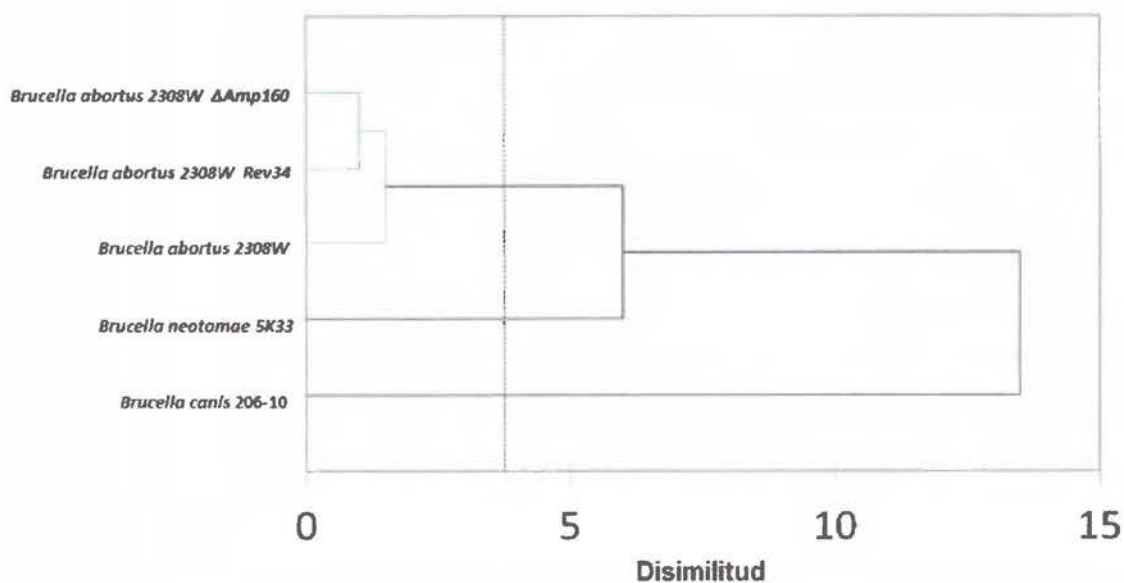


Figura 10: Agrupamiento de las diferentes cepas estudiadas según la detección de ácidos grasos de membrana. La detección de ácidos grasos permitió generar un patrón de código binario el cual se utilizó para la construcción de la figura en donde se agruparon especies evaluadas según el coeficiente de disimilitud.

6.6. Caracterización de la membrana externa

6.6.1. Sensibilidad a los péptidos catiónicos

Las bacterias del género *Brucella* son resistentes a la polimixina B, por lo que un cambio en la morfología de la membrana externa podría observarse como una pérdida de esta propiedad innata (Martinez de Tejeda et al., 1995). Como se observa en la figura 11, las cepas *B. abortus* Δ Amp, así como la *B. abortus* 2308W Rev34 presentan la misma susceptibilidad que la cepa silvestre *Brucella abortus* 2308W, tanto a pH 6 como a pH 7. A menor pH la CMI del antibiótico fue en todas las cepas de 62,5 ng/ μ l mientras que a pH 7 fue de 4 ng/ μ l a las 72 horas.

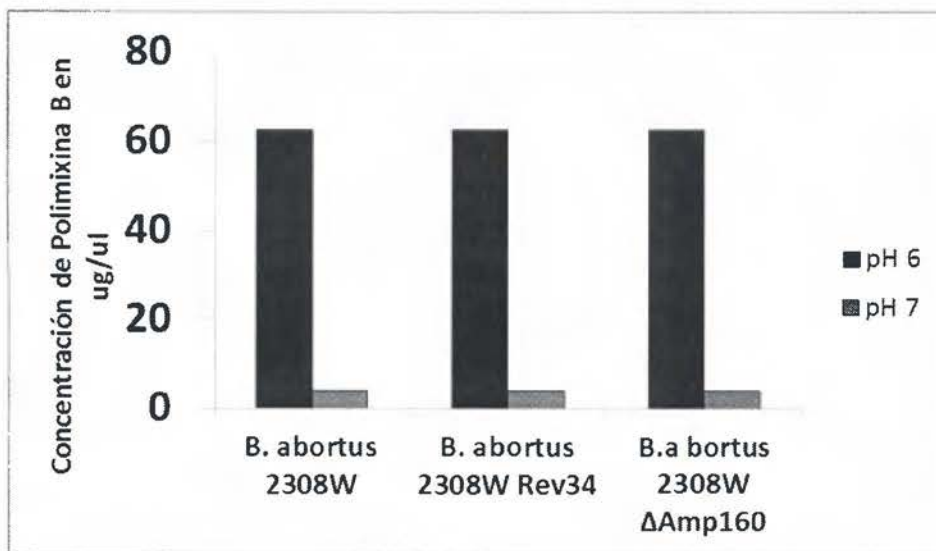


Figura 11: Sensibilidad de las diferentes cepas evaluadas a la polimixina B. Las cepas fueron crecidas en ATS a pH 6 y 7 en concentraciones crecientes del antibiótico.

6.6.2. Sensibilidad al complemento

Las bacterias Gram negativas tienden a ser resistentes al efecto lítico que ejercen las proteínas del complemento sobre la membrana de las bacterias. Se ha reportado que *B. abortus* puede ser capaz de activar la vía clásica del complemento, sin embargo, los complejos de ataque de membrana que se generan no poseen la capacidad de formar asociaciones estables con las superficies bacterianas. Como se observa en el gráfico de la figura 12, tanto la cepa mutante así como la cepa silvestre *Brucella abortus* 2308W presentan la misma tasa de sobrevivencia tras ser expuestas a la acción lítica del complemento, lo que indica que la deficiencia de la proteína Amp160 no causa alteraciones en la membrana que aumenten la susceptibilidad de la bacteria este efecto.

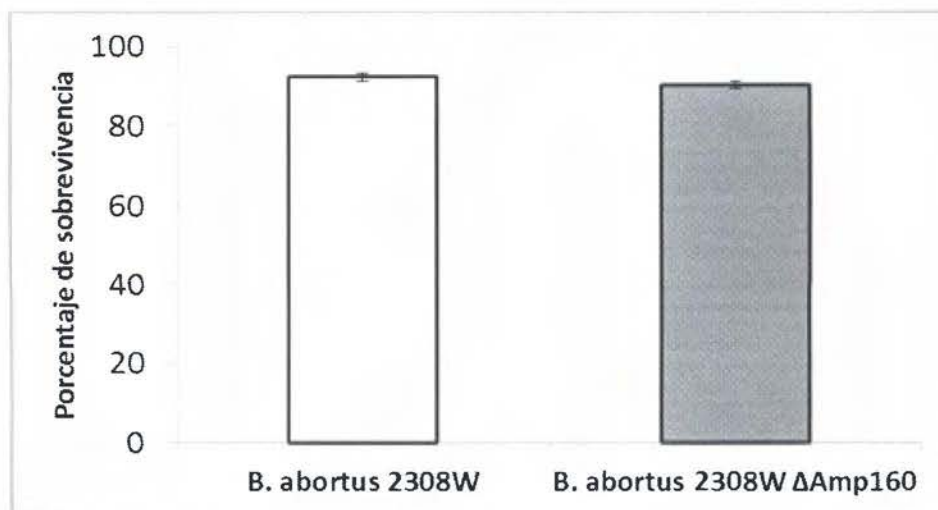


Figura 12: Sensibilidad de las cepas estudiadas a la actividad lítica del complemento. Las cepas fueron expuestas al suero humano de personas no inmunizadas para constatar la resistencia a la actividad lítica del mismo. Posteriormente, se realizaron diluciones y se platearon en medio ATS para determinar las UFC.

6.6.3. La expresión de las principales proteínas de membrana externa no se afecta significativamente en ausencia de Amp160

Tras evaluar la expresión de las proteínas de membrana externa (OMPs) a partir de los lisados de cultivos extracelulares a las 16 y 20 horas de crecimiento, se observó que no hubo diferencias marcadas de la expresión de las OMPs (Fig 13). Estos resultados sugieren que la ausencia de la proteína Amp160 en la mutante no se ve compensada con un aumento de expresión de alguna proteína de membrana externa, las alteraciones observadas fueron leves y corresponden a una disminución de OMP 16 a las 20 horas y de OMP25 a las 16 horas en la cepa mutante, así mismo se observó una disminución de OMP19 en la cepa *B. abortus* 2308W.

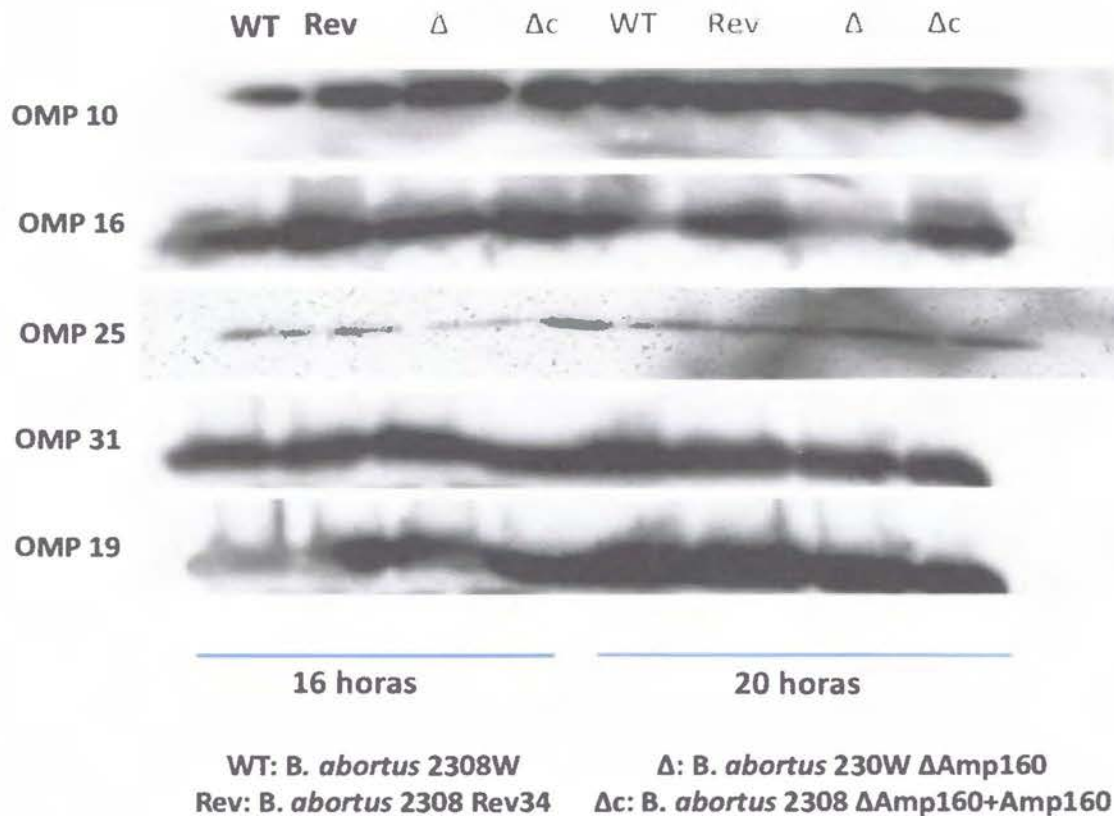


Figura 13: Expresión de proteínas de membrana externa de las cepas ensayadas en fase logarítmica (16 horas) y en fase logarítmica tardía (20 horas). La utilización de anticuerpos monoclonales permitió evaluar la expresión de diferentes proteínas de membrana externa en los diversos puntos de la curva de crecimiento de las cepas evaluadas.

6.7. La ausencia de Amp160 no afecta la sobrevivencia de *B. abortus* en neutrófilos humanos

Para evaluar la capacidad de sobrevivencia intracelular, las cepas *Brucella abortus* 2308W Rev34 y *Brucella abortus* 2308W Δ Amp160 fueron sometidas a un ensayo de fagocitosis por neutrófilos humanos. Como se observa en la figura 14, no hay diferencias entre la cepa

mutante y el revertido salvaje lo que evidencia que la ausencia de Amp160 no genera ningún tipo de susceptibilidad a neutrófilos, la que se manifestaría como un menor porcentaje de sobrevivencia.

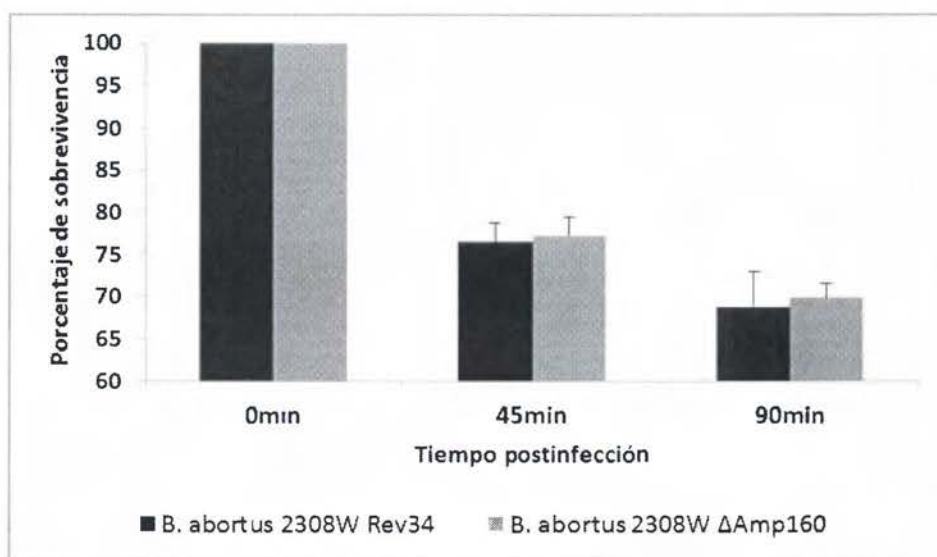


Figura 14: Sobrevivencia de las diferentes cepas de *Brucella* a la acción lítica de neutrófilos humanos. Se realizaron conteos de las diferentes cepas a los 0, 45 y 90 minutos de infección y se estableció su porcentaje de sobrevivencia.

6.8 La ausencia de Amp160 no afecta la adhesión a células HeLa de *B. abortus*.

Los conteos de las bacterias asociadas a las células HeLa no mostraron diferencias entre las tres cepas (Figura 15^a). Además el promedio de bacterias asociadas por célula es similar entre las tres cepas evaluadas (Figura 15 B). Para corroborar que los conteos totales corresponden sólo a bacterias adheridas extracelulares se realizó una inmunofluorescencia doble, como se muestra en la Fig 15 las bacterias en su mayoría están fuera de la célula y no dentro de la misma. En la figura 16 se muestra que la mutante de Amp160 es capaz de desplazar a la cepa silvestre *Brucella abortus* 2308 GFP cuando se aumenta su MOI a 50, manteniendo una proporción de 50% células no GFP versus 50 % células con GFP. Además, al aumentar la MOI de la cepa mutante a 100 se pierde la proporción 50/50 lo que corrobora que esta mutante es competente para adherirse a las células epiteliales HeLa, de la misma manera que lo hacen sus contrapartes *B. abortus* 2308W Rev34 y *B. abortus* 2308W.

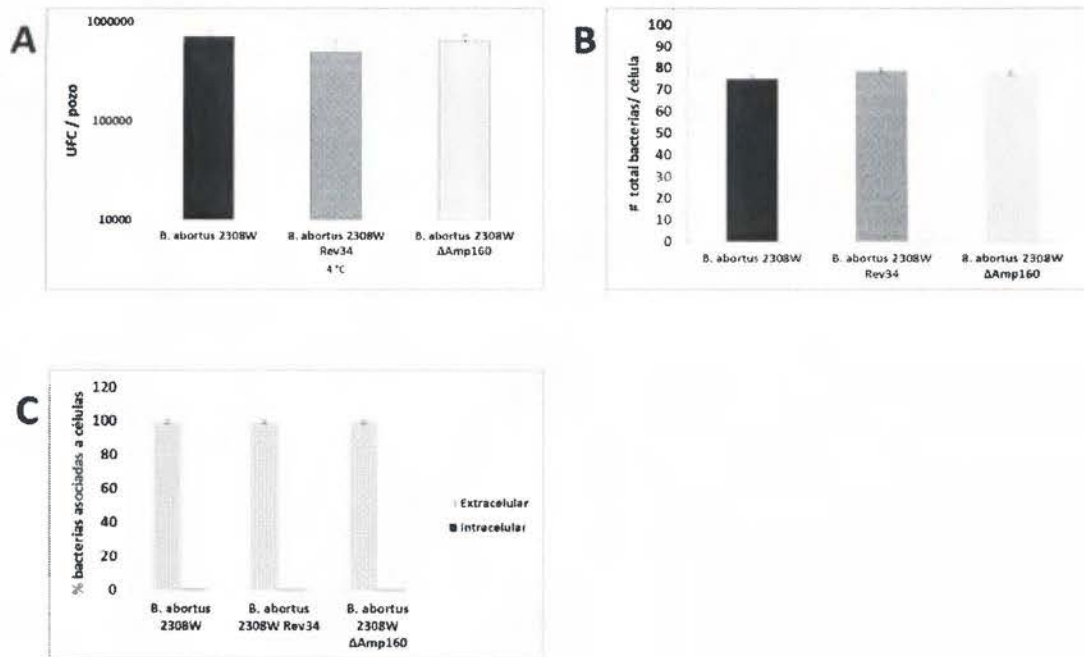


Figura 15: Ensayo de adhesión bacteriana de las cepas en estudio a la superficie de células epiteliales HeLa. A: UFC totales por cada pozo de células. B: número de bacterias promedio asociadas a cada célula epitelial. C: Porcentaje de bacterias extracelulares e intracelulares asociadas a cada célula.

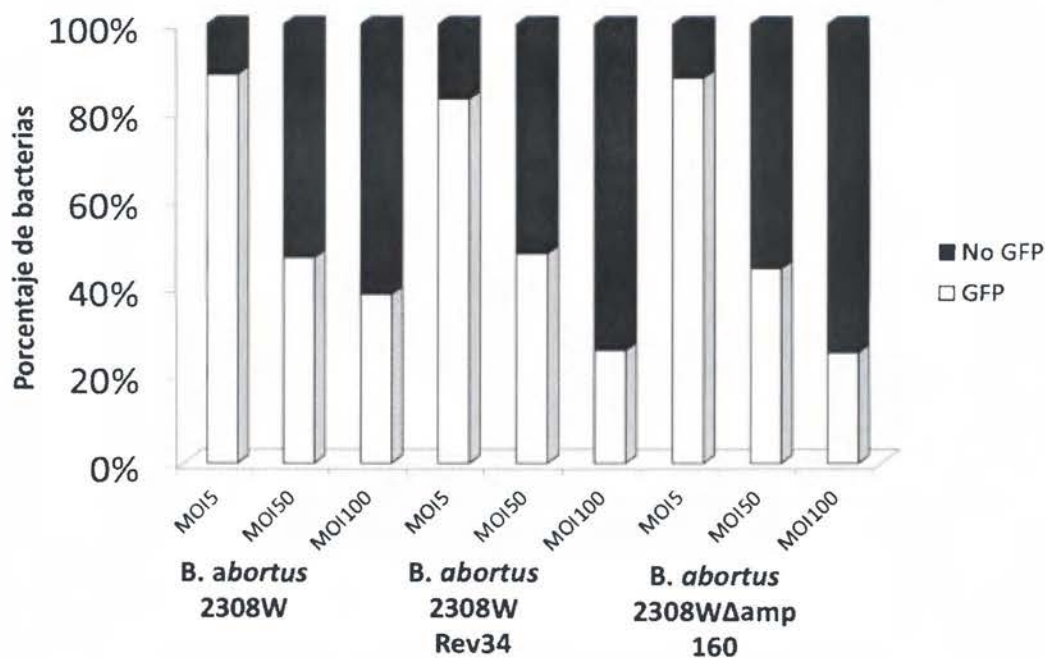


Figura 16: Ensayo de adhesión competitiva. Manteniendo una MOI fija de 50 para la cepa *B. abortus* 2308GFP, se evaluó la capacidad de competir por los receptores en la superficie de la célula HeLa de cada una de las cepas de interés aumentando de manera progresiva la MOI de las mismas de 5, 50 y luego 100, para evaluar si existe capacidad de competir de las cepas evaluadas con respecto a la cepa control la cual es verde fluorescente.

6.9 La replicación intracelular en células HeLa y macrófagos Raw de *B. abortus* no se altera en ausencia de Amp160.

Al hacer una curva de replicación intracelular en células HeLa, se observa que no hay diferencias en la replicación entre las tres cepas ensayadas en ninguno de los tiempos de infección (Fig 17A). Así mismo se observa que el porcentaje de células infectadas es el

mismo (figura 17B). Se hizo este experimento con una MOI menor en macrófagos, obteniéndose resultados similares (Figuras 17 C y D). Lo anterior indica que a pesar de que esta línea celular tiene mayor capacidad de destruir las bacterias, la mutación en el gen *amp160* no interfiere con la supervivencia de las mismas.

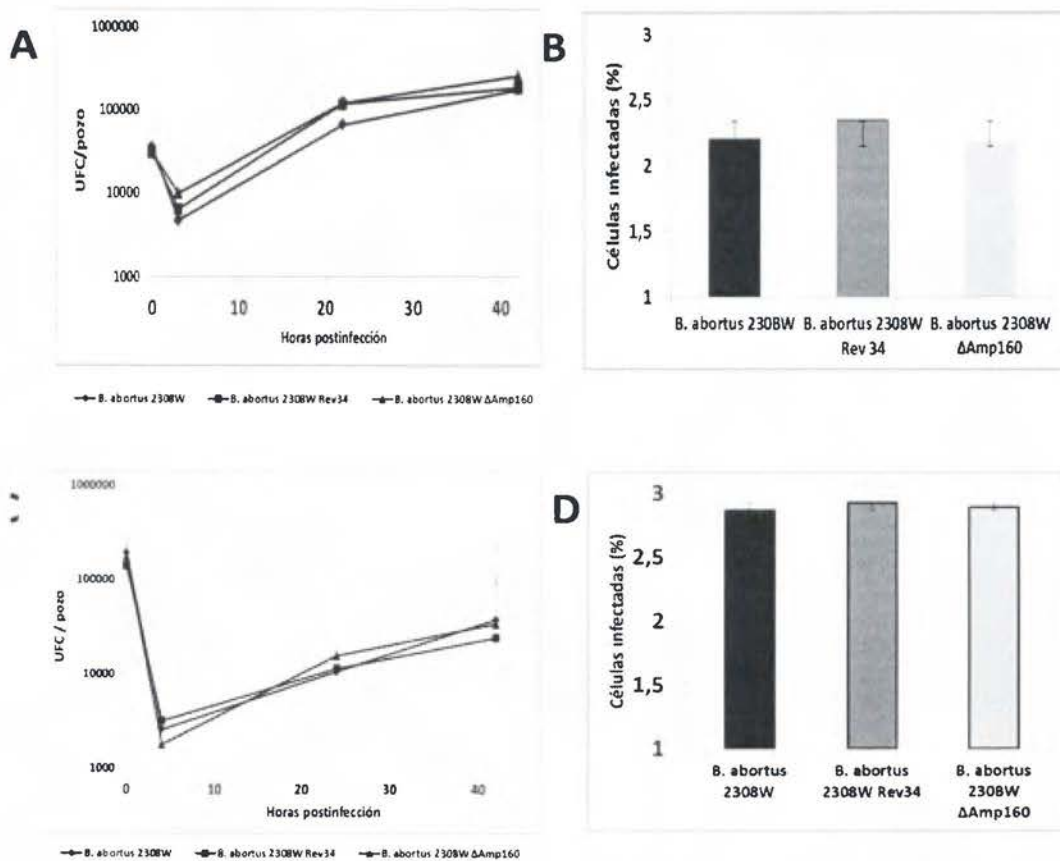


Figura 17: Dinámica de replicación de las diferentes cepas evaluadas en células Hela (A) y macrófagos RAW (C). Se cosecharon las bacterias a las 0, 4, 24 y 48 horas postinfección y se realizó la determinación de UFC para establecer la dinámica de replicación. Además se muestran los porcentajes de infección de cada cepa bacteriana en células Hela (B) y macrófagos RAW (D).

6.10. Los mutantes de *B. abortus* 2308W en Amp160 son atenuados en ratones

Debido a la ausencia de un fenotipo en la replicación intracelular tanto en células HeLa así como en macrófagos RAW se decidió realizar una infección en ratones con el propósito de dilucidar si la carencia de Amp160 en *B. abortus* 2308W genera un efecto en la sobrevivencia de la bacteria in vivo. Al observar las UFC a las 3 y 9 semanas postinfección se logra apreciar que la cepa que posee la mutación en Amp160 se encuentra atenuada ya que presenta una reducción de cerca de un logaritmo en el conteo general en comparación con la cepa control *B. abortus* 2308W Rev34 (ver Figura 18). Para demostrar que el efecto se debe a la mutación en este gen, se realizó una infección con la cepa complementada que consiste en la cepa mutante que lleva un plásmido que expresa el gen BAW_10046, sin embargo la complementación no se dio pues ésta también presenta atenuación. Estos resultados muestran que Amp160 es vital para la virulencia de *B. abortus* 2308W pues sin la proteína la bacteria disminuye su sobrevivencia con el paso del tiempo en el modelo murino.

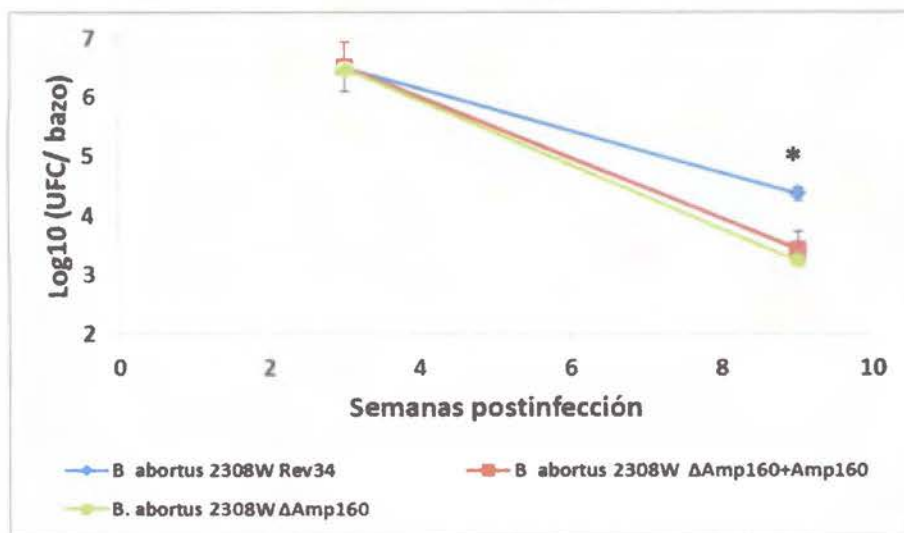


Figura 18: Dinámica de replicación de las cepas en estudio en ratones BALB/c. Ratones fueron infectados con 1×10^6 UFC de cada una de las cepas bacterianas a ensayar y sacrificados en grupos de 5 a las 3 y 9 semanas postinfección para determinar el número de UFC por gramo de bazo. * Diferencias estadísticamente significativas $p < 0,05$.

7. Discusión

Al existir estudios previos que señalaban que Amp160 aumentaba su expresión tras 3 horas de vida intracelular en *Brucella abortus* 2308 permaneciendo sobreexpresada aún tras 44 horas de infección (Lamontagne *et al.*, 2009) y que además dicha proteína estaba bajo el control del sistema de dos componentes más estudiado en esta especie BvrR/BvrS (Lamontagne *et al.*, 2007; Castillo-Zeledón, datos sin publicar). Así mismo, aun existiendo evidencia que apuntaba que esta proteína era de importancia para la virulencia (Wu *et al.*, 2006; De Bolle *et al.*, 2008) se decidió investigar mediante la creación de una mutante por delección en el locus BAW_10046 codificante de Amp160, el rol de esta proteína en la virulencia de *B. abortus* 2308W, pues ninguno de estos estudios utilizaba una técnica de mutación en donde se elimine por completo el gen en estudio. Amp160 es una proteína de alto peso molecular (160 000 D) conocida como TamB. Al consultar la literatura, se menciona que TamB es una proteína periférica asociada a la membrana interna de bacterias como *Citrobacter rodentium* y *Salmonella enterica* y que está ampliamente distribuida dentro del grupo de las proteobacterias (α -, β -, γ -, δ - and ϵ -) encontrándose siempre en un operón con una proteína codificada corriente arriba de ésta, conocida como TamA (Selkrig *et al.*, 2012). Amp160 en *B. abortus* 2308 es muy abundante en los blebs, por lo que es posible que su ubicación sea periplásmica (Lamontagne *et al.*, 2007).

Al tratarse Amp160 de una proteína que tiene asociación con la membrana bacteriana se debe evaluar qué efecto tiene la carencia de la misma en cuanto a si existe alguna alteración o fenómeno de compensación al eliminarla. Observando los resultados obtenidos con el propósito de evaluar esto, no se encontraron alteraciones evidentes en el LPS, ácidos grasos, sensibilidad al complemento o polymixina B, lo que sugiere que en ausencia de

Amp160, la membrana externa de *B. abortus* no sufre mayores cambios detectables por estas técnicas excepto por unas leves variaciones en los niveles de las OMPS. No obstante, dichos cambios no se pudieron observar en los dos puntos de la curva evaluados (16 y 20 horas) lo que sugiere que no es una compensación persistente a lo largo del tiempo. Adicionalmente, no se observaron diferencias importantes en la curva de crecimiento de la cepa mutante, ni mutante complementada *in vitro*, lo que podría indicar que Amp160 no es necesaria para la replicación bacteriana, además muestra que el hecho de tener la cepa complementada un plásmido que expresa Amp160 no genera una dificultad de crecimiento. Se puede concluir a partir de esta observación, que el papel de Amp160 no está involucrado en el crecimiento y desarrollo celular. Además, no hay diferencias metabólicas entre la cepa mutante y *B. abortus* 2308W silvestre, lo que muestra que Amp160 no juega un papel en el transporte o metabolismo de los carbohidratos.

La carencia de Amp160 no afecta los mecanismos de sobrevivencia de *B. abortus* 2308W en el interior de los neutrófilos o supervivencia en fagocitos profesionales y no profesionales. Tampoco hubo diferencias en la capacidad de la cepa mutante de adherirse a células epiteliales HeLa, lo que contrasta con lo que se reporta en la literatura, pues en *Citrobacter rodentium* y *Salmonella enterica* esta proteína se encarga, en conjunto con TamA de traslocar una adhesina desde del citoplasma, a través del espacio periplásmico, hacia la membrana externa (Selkrig *et al.*, 2012). Al eliminar este sistema, las bacterias en este estudio no pudieron adherirse a la superficie de las células epiteliales de intestino de ternero, la diferencia observada en este estudio, con respecto al nuestro podría deberse a que el mutante *B. abortus* Amp160 fue ensayado en células HeLa, las que podrían carecer del receptor para el ligando traslocado por el sistema TamA/Amp160. Adicionalmente la expresión de Amp160 extracelularmente es baja (Lamontagne *et al.*, 2007) lo que podría

sugerir que es por esta razón que no se ve ningún fenotipo ya que los experimentos en los ensayos de adhesión se realizaron con bacterias extracelulares.

A pesar que *in vitro* y *ex vivo* no se demostraron diferencias entre el mutante *B. abortus* Amp160 con la cepa parental, la infección en ratones mostró diferencias significativas, lo que implica que ésta está atenuada *in vivo*, siendo esta atenuación leve (cerca de un logaritmo en la semana 9). Así mismo la cepa *B. abortus* 2308W Δ Amp160 complementada presenta diferencias significativas con respecto a la cepa control, sin presentar diferencias con la cepa *B. abortus* 2308W Δ Amp160, lo que implica que la complementación en un plásmido no fue eficiente para revertir la atenuación *in vivo* a pesar que la cepa complementada expresa la proteína Amp160. Lo anterior podría sugerir que la cepa complementada pierde el plásmido conforme avanza la infección en el tiempo producto de la falta de presión de selección para mantener el mismo.

Se podría concluir, que la proteína Amp160 no tiene un papel o rol importante en la vida extracelular de la bacteria. Bajo el contexto estudiado tampoco juega un rol determinante en la adhesión o capacidad de invadir a las células. La principal diferencia se dio en los ratones Balb/c, esto en parte se puede deber a que este es un modelo en donde entran en juego otros factores como lo es la inmunidad adaptativa, siendo la prueba por excelencia para evaluar la patogenicidad de las brucelas.

Los resultados obtenidos en este estudio apuntan a que debido a que no hay un fenotipo evidente ante las pruebas *ex vivo* pero sí hay una atenuación leve en el modelo *in vivo*, esta cepa mutante en Amp160 sería un buen candidato para someter a evaluación como una posible cepa vacunal.

8. Conclusiones

- La eliminación del locus BAW_10046 en *B. abortus* 2308W no genera ninguna alteración en la estructura y características propias de la membrana externa de la bacteria, lo que le habilita la conservación de mecanismos para evadir la respuesta inmune, conservando su potencial para generar patogenicidad.
- Amp160 no está involucrada en el transporte o utilización nutrientes de *B. abortus* 2308W, ni tampoco en el crecimiento y capacidad de replicación extracelular.
Amp160 no tiene un papel en la adhesión a células epiteliales, así como resulta no ser necesaria para la sobrevivencia en neutrófilos, células epiteliales HeLa y macrófagos RAW.
- La carencia de Amp160 en un modelo murino genera un fenotipo de atenuación, lo que hace que la infección se controle de manera más fácil si la bacteria no produce esta proteína.
- La complementación de la cepa mutante no restauró el fenotipo en la infección en ratones a pesar de la existencia de evidencia que sustenta que la proteína se expresa en la misma, pudiéndose deber esto a que la cepa complementada pierde el plásmido durante el curso de la infección.

9. Referencias

1. **Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM.** 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.
2. **Antoine, R., and C. Locht.** 1992. Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from gram-positive organisms. *Mol. Microbiol.* 6:1785-1799.
3. **Alexander, B., P.R. Schunurrenberger & R.R. Brown.** 1981. Numbers of *Brucella abortus* in the placenta, umbilicus and fetal fluid of two natural infected cows. *Vet. Rec.* 108: 500.
4. **Bastuji, B. G., Bowden, R. A., Dubray, G., Limet, J. N.** 1990. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting analysis of smooth-lipopolysaccharide heterogeneity among *Brucella* Biovars Related to A and M Specificities. *J. Clin. Microbiol.* 28:2169-2174.
5. **Celli J, de Chastellier C, Franchini DM, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel JP.** 2003. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.* 198:545–556.
6. **Chacón-Díaz, C., Altamirano-Silva, P., González-Espinoza, G., Medina, M., Alfaro-Alarcón, A., Bouza-Mora, L. Jiménez-Rojas, C., Wong, M., Barquero-Calvo, E., Rojas, N., Guzmán-Verri C. Moreno E., & Chaves-**

- Olarte, E. 2015. *Brucella canis* is an intracellular pathogen that induces a lower proinflammatory response than smooth zoonotic counterparts. *Infection and Immunity*. 83:4861-4870.
7. **Delrue, R., Deschamps, C., Léonard, S., Nijskens, C., Danese, I., Schaus, J., Letesson, J.** 2005. A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*, *Cell Micro*. 7, 1151–1161.
 8. **Eisenschenk, Frank C., Houle, Jeri Joan., & Marker Hoffmann, Edward.** 1999. Mechanism of serum resistance among *Brucella abortus* isolates. *Vet. Microbiol.* 68: 235-244
 9. **Gamazo C, Moriyón I.** 1987. Release of outer membrane fragments by exponentially growing *Brucella melitensis* cells. *Infect. Immun.* 55:609–615.
 10. **Guzmán-Verri C, Manterola L, Sola-Landa A, Parra A, Cloeckert A, Garin J, Gorvel JP, Moriyón I, Moreno E, López-Goñi I.** 2002. The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the *Rhizobiaceae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:12375–12380.
 11. **Gorvel, J. P., & Moreno, E.** 2002. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Veterinary Microbiology*, 90, 281–297.
 12. **Hallez R, Letesson J-J, Vandehaute J, De Bolle X.** Gateway-based destination vectors for functional analyses of bacterial ORFeomes: application to the min system in *Brucella abortus* 2007 . *Applied and Environmental Microbiology*. 73(4):1375-1379. Doi:10.1128/AEM.01873-06.

13. **Harlow, I. Lane, Ed. I.I.** 1988. Antibody-Antigen Interactions. Laboratory manuals., David Cold Spring Harbor. 1988.
14. **Hithcock & Brown.** 1983 Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. J. Bacteriol. 154: 269-277.
15. **Ko, J., & Splitter, G. A.** 2003. Molecular host-pathogen interaction in Brucellosis: Current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans, 16, 65–78.
16. **Lamontagne J, Butler H, Chaves-Olarte E, Hunter MSJ, Paquet MTC, Kearney P, Hamaidi L, Chelsky D, Moriyón I, Moreno E, Paramithiotis E.** 2007. Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*. J. Proteome Res. 6:1519–1529.
17. **Lapaque N, Moriyón I, Moreno E, Gorvel JP.** 2005. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. Current Opinion Microbiology .8:60–66.
18. **Martinez de Tejada G, Pizarro-Cerdá I, Moreno E, Moriyón I.** 1995. The outer Membrane of *Brucella* spp. Are Resistant to Bacterial Cationic Peptides. Infec. Inmmunity. 63: 3054-3061.
19. **Manterola, L.** 2004. Caracterización del sistema regulador de dos componentes BvrR/BvrS de *Brucella abortus*. Tesis Doctoral. Facultad de ciencias. Universidad de Navarra.
20. **Moreno E, Moriyón I.** 2002. *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**:1–3.

21. **Moreno E, Moriyón I.** 2006. The genus *Brucella*. In M. Dorkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (ed.) *The prokaryotes*. Springer-Verlag, New York, NY. 5:315–456.
22. **Pizarro-Cerdá J, Méresse S, Parton RG, van der Goot G, Sola-Landa A, Lopez-Goñi I, Moreno E, Gorvel JP.** 1998. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect. Immun.* 66:5711–5724.
23. **Quandt J & Hynes MF.** Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. 1993 *Gene.* 15:15-21.
24. **Rojas N, Freer E, Weintraub A, Ramírez M, Lind S.** 1994. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1:206-213.
25. **Sangari F, Aguero J.** 1991. Mutagenesis of *Brucella abortus*: comparative efficiency of three transposon delivery systems. *Microb. Pathog.* 11:443–446 .
26. **Scupham, A. J. & E. W. Triplett.** 1997. Isolation and characterization of the UDP-glucose 4'-epimerase-encoding gene, *65ale*, from *Brucella abortus* 2308. *Gene* 202:53-59.
27. **Slon JL.** 2010. Estandarización de un protocolo de identificación bioquímico para la diferenciación de especies del género *Brucella*. Trabajo Final de Graduación. Facultad de Microbiología. Universidad Nacional de Costa Rica.
28. **Sola-Landa A, Pizarro-Cerda J, Grillo MJ, Moreno E, Moriyón I, Blasco JM, Gorvel JP, López-Goñi I.** 1998. A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol. Microbiol.* 29:125–138.

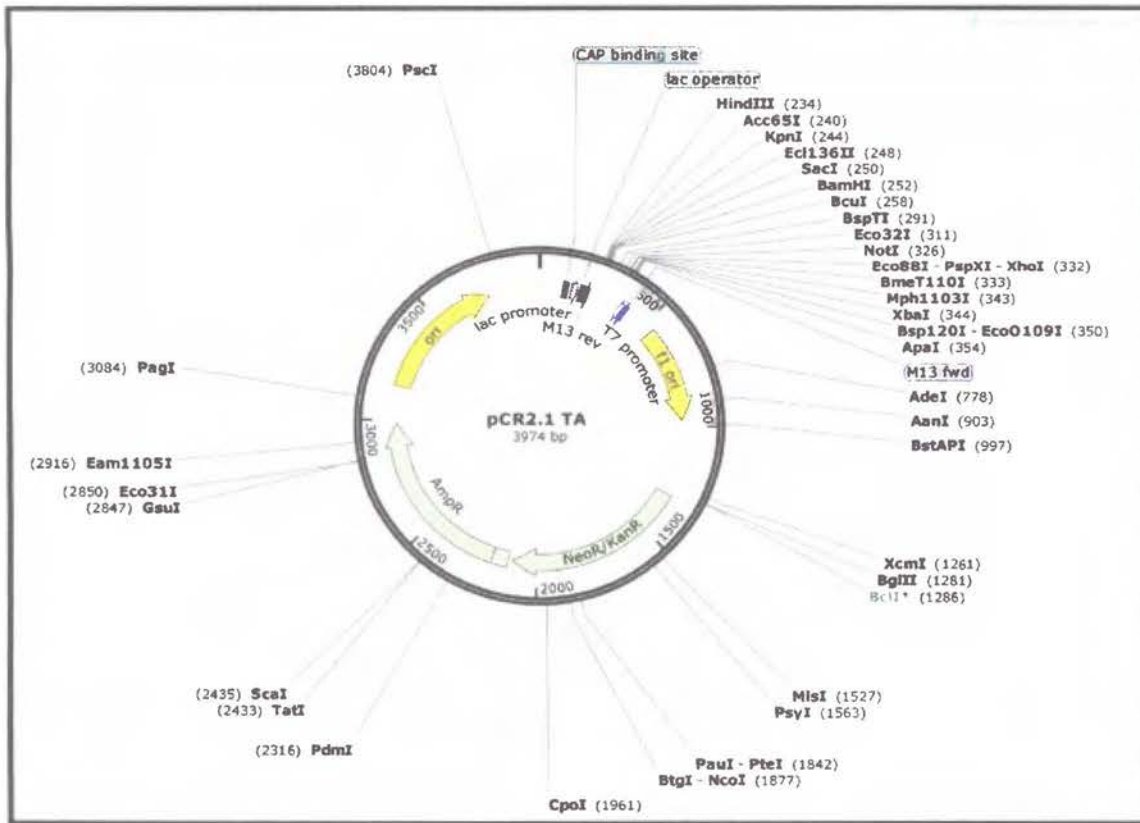
29. Studier, F.W. & B.A. Moffatt. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189: 113–130.
30. Wells, T. J., Sherlock, O., Rivas, L., Mahajan, A., Beatson, S. A., Torpdahl, M., Schembri, M. A. 2008. EhaA is a novel autotransporter protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 that contributes to adhesion and biofilm formation. *J Appl Environ Microbiol* 10:589–604.
31. Wu Q, Pei J, Turse C, Ficht TA. 2006. Mariner mutagenesis of *Brucella melitensis* reveals genes with previously uncharacterized roles in virulence and survival. *BMC Microbiol.*6: 102-117.
32. Zúñiga-Ripa, A. Barbier, T. Conde-Álvarez R. Martínez-Gómez, E. Palacios-Chaves, L. Gil-Ramírez Y. Grilló, M.J. 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. *J. Bacteriol.* 196, 3045–3057.

10. Anexos

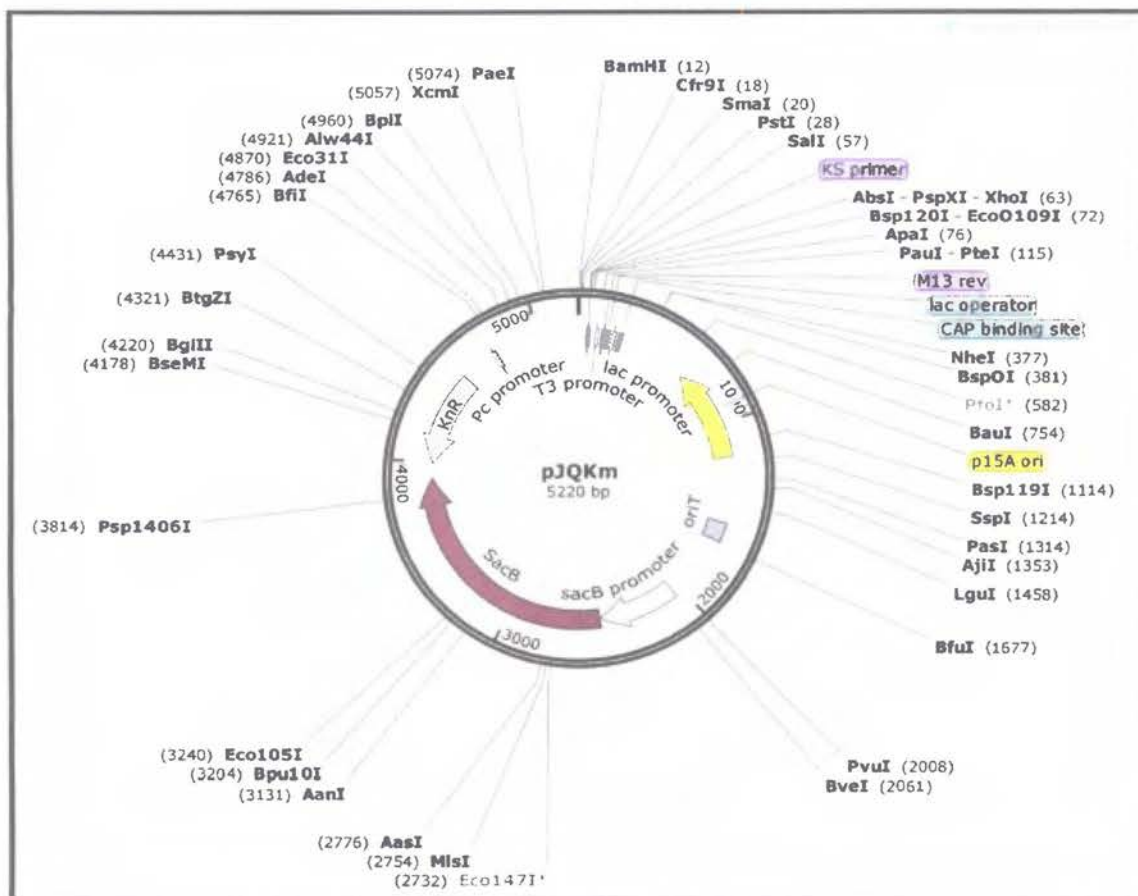
Carbohidrato	GLY	ERY	DARA	LABA	RII	DEVI	LEVO	ADSI	MDIX	GAJ	GLU	TRU	MBE	GRE	EDA	DAI	BOI	BAR	SEB	MEM	MPS	BSJ	AMT	ARI	TC
B. abortus 2308W 24h	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
B. abortus 2308W 48h	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
B. abortus 2308W Rev34 24h	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
B. abortus 2308W Rev34 48h	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
B. abortus 2308W ΔAmp160 24h	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
B. abortus 2308W ΔAmp160 48h	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Carbohidrato	SAL	ZIL	MAI	UNC	MIH	UNC	TRF	TRU	MEZ	RAJ	AMB	GRS	RII	GER	TRH	LEU	ING	DEC	LEK	DAI	LAB	GRY	ING	YAG	MEDIO PURO
B. abortus 2308W 24h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B. abortus 2308W 48h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B. abortus 2308W Rev34 24h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B. abortus 2308W Rev34 48h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B. abortus 2308W ΔAmp160 24h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B. abortus 2308W ΔAmp160 48h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

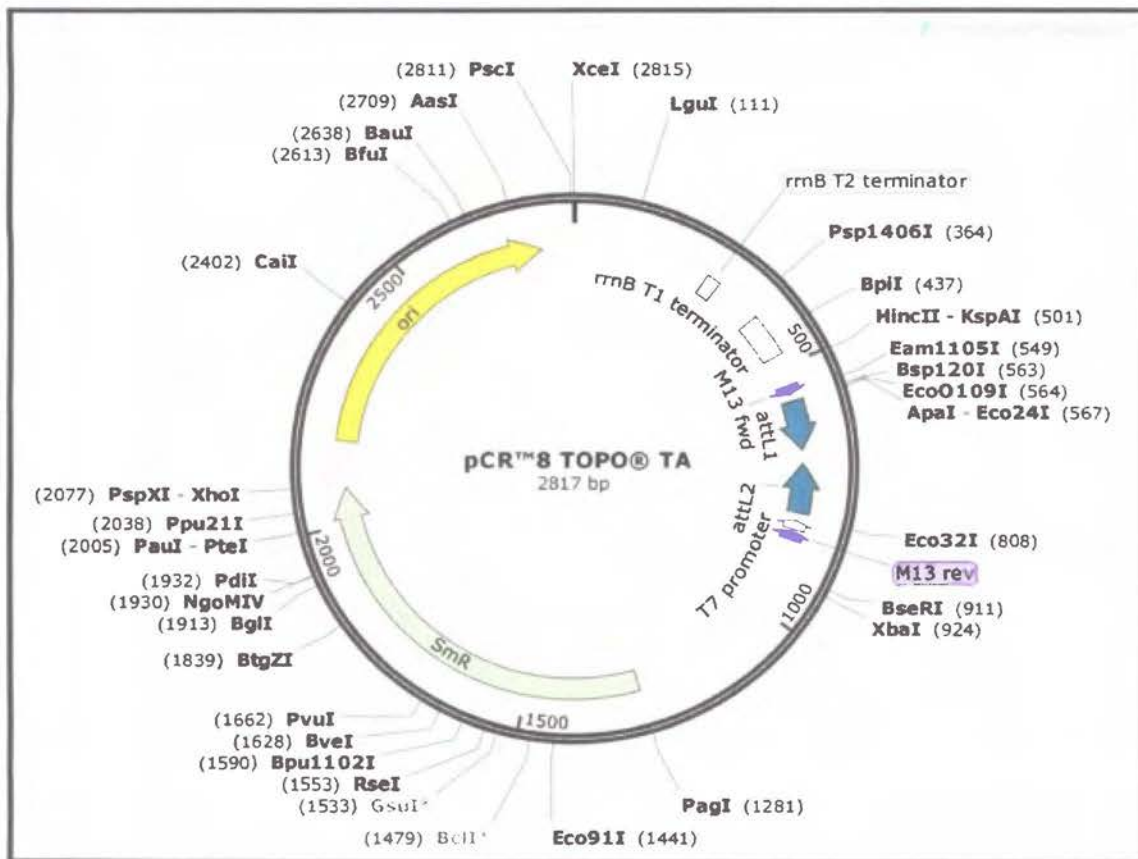
Anexo 1: Perfil de fermentación de carbohidratos de las cepas en estudio. Se colocaron las cepas en estudio en un medio con 50 carbohidratos como fuente de nutrientes, se observó a las 24 y 48 horas si la cepa fermentó el mismo (cambio de color a amarillo por la acidificación del medio) y el resultado se reportó con un 1 si hubo viraje de color y con un 0 si no lo hubo.



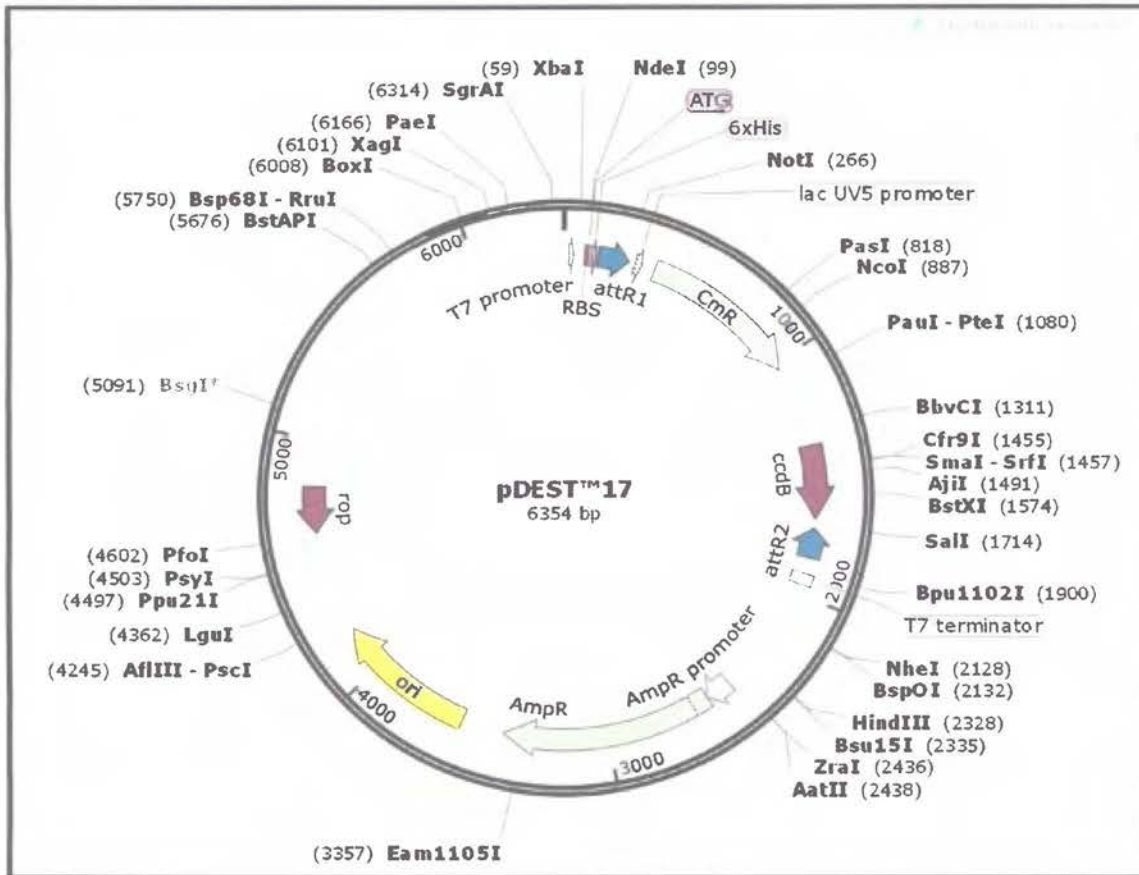
Anexo 2: Mapa del plásmido pCR2.1 utilizado en la construcción de la mutante en el gen *amp^r160*. Como se observa en la imagen, este plásmido de 3931 pares de bases le confiere a las bacterias que fueron transformadas con él un fenotipo de resistencia a la ampicilina así como a la kanamicina y a la neomicina.



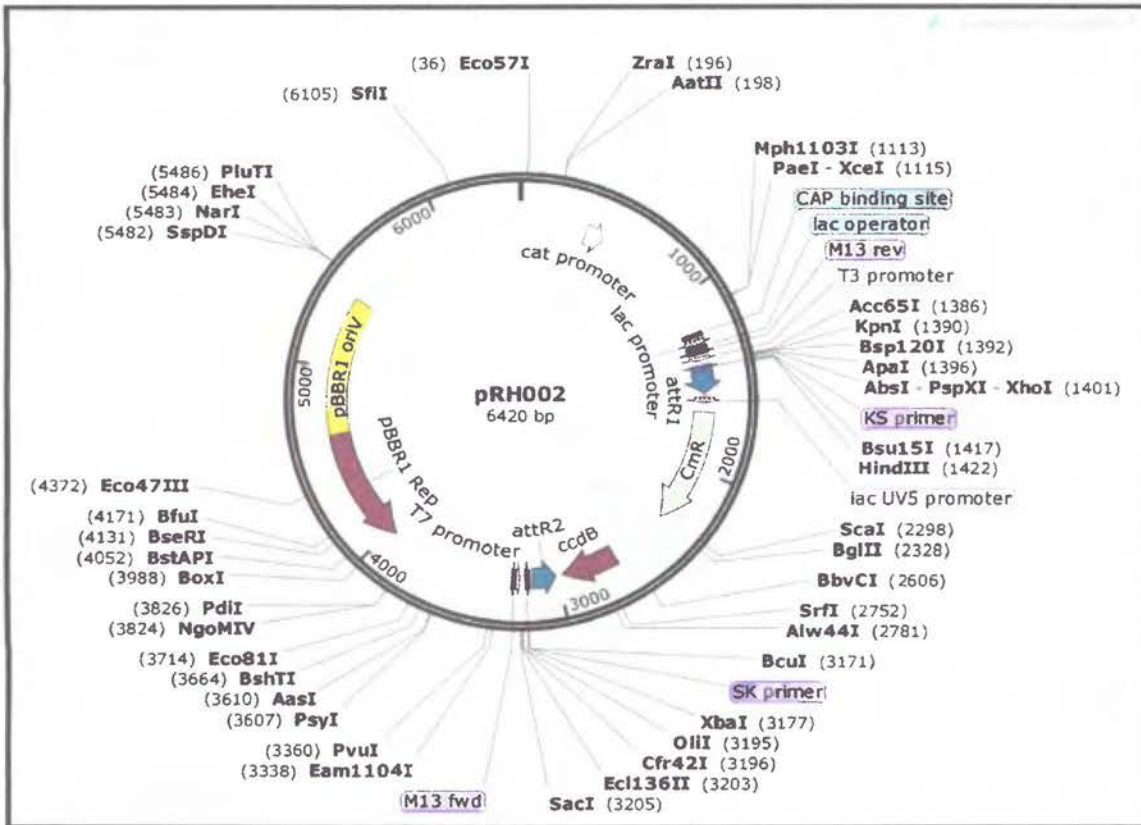
Anexo 3: Mapa del vector suicida pJQKm utilizado en la construcción de la mutante en el gen *amp^r160*. Como se observa en la imagen, este plásmido de 5220 pares de bases le confiere a las bacterias que fueron transformadas con él un fenotipo de resistencia a la Kanamicina y de susceptibilidad a las altas concentraciones de sacarosa (5%). Este plásmido es una construcción basada en el plásmido pJQ200KS (Quandt & Hynes, 1993).



Anexo 4: Mapa del vector de entrada pCR8TOPO®TA utilizado en la creación del péptido DUF490 y la complementación de la mutante de Amp^r60. Como se observa en esta imagen, este plásmido de 2817 pares de bases le confiere a las bacterias transformadas con él un fenotipo de resistencia a la Espectenomicina.



Anexo 5: Mapa del vector de destino pDEST™17 utilizado en la generación del péptido DUF490 marcado con Histidina. Como se observa en la imagen, este plásmido de 6354 pares de bases le confiere a las bacterias que fueron transformadas con él un fenotipo de resistencia a la Ampicilina. Entre otras características, presenta el gen *ccdB* cuya expresión se ve interrumpida por el producto de PCR clonado, cuando este vector se encuentra vacío dicho gen se expresa generando una toxina que (*ccdB*) la cual se una a la ADN girasa con lo que se impide la replicación de la células llevándola a la muerte, este mecanismo permite que una vez que se realice la transformación las células transformadas con el vector vacío mueran, lo que facilita la obtención de solamente las células transformadas con el vector de interés. Adicionalmente, como se observa en el mapa este vector cuenta con su propio sitio de unión al ribosoma (RBS), su propio codón de inicio (ATG) así como una etiqueta que le agrega al péptido seis residuos de Histidina (6xHis) en el extremo amino terminal de la misma.



Anexo 6: Mapa del vector de destino pRH002 utilizado en la complementación de la mutante en Amp^r160 con el gen BAW_10046. Como se observa en la imagen, este vector se construyó clonando el marco de lectura del vector GatewayTM de Invitrogen en el sitio EcoRV del vector pBBR1-MCS1 de *Bordetella broquiseptica* (Antoine & Locht, 1992). Las bacterias clonadas con este plásmido adquieren un fenotipo de resistencia al Cloranfenicol.



Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria
Comité de Bienestar Animal y Bioética
Tel. 2562-4565/2562-4569

23 de octubre de 2015
FCSA-EMV-CBAB-009-2015

Dra. Nancy Astorga Miranda
Directora
Escuela de Medicina Veterinaria

Estimada señora:

Para su información y efectos consiguientes, me permito transcribir el acuerdo tomado por la Comisión de Bienestar Animal y Bioética, en la Sesión Ordinaria N°06-2015, celebrada el 22 de octubre de 2015, que dice:

Considerando

1. Que una vez revisado y analizado el anteproyecto titulado: "Efecto de la proteína de membrana Omp 160 en la virulencia de Brucella abortus 2308".
2. Que el mismo estará a cargo de la Dra. Caterina Guzmán Verri.
3. Que el anteproyecto arriba enumerado todos los participantes se comprometen a guardar el bienestar animal de todos los animales objeto del estudio.
4. Asimismo, el anteproyecto cumple los requisitos que se emanan de la Ley 7451 "Bienestar de los Animales".

POR LO TANTO, SE ACUERDA:

1. AVALAR EL ANTEPROYECTO TITULADO: "EFECTO DE LA PROTEÍNA DE MEMBRANA OMP160 EN LA VIRULENCIA DE BRUCELLA ABORTUS 2308", PRESENTADO POR LA DRA. CATERINA GUZMÁN VERRI.

ACUERDO FIRME

Atentamente,

Dra. Sandra Estrada König
Coordinadora
Comité Bienestar Animal y Bioética
Escuela de Medicina Veterinaria



C: Dra. Caterina Guzmán Verri
Dra. Leana Zumbado Gutiérrez
Dr. Mario Baldí Salas
Dr. Julio César Rojas
Dr. Mauricio Jiménez Soto

Anexo 7: Permiso para la experimentación con Animales por parte del Comité de Bienestar Animal y Bioética de la Escuela de Medicina Veterinaria de Universidad Nacional de Costa Rica.