

Universidad de Costa Rica
Sede Rodrigo Facio
Facultad de Microbiología



“Caracterización proteómica de los compartimentos intracelulares tempranos de macrófagos RAW 264.7 en los que transitan dos cepas de *Brucella abortus* utilizando la plataforma del Instituto Clodomiro Picado y comparación con los resultados obtenidos en una plataforma distinta en trabajos anteriores”

Trabajo final de graduación para optar por el grado de Licenciatura en Microbiología y
Química Clínica

Carlos Josué Martínez Calderón
Carné: B84618

Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET)
Instituto Clodomiro Picado (ICP)

Julio-2023

Los que aquí firmamos damos fe que este trabajo posee todas las correcciones indicadas el día de la presentación oral:



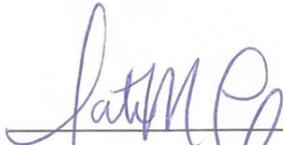
Dr. Esteban Chaves Olarte, PhD
Tutor



Dr. Carlos Chacón Díaz, PhD
Lector



Dr. Julián Fernández Ulate, PhD
Lector



Dra. Tatiana Murillo Corrales, PhD
Presidenta del Tribunal



Dra. María José Suárez Sánchez, Lic
Profesora designada

DEDICATORIA

Con el más profundo amor y gratitud dedico este trabajo a mis queridas abuelas Miriam y Ligia, dos mujeres extraordinarias que han sido de inspiración y constante apoyo a lo largo de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer a Dios y a la Virgen por ser mis guías en este largo camino, por ser la luz que me guío y por brindarme la fortaleza y sabiduría para completar mis objetivos. Agradezco a mi familia, especialmente a mi madre, Jazmín, quién desde pequeño me impulsó a perseguir en ese entonces los sueños que hoy se convierten en metas cumplidas, por su apoyo incondicional y su amor más puro, fundamentales desde el inicio de esta hermosa carrera.

Declaro mi gratitud por mi Padre, Carlos; así como mi querida hermana, Sofía, por ser mi consejera y escucharme cuando más lo necesitaba. Doy las gracias a Luna, por ser tan especial, atenta, comprensiva, solidaria y estar en los momentos más duros e importantes de mi vida, por ser mi terapeuta que a pesar de no decir palabra alguna, simplemente su presencia me tranquilizaba y me era de consuelo.

Aprecio el apoyo del personal docente, técnico y administrativo del CIET, por facilitar las instalaciones, los insumos, el material necesario para llevar a cabo este proyecto y por la disposición a lo largo de la realización de este trabajo. Quiero dar las gracias al Dr. Esteban Chaves por permitirme ser partícipe de esta investigación, al Dr. Carlos Chacón por la ayuda brindada en la inicialización de la fase experimental de este proyecto, al Dr. Julián Fernández por la confianza brindada para el procesamiento de las muestras en el ICP; así como a las Dra. Pamela Altamirano y Dra. Cynthia Arroyo por el apoyo y los sabios consejos.

Por último, quiero agradecer a todas aquellas personas que, de alguna manera, contribuyeron a mi formación académica y personal, desde el kínder hasta la universidad. Sus enseñanzas y apoyo constante han sido invaluable en mi desarrollo como estudiante y como persona.

A todos ustedes, mi más sincero agradecimiento por ser parte de este importante logro en mi vida. Su contribución y apoyo significaron mucho para mí, y siempre los llevaré en mi corazón con profunda gratitud.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	3
Justificación	3
Hipótesis	4
CAPÍTULO 1	5
ANTECEDENTES	5
Brucelosis	5
<i>Brucella</i> spp.	7
Epidemiología	8
Transporte intracelular continuo de membranas	9
Patogénesis	10
Sistema de secreción tipo IV	12
Exoproteoma	13
Proteínas efectoras reguladas por <i>VirB</i>	15
CAPÍTULO 2	17
OBJETIVOS	17
Objetivo general	17
Objetivos específicos	17
CAPÍTULO 3	18
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Cepas bacterianas	18
Cultivo celular e infección	18
Aislamiento y purificación de BCVs	20
Extracción de proteínas	21
Digestión de las proteínas y HPLC-MS/MS	22
Análisis bioinformático	24
CAPÍTULO 4	26
RESULTADOS	26
CAPÍTULO 5	34
DISCUSIÓN	34

CAPÍTULO 6	40
CONCLUSIONES	40
CAPÍTULO 7	42
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXOS	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rutas de transporte intracelular de células eucariotas.....	9
Figura 2. Modelo de la dinámica de transporte de <i>Brucella</i> spp. dentro de la célula.....	11
Figura 3. Esquema del proceso de cultivo celular de macrófagos RAW 264.7 y preparación del cultivo de las cepas bacterianas <i>Brucella abortus</i> 2308W y <i>virB10</i> a partir de sus respectivos precultivos para la elaboración de los inóculos necesarios en la subsiguiente infección.....	19
Figura 4. Esquema del proceso de infección de los macrófagos RAW 264.7 a partir de los inóculos bacterianos derivados de los respectivos cultivos según cada cepa utilizada. Una vez inoculados se tomó el tiempo para completar un total de 4 horas de infección para el posterior paso de aislamiento y purificación de las BCVS.....	19
Figura 5. Aislamiento y purificación de las BCVs de macrófagos RAW 264.7 a 4 h.p.i. Las BCVs se enriquecieron mediante un gradiente discontinuo de sacarosa y fueron purificadas mediante ultracentrifugación para la posterior extracción proteica.	20
Figura 6. Proteómica de las BCVs. 1) Extracción de las proteínas presentes en las BCVs de los macrófagos murinos previamente infectados con las distintas cepas. 2) Digestión de las proteínas previamente extraídas y preparación para el análisis proteómico mediante HPLC-MS/MS y el posterior análisis bioinformático.	22
Figura 7. Valores de proteínas detectadas por medio de HPLC-MS/MS en lisados de BCVs purificadas a las 4 h.p.i. (CR) y 6 h.p.i. (Al) de macrófagos RAW 264.7 y la distribución entre los grupos analizados. (A) Valores absolutos promedio de proteínas totales y validadas presentes en mínimo 2 de 3 réplicas en cada grupo analizado (proteínas validadas). (B) Valores porcentuales de proteínas validadas y no validadas a nivel intragrupal. (C) Número de proteínas conservadas (presentes tanto en 2308W como <i>virB10</i> -) y exclusivas (encontradas solo en 2308W o <i>virB10</i> -) a nivel intergrupala.....	27
Figura 8. Comparaciones intragrupales del número de proteínas validadas detectadas por réplica para el grupo (A) 2308W CR, (B) <i>virB10</i> - CR, (C) 2308W Al y (D) <i>virB10</i> - Al.....	28

Figura 9. Valores porcentuales de las proteínas conservadas en las 3 réplicas a nivel intragrupal (proteínas en común) con respecto al promedio de proteínas totales determinadas según cada grupo analizado.....	29
Figura 10. Comparaciones intergrupales de las proteínas validadas detectadas según la cepa para el grupo (A) Costa Rica (CR) y (B) Alemania (Al).....	30
Figura 11. Comparación de las proteínas determinadas como comunes en (A) 2 de 3 réplicas presentes en los grupos CR y Al, y (B) 1 de 3 réplicas del grupo CR con respecto a aquellas presentes en 2 de 3 réplicas del grupo Al).....	31
Figura 12. Comparación de las proteínas determinadas como exclusivas en 2 de 3 réplicas presentes en las BCVs de la cepa (A) 2308W y (B) <i>virB10</i> - en los grupos CR y Al).....	33
Figura 13. Representación esquemática de las BCVs obtenidas a las 4-6 horas después de la infección de macrófagos RAW 264.7 con <i>B. abortus</i> 2308W y <i>virB10</i>	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de los parámetros con los que se obtuvieron los datos MS y MS/MS.....	4
Tabla 2. Concentración de proteínas presentes en las muestras de BCVs obtenidas mediante el NanoDrop.....	24
Tabla 3. Número de proteínas determinadas en las BCVs y su distribución según el grupo taxonómico (ratón o bacteria) para cada grupo experimental (CR y AI).....	32

RESUMEN

Brucella sp. es una α 2-Proteobacteria intracelular causante de infecciones en humanos y animales. Mundialmente al año se presentan 500 000 nuevos casos de brucelosis en humanos, específicamente en Costa Rica del 2003 al 2015 se reportaron 124 pacientes afectados por este agente. Además, las infecciones en ganado bovino repercuten en la industria ganadera al limitar la producción de leche. Durante el proceso de infección *Brucella* spp. produce cambios en el tráfico intracelular para evitar su eliminación en el lisosoma, finalizando en el retículo endoplasmático; a través de toda esta vía la bacteria modula el entorno a través de diferentes factores de virulencia.

Se propone que *B. abortus* modifica proteómicamente los compartimentos que ocupa en el interior de los macrófagos RAW 264.7 por medio del sistema de secreción *VirB*. Para comprobar esto se aislaron las vacuolas de macrófagos infectados por *B. abortus* silvestre y una cepa mutante de *VirB* a través de un método de ultracentrifugación empleando un gradiente de sacarosa. Se realizó una extracción proteica de dichas vacuolas para finalmente concretar una comparación de la composición proteómica entre ambas. Se utilizó la cepa *virB10*⁻ como control y el enfoque permitió identificar las proteínas que difieren entre los compartimentos y que tienen un alto poder discriminatorio en el análisis y una relevancia biológica.

Para determinar qué proteínas caracterizan exclusivamente los compartimentos contenedores de las cepas 2308W o *virB10*⁻, se compararon las listas de proteínas obtenidas y se evaluó su importancia biológica. En este estudio, se implementó un protocolo de enriquecimiento de las vacuolas durante las primeras etapas de infección en macrófagos murinos RAW 264.7. También se compararon las proteínas resultantes de análisis HPLC-MS/MS en cepas diferentes para destacar las diferencias a nivel cualitativo y cuantitativo de los compartimentos intracelulares a las 4 horas postinfección, lo que permitió discutir acerca de las diferencias en el número de proteínas encontradas en un estudio previo que empleó una metodología muy similar.

ABSTRACT

Brucella sp. belongs to the α 2-Proteobacteriaceae class and is an intracellular pathogen of humans and animals. Around the world, the annual incidence of human brucellosis is 500 000 new cases. Specifically, in Costa Rica from 2003-2015 there were 124 reported cases of patients infected with these bacteria. Also, infections in cattle with this bacterium have negative consequences in milk and beef production. During the infectious process *Brucella* sp. produces changes in the intracellular trafficking with the goal of avoiding its elimination in the lysosome, finalizing instead in the endoplasmic reticulum. All around this pathway the bacteria modulates its surroundings through different virulence factors.

We propose that *B. abortus* modifies proteomically the compartments that it occupies in the interior of RAW 264.7 macrophages via the secretion system *VirB*. To verify this effect, wildtype and *VirB* mutant *B. abortus*-infected macrophage vacuoles were purified using a sucrose gradient ultracentrifugation method. A protein extraction of these vacuoles was performed to ultimately carry out a comparison of the proteomic composition between both strains. The *virB10*⁻ strain was used as a control, and the approach allowed the identification of proteins that differ between the compartments and have high discriminatory power in the analysis and biological relevance.

To determine which proteins exclusively characterize the compartments containing the 2308W or *virB10*⁻ strains, the obtained protein lists were compared, and their biological significance was evaluated. In this study, a vacuole enrichment protocol was implemented during the initial stages of infection in RAW 264.7 murine macrophages. The resulting proteins from HPLC-MS/MS analysis were also compared in different strains to highlight the qualitative and quantitative differences in the intracellular compartments at 4 hours post-infection, allowing for a discussion of the differences in the number of proteins found in a previous study that employed a remarkably similar methodology.

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

Justificación

En lo que se refiere al ámbito humano, cada año se presentan 500 000 nuevos casos de brucelosis en el mundo (Pappas et al., 2006). A lo anterior, se suma el hecho de que el cuadro clínico es muy debilitante y que incluso puede llegar a ser mortal (Xavier et al., 2010). Asimismo, se deben tomar en consideración los costos asociados al tratamiento, diagnóstico e incapacidades en el sector laboral (Méndez et al., 2015), los cuáles reflejan el impacto de esta infección bacteriana. Igualmente, para el caso de los animales de producción, principalmente el ganado bovino, esta enfermedad tiene una prevalencia considerable en Costa Rica (Hernández et al., 2017) asociada a pérdidas en la producción de leche, abortos y una afectación en el crecimiento de los becerros (Méndez et al., 2015). Los puntos anteriores recalcan la importancia de investigar sobre esta enfermedad y por ende su patogenia.

Aunque sí se ha investigado la vía intracelular de *Brucella* spp. aún no se conoce con claridad la caracterización proteica de las BCV, componente esencial de la vía de infección celular de la bacteria en la célula hospedera. Por lo tanto, este estudio resulta innovador debido a que permite realizar un análisis proteómico integral de las BCV por medio de espectrometría de masas utilizando la plataforma provista por el Instituto Clodomiro Picado, comparándose este con una cepa mutante de *virB*- en la que la bacteria no puede sobrevivir en el ambiente intracelular. De esta manera permite esclarecer aspectos no dilucidados de la ruta hacia el retículo endoplasmático, las interacciones entre la bacteria y su célula hospedero y la composición de las BCV.

Además, este trabajo podría tener aplicabilidad en la generación de conocimiento orientado a nuevas terapias dirigidas a bloquear los procesos de infección de *Brucella* spp., así como otras bacterias de tipo intracelular. Son por las razones antes mencionadas que en este trabajo surge la siguiente pregunta científica: ¿induce *Brucella abortus* una modificación de la composición proteómica de las BCV de los macrófagos RAW264.7 mediada por la expresión de *virB*?

Hipótesis

El sistema de secreción *VirB* de *Brucella abortus* modifica la composición proteómica de las BCV (*Brucella-Containing Vacuoles*) de macrófagos RAW 264.7 infectados.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

Brucelosis

La brucelosis es una enfermedad zoonótica cuyo agente etiológico corresponde a bacterias del género *Brucella*. Dentro de las especies con más potencial patogénico para el ser humano están *B. melitensis*, *B. suis* y *B. abortus*; estas tienen como hospederos preferenciales a los pequeños rumiantes, porcinos y bovinos, respectivamente (Xavier *et al.*, 2010).

La brucelosis en humanos se caracteriza por cursar con debilidad, fiebre, malestar, artritis, osteomielitis, endocarditis o meningoencefalitis, con posibilidad de ser mortal. En los animales, la enfermedad se presenta como una infección crónica que resulta en placentitis y aborto en hembras preñadas u orquitis y epididimitis en machos (Xavier *et al.*, 2010). Se transmite de animales a humanos a través del contacto con animales infectados, consumo de productos de origen animal contaminados o inhalación de aerosoles infectados; asimismo se han reportado casos a partir de transfusiones y se ha sugerido un contagio por transmisión sexual (Franco *et al.*, 2007).

La mortalidad de la brucelosis en humanos es generalmente baja y depende de varios factores, como la especie de *Brucella* involucrada, la gravedad de la enfermedad y el tratamiento temprano y adecuado. La tasa de mortalidad ronda el 5% en casos de pacientes sin complicaciones; el impacto es principalmente de tipo económico y social debido a los altos costos de su diagnóstico, tratamiento y las incapacidades que se generan en las personas que la padecen (Méndez *et al.*, 2015). La enfermedad tiene tendencia a desarrollar cronicidad y puede generar una amplia variedad de signos y síntomas dependiendo de lo avanzada que se encuentre y la forma que adquiera en el organismo, llegando a ser fatal, especialmente en personas con sistemas inmunológicos comprometidos (Dean *et al.*, 2012).

En el sector ganadero las pérdidas económicas son grandes, debido a que esta enfermedad genera que la producción de leche disminuya en un 30%, retrasa la tasa de crecimiento de los becerros y afecta parámetros reproductivos de las hembras, lo cual influye en el ciclo normal de producción. Otro aspecto importante para tomar en cuenta es que

representa una dificultad para la exportación de animales hacia países donde la enfermedad no es endémica (Méndez *et al.*, 2015).

La vía de infección varía según sea la especie en cuestión. En términos generales, *Brucella* spp. ingresa a sus hospederos a través de la mucosa; por ejemplo por el consumo de productos lácteos no pasteurizados, por el contacto de material contaminado con la conjuntiva ocular o la inhalación de aerosoles infectados (Ferrero *et al.*, 2020).

Si se hila a nivel de las especies con más relevancia clínica, se tiene que para *B. abortus* la infección puede ser vía intracutánea, mediante el contacto con ganado abortado o con animales infectados sacrificados, u oral a través de la ingesta de leche no pasteurizada. En el caso de *B. melitensis*, la infección es oral por el consumo de leche o queso sin pasteurizar. *B. suis* es la especie con más vías de infección; entre ellas destacan la vía respiratoria a través de la inhalación de aerosoles en lugares donde circule la bacteria, por vía oral por el consumo de carne mal cocida o por la vía intracutánea por el mal manejo de cerdos sacrificados (Young, 2018).

El diagnóstico temprano y el tratamiento efectivo son fundamentales para reducir el impacto de la brucelosis en la salud pública. Los métodos de diagnóstico incluyen pruebas serológicas, cultivo bacteriano y PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Sin embargo, la sensibilidad y especificidad de las pruebas pueden ser limitadas. El tratamiento de la brucelosis generalmente implica el uso de antibióticos, pero la duración del tratamiento y la selección de medicamentos pueden variar; se recomienda el uso de al menos dos antibióticos sinérgicos, incluyendo doxiciclina, rifampicina, estreptomycin (u otros aminoglucósidos) o trimetoprim-sulfametoxazol (cotrimoxazol) (Godfroid *et al.*, 2011).

La prevención de la brucelosis en animales y humanos es esencial para reducir su impacto. La vacunación es una herramienta importante para prevenir la enfermedad en animales y se ha utilizado con éxito en algunos países para controlarla (Moreno, 2014). En humanos, la educación y la concienciación son claves para prevenir la transmisión de la enfermedad de animales a humanos.

***Brucella* spp.**

Las bacterias que pertenecen a la familia Brucellaceae y al género *Brucella*; se caracterizan por ser cocobacilos gram negativos pertenecientes a la subdivisión $\alpha 2$ de las proteobacterias y ser patógenos zoonóticos intracelulares facultativos (Rivas, 2015). Se reconocen actualmente 10 especies diferentes, cada una adaptada a un hospedero específico. Su clasificación se basa en su perfil antigénico y su patogenicidad. Las especies más importantes desde el punto de vista de la salud humana son *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. canis* (Godfroid, 2011).

La identificación y caracterización de las diferentes especies se realiza mediante técnicas moleculares y bioquímicas. Algunas de las pruebas utilizadas para su identificación incluyen la producción de ácido y gas a partir de la glucosa, la oxidasa y la catalasa positivas y la hidrólisis de la urea. Se distingue inicialmente por pruebas bacteriológicas estándar tales como: tinción gram negativa (cocobacilos o varillas), propiedades de crecimiento (3-4 días, colonias elevadas, convexas, circulares con un diámetro de 0,5 a 1,0 mm y no hemolíticas), no ser móviles, reducción de nitratos positivo y crecimiento en citrato de Simmons (Guzmán-Verri et al., 2012). Las colonias en cultivo de agar son pequeñas, lisas y brillantes, y pueden ser difíciles de distinguir de otras bacterias gramnegativas (Franco, 2007). Sin embargo, estas pruebas no son específicas y pueden dar lugar a falsos positivos.

En los últimos años, se ha utilizado la secuenciación del genoma completo para la identificación y clasificación a nivel de especie; esta técnica ha permitido una mejor comprensión de la diversidad genética de la bacteria y ha revelado la presencia de subespecies y cepas atípicas (Whatmore et al., 2009).

La estructura de *Brucella* spp. consiste en una membrana externa compuesta por lipopolisacáridos (LPS), una capa de peptidoglicano y una membrana interna que contiene fosfolípidos y proteínas (Godfroid et al., 2011). En cuanto a su fisiología, puede sobrevivir y replicarse dentro de las células del hospedero, especialmente en las células del sistema fagocítico mononuclear; así como ser capaz de resistir la acción del sistema inmune, evadir la fagocitosis y la respuesta inflamatoria.

Se sabe que *Brucella* utiliza una variedad de factores de virulencia para infectar y replicarse dentro del hospedero. Estos factores incluyen su capacidad para adherirse a las células eucariotas, escapar de la fagocitosis, modular la respuesta inmune y para formar biopelículas (Kahl-McDonagh, 2006).

Epidemiología

Cada año se presentan 500.000 casos nuevos de brucelosis humana en todo el mundo, la mayoría de los casos se registran en países en vías de desarrollo donde como actividad económica se dedican a la cría de animales (Pappas *et al.*, 2006). La epidemiología de la brucelosis ha sido ampliamente estudiada en todo el mundo y se ha demostrado que varía según la región geográfica, las prácticas agrícolas y las políticas de control de enfermedades. La incidencia en países desarrollados es de 0,01/100.000 habitantes, mientras que en los países de tercer mundo, se alcanzan hasta los 200 casos cada 100.000 habitantes (PAHO, 2021).

Entre los países más afectados en América Latina se encuentran: México, Argentina, Brasil entre otros de Suramérica. En el Medio Oriente, la brucelosis es endémica en muchos países debido a las prácticas de pastoreo y la falta de control de enfermedades (CFSPH, 2021). Mientras que en Europa, la brucelosis es una enfermedad rara en humanos debido a la implementación de políticas de control de enfermedades y programas de erradicación (Dean *et al.*, 2012). Por otro lado, en países africanos es endémica debido a las prácticas de pastoreo y la falta de vigilancia (Ducroty *et al.*, 2014).

En Costa Rica, el número de casos de brucelosis humana reportada por centros de salud en el período 2003-2015 fue de 124 pacientes. De esos pacientes 51 eran de la Región Central, 37 de la Huetar Caribe y 36 casos de otras regiones. De todos los pacientes 79 eran hombres y 41 mujeres, con edades entre los 8 a los 76 años. Una gran cantidad de esas personas eran veterinarios, agricultores o trabajadores de plantas de sacrificio de animales. Es importante mencionar que con la excepción de 2 casos de *B. neotomae* el resto de los casos eran de *B. abortus* (Hernández *et al.*, 2017).

Por otra parte, se estima que la prevalencia en el período 2014-2016 de brucelosis bovina, determinada a partir de una muestra de 532 199 bovinos por la prueba de Rosa de Bengala (RBT), osciló entre el 10,5% y el 11,4%. No obstante, se realizó un iELISA de los positivos por la prueba RBT y la prevalencia bajó a valores de entre un 4.1% a un 6.0% (Hernández *et al.*, 2017).

Transporte intracelular continuo de membranas

El tráfico endosomal constitutivo es un proceso esencial en las células eucariotas, en el que las membranas se mueven de forma constante desde su lugar de origen en el retículo endoplásmico hasta su destino final en la membrana plasmática, los orgánulos celulares o al espacio extracelular. Los endosomas son orgánulos celulares que se encargan de la clasificación, transporte y reciclaje de proteínas, lípidos y otros materiales celulares, y se encuentran en diversos tamaños y formas (Huotari & Helenius, 2011).

El transporte endosomal se lleva a cabo a través de dos rutas principales: la ruta de reciclaje y la ruta degradativa (**Figura 1**). En la ruta de reciclaje, las membranas se transportan desde el trans-Golgi network (TGN) a los endosomas tempranos, y luego a los endosomas de reciclaje y finalmente a la membrana plasmática. En la ruta degradativa, las membranas se transportan desde los endosomas tempranos a los endosomas tardíos y finalmente a los lisosomas, donde son degradados por las enzimas hidrolíticas (Bonifacino & Glick, 2004).

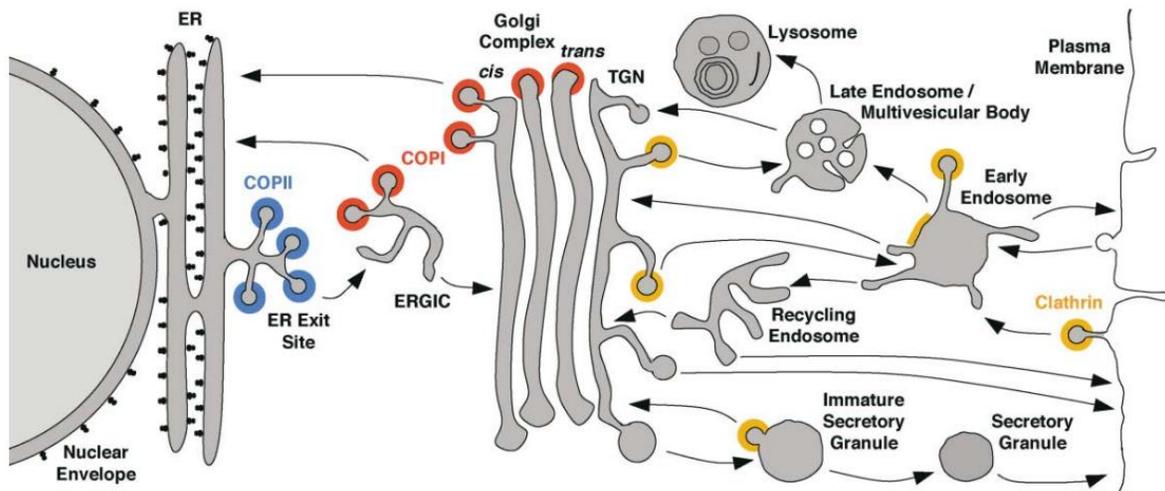


Figura 1. Rutas de transporte intracelular de células eucariotas (Bonifacino & Glick, 2004).

La regulación es esencial para el correcto funcionamiento de la célula. Varias proteínas de señalización, incluyendo GTPasas pequeñas, receptores de membrana y proteínas adaptadoras, están involucradas en este proceso. Además, las proteínas de recubrimiento, como las clatrininas, las adaptinas y las COPI/COPII, también juegan un papel importante al formar las vesículas que se utilizan en este proceso (Luini & Parashuraman, 2016).

Patogénesis

Una vez se da la infección, *Brucella* sp. debe adaptarse a las nuevas condiciones que enfrenta dentro del organismo para poder llevar a cabo el desarrollo intracelular. En términos generales, *Brucella* sp. debe penetrar la célula, alterar el tráfico intracelular, modular el entorno, evitar la muerte en los lisosomas y, en todo el proceso, evadir los mecanismos de defensa del hospedero (Liu, 2015). Para resumir su transcurso por la célula, *Brucella* sp. controla la conversión de su compartimiento intracelular desde una vacuola endosomal (eBCV) a una vacuola replicativa (rBCV) derivada del retículo endoplásmico, mediante la interacción secuencial con los endosomas tempranos, tardíos y con los lisosomas, para luego establecer su nicho replicativo en el retículo endoplásmico (**Figura 2**). A partir de este último, las bacterias pueden replicarse y posteriormente salir para volver a infectar células adyacentes a partir de la biogénesis de un compartimiento relacionado con la autofagia (Lacerda *et al.*, 2013; Celli, 2015).

La entrada de *B. abortus* en las células del hospedero se produce principalmente a través de la fagocitosis por células del sistema inmunológico, como los macrófagos, neutrófilos y células M a través de un mecanismo tipo cremallera (Gorvel & Moreno, 2002). Para ello, la bacteria utiliza varias proteínas de superficie como la proteína de superficie de la membrana externa (Omp25), la proteína BtpA y BtpB que se unen a receptores específicos en la superficie celular del hospedero y están involucradas en la adhesión, la invasión de las células eucariotas, así como la modulación de la respuesta inmune (Billard *et al.*, 2007; Hielpos *et al.*, 2017).

Cabe destacar que la entrada de *Brucella* sp. en las células hospederas depende en gran medida del sistema de dos componentes BvrR/BvrS, que se encarga de regular la

expresión de proteínas de la superficie celular que facilitan el ingreso del microorganismo en células fagocíticas tanto profesionales como no profesionales (Gorvel & Moreno, 2002; Liu, 2015). La bacteria modifica la composición del fagosoma que la rodea para evitar la fusión con lisosomas y la degradación de la bacteria. Para ello, *B. abortus* utiliza el sistema de secreción tipo IV (T4SS) el cual participa en la inhibición de la fusión del fagosoma con lisosomas y ayuda a promover la supervivencia bacteriana dentro de la célula infectada (Ke et al., 2015).

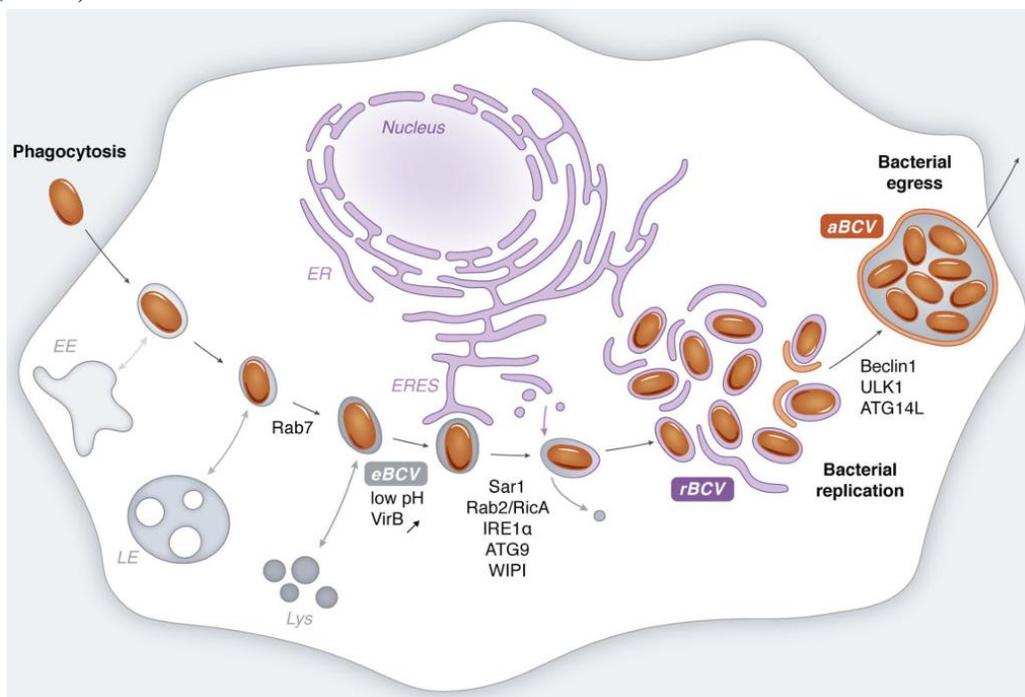


Figura 2. Modelo de la dinámica de transporte de *Brucella* spp. dentro de las células (Celli, 2015).

Además, específicamente en células fagocíticas no profesionales destaca la importancia de GTPasas pequeñas Rac, Rho y Cdc42, las cuales están relacionadas a funciones del citoesqueleto, en la internalización de la bacteria (Alberts *et al.*, 2015; Guzmán-Verri *et al.*, 2001). Una vez que se da la internalización, al acidificarse la vacuola que contiene a *Brucella* a un pH de 4 por el contacto con lisosomas, y al disminuir la disponibilidad de nutrientes, se induce la expresión de factores de virulencia (entre ellos *VirB* y *VjbR*) que modulan la composición del fagosoma para evitar la degradación intracelular y participan en la biogénesis de las vacuolas donde se dará la replicación en el retículo endoplasmático rugoso (RER) (Altamirano-Silva *et al.*, 2018; Celli, 2015; Liu, 2015;

Martínez-Nuñez *et al.*, 2010). También, durante este tráfico intracelular participan otras GTPasas pequeñas diferentes a las que tienen un rol en la internalización (Chaves-Olarte *et al.*, 2002).

Se espera que la asociación de *Brucella* con el RER sea muy beneficiosa desde la perspectiva de la adquisición de nutrientes, aprovechando las rutas biosintéticas de la célula hospedera, los niveles sustanciales de metabolitos y nutrientes que proporcionan un crecimiento bacteriano óptimo a un costo mínimo. Además, la localización proporciona una estrategia excelente para ocultarse de la detección por parte del sistema inmunitario y limitar la exposición evitando, por ejemplo, la fusión lisosomal (Gonzalez-Espinoza *et al.*, 2021).

Sistema de secreción tipo IV

El Sistema de Secreción Tipo 4 (T4SS) es una maquinaria molecular bacteriana que media la transferencia de ADN y/o proteínas a través de la envoltura bacteriana hacia otras células bacterianas o eucariotas. *Brucella abortus* posee un T4SS que es esencial para su patogenicidad. En los últimos años se ha logrado un progreso significativo en la comprensión de la estructura, función y regulación del T4SS. Estos son factores esenciales de virulencia de muchos patógenos importantes, como *Agrobacterium*, *Brucella*, *Helicobacter*, y *Legionella* y esto los convierte en excelentes objetivos para el desarrollo de fármacos (Baron & Coombes, 2007).

El T4SS es codificado por el operón *virB* y juega un papel trascendental; este secreta moléculas efectoras que mantienen una interacción constante entre las *Brucella-Containing Vacuoles* (BCVs) y el retículo endoplásmico hasta que *Brucella* sp. se instale en este último (Liu, 2015). Los investigadores identificaron un regulador transcripcional, VjbR, que se requiere para la expresión de los genes T4SS. También encontraron que VjbR es esencial para la supervivencia y replicación de *B. abortus* en macrófagos, lo que indica la importancia de T4SS en la patogénesis de la brucelosis (Uzureau *et al.*, 2010).

Un estudio investigó el papel de *VirB8* y *VirB10*, dos componentes conservados de T4SS, en *B. abortus*. Los resultados mostraron que estas proteínas son necesarias para el ensamblaje y la estabilidad del T4SS, así como para la secreción de proteínas efectoras (Paschos *et al.*, 2010; Den Hartigh *et al.*, 2008). Se ha visto que en cepas mutadas, la ausencia

de *VirB* conlleva a que la bacteria no pueda dirigirse a retículo endoplásmico y, en cambio, sea eliminada en los fagolisosomas. Este sistema de secreción atraviesa ambas membranas de la bacteria y transloca proteínas al citoplasma de la célula infectada o al dominio citoplasmático de las BCVs que permiten un adecuado curso intracelular y replicación (Lacerda *et al.*, 2013).

Como se mencionó anteriormente, un componente clave del tránsito intracelular y con impacto en el exoproteoma de estas bacterias es el operón *VirB* (sistema de secreción), por lo que se han realizado varios estudios acerca de cuáles proteínas se ven afectadas por la expresión de este, específicamente en *B. abortus*. Pudiéndose notar que al este expresarse se presentan cambios en proteínas bacterianas relacionadas a metabolismo, producción de energía, traslaciones y biogénesis de la membrana celular, transporte de aminoácidos, además de proteínas relacionadas a la virulencia que tienen un papel en la supervivencia intracelular tales como VjbR y Omp25; siendo estos resultados similares a los de un estudio con *B. melitensis* (Paredes-Cervantes *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2009).

Las proteínas secretadas por el T4SS de *B. abortus* desempeñan un papel importante en la modulación de las vías de señalización de las células hospedero, las respuestas inmunitarias y el tráfico intracelular (Rivas-Solano *et al.*, 2022). Es importante mencionar que durante la infección por *Brucella* sp. esta evita la activación del sistema inmune innato al, por ejemplo, inducir pobremente la producción de citoquinas proinflamatorias y NO (Barquero-Calvo, 2007; Yan *et al.*, 2021).

No obstante hay un estudio que indica que al darse la infección existe un aumento en la transcripción de genes que codifican para citoquinas proinflamatorias, lo cual podría ser parte de la respuesta antibacteriana general de la célula (Eskra *et al.*, 2003). Pero, en general, esta bacteria puede replicarse intracelularmente en macrófagos sin causar daño citotóxico (Barquero-Calvo, 2007).

Exoproteoma

El exoproteoma de *Brucella* spp. se define como el contenido proteico que se encuentra en proximidad a la bacteria, siendo estas proteínas secretadas producto de la lisis

celular o de la degradación proteica, además, abarca los diversos cambios en la proteómica que experimentan las células infectadas (Poetsch & Marchesini, 2020).

Parte de las proteínas del exoproteoma de *Brucella* spp. provienen de vesículas de membrana interna que la bacteria libera, pudiéndose observar en estas antígenos de superficie de la bacteria y algunas proteínas inmunogénicas como SOD (Ávila-Calderón, 2012). Existe un estudio en el que se comparó la proteómica de estos orgánulos formadas por *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* y *B. neotomae*, observándose la presencia de varias proteínas homólogas, especialmente proteínas OmpA-like (Ruiz-Palma *et al.*, 2021).

Una serie de proteínas importantes de las que todavía no se conoce con detalle son las proteasas producidas por *Brucella* spp., habiéndose visto que estas tienen importancia en funciones como infección y persistencia dentro del hospedero, respuesta al estrés, morfología, comunicación y señalización; siendo la más estudiada la proteasa *Lon* que está presente en la membrana y contribuye al silenciamiento de macrófagos al modular la respuesta de citoquinas (especialmente causando una disminución en la expresión de TNF- α) en las etapas tempranas de la enfermedad, siendo esta etapa crítica en el control de la infección (Dornand *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2013; Poetsch & Marchesini, 2020).

Un estudio en el que se evaluaron los cambios en la proteómica de células de tejido pulmonar en ratones tras infección por *B. melitensis* encontró un total de 12 proteínas con cambios importantes en su expresión. Por ejemplo, que vimentina, tropomiosina 2 y H2B tipo 1-M, proteínas del citoesqueleto que tienen papeles relevantes en cambios de morfología, motilidad y migración, disminuyeron su expresión después de la infección. Del mismo modo, la proteína SBP1, la cual es importante para mantener funciones celulares normales, también presentó una expresión menor; habiéndose encontrado este mismo resultado en otro estudio en el que se utilizaron macrófagos RAW264.7 (nombre debido al acrónimo de los nombres de los autores originales) infectados con *B. abortus* (Eskra *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2018). En este último, también se encontró que en la infección por *B. abortus* se inhibe la transcripción de varias proteínas relacionadas con el ciclo celular y apoptosis (Eskra *et al.*, 2003).

Proteínas efectoras reguladas por *VirB*

Las proteínas efectoras dependientes de *VirB* son una clase de proteínas bacterianas que se secretan mediante el T4SS en las células hospedadoras. Los patógenos bacterianos utilizan las proteínas efectoras dependientes de *virB* para manipular las células infectadas y subvertir las defensas del hospedero para su supervivencia y replicación; se caracterizan por ser de tamaño pequeño y se dirigen a una variedad de procesos celulares, incluida la transducción de señales, los reordenamientos del citoesqueleto y la evasión inmune. (Xiong et al., 2021). Se han identificado 15 proteínas efectoras secretadas a través del T4SS incluidas BspA, BspB, BspC VceA, VceC, BtpA entre otras (Ke et al., 2015).

Los miembros del regulón VjbR como lo son VceC y VceA fueron descubiertos por De Jong et al. (2008); estos componentes son translocados dentro de los macrófagos mediante el T4SS. Se encontró que VceC interacciona con BiP/Grp78 y genera estrés en el retículo endoplásmico (RE). Además, induce una respuesta proinflamatoria en la célula huésped y reorganiza las estructuras dentro de esta organela (De Jong et al., 2013). Por otra parte, VceA, la cual es dependiente de *virB* y ha sido bien caracterizada, se le considera esencial para la supervivencia y replicación de *B. abortus* dentro de los macrófagos. También está involucrada en la autofagia y la apoptosis, de hecho, un estudio demostró que esta proteína tiene una función inhibitoria de la autofagia (Xiong et al., 2021).

Otras proteínas como BspA, BspB y BspF cumplen la función de mediar la inhibición de la secreción de proteínas por parte de la célula infectada. Estos componentes actúan de forma coordinada para promover la patogénesis de *Brucella* (Myeni et al. en 2013). Ciertamente BspB se ha implicado en la biogénesis de rBCV y la replicación bacteriana óptima, por lo tanto, parece ser uno de los múltiples factores de virulencia que utiliza *Brucella* para remodelar la vía secretora del hospedero para promover su ciclo intracelular. También se ha visto que BspB remodela el tráfico de membrana entre el compartimento intermedio retículo endoplasmático-aparato de Golgi (ERGIC) y el aparato de Golgi (Miller et al., 2017).

En investigaciones más recientes, se descubrió que la proteína TcpB/BtpA es responsable de la inducción de la vía de respuesta a proteínas desdobladas (UPR), lo que a su vez favorece la replicación intracelular (Smith et al., 2013). Además, se observó que esta proteína es capaz de degradar las caspasas inflamatorias presentes en los macrófagos, lo que

resulta en la subversión de la activación del inflamasoma y finalmente en la atenuación de la piroptosis y la inflamación (Jakka et al., 2017). Asimismo, BtpB, que es el segundo efector identificado de *Brucella* que cuenta con un dominio TIR, cuenta con una función clave en la regulación de la respuesta inmune innata durante la infección. Este componente actúa como inhibidor de la señalización de los receptores tipo Toll (TLR) y afecta la activación de las células dendríticas (Salcedo et al., 2013).

Cabe destacar que RicA es una proteína efectora que se comunica con Rab2, una pequeña GTPasa, que tiene la función de regular el tráfico vesicular de Golgi-a-RE. La secreción de RicA es dependiente de *virB*, según lo comenta De Barsey et al. (2011). Además, se detectó que la traslocación de RicA no ocurre en infecciones donde se utilizan mutantes *virB*⁻. Como se ha comentado, el T4SS es fundamental para la sobrevivencia de *B. abortus* en las células infectadas. Se ha evidenciado que las cepas mutantes que carecen de este sistema o de la mayoría de sus efectores presentan dificultades para establecer el nicho replicativo en el RE (Celli et al., 2003).

A pesar de los avances en la investigación de la infección intracelular, todavía no se han descubierto los marcadores celulares eucariotas y procariotas cruciales para la redirección temprana de las BCVs hacia el RE durante las primeras horas de la infección (4-6 horas). Aún con los esfuerzos de muchos grupos de investigación durante más de una década, el mecanismo completo de acción del T4SS *virB* y sus efectores sigue sin definirse. No obstante, los estudios de proteómica que caracterizan las vacuolas han proporcionado una base sólida para la investigación de los mecanismos específicos utilizados por las bacterias patógenas para modular el tráfico intracelular y crear compartimentos esenciales para su patogénesis, particularmente en el caso de *B. abortus*.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

Objetivo general

- Entender el proceso de tráfico intracelular de *B. abortus* a través de la caracterización proteómica de los compartimientos intracelulares en los cuales transita esta bacteria.

Objetivos específicos

1. Determinar la composición proteómica de compartimientos aislados a tiempos tempranos (4 - 6 h) de infección a partir de las cepas 2308W y *virB10*- y validar dicha composición con datos preexistentes obtenidos en una plataforma de espectrometría de masas distinta.
2. A partir de datos preexistentes, realizar la anotación de las proteínas diferencialmente expresadas (cualitativa y cuantitativamente) en compartimientos de las cepas 2308W y *virB10*-.
3. Verificar la eficacia del protocolo utilizado para el aislamiento y purificación de las *Brucella-containing vacuoles* BCVs).

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas que se utilizaron en los experimentos fueron: *B. abortus* 2308W (wild type virulenta) (Jones et al., 1965) y una cepa *B. abortus* 2308W *virB10*- que cuenta con una deleción polar del gen que codifica por el T4SS (Sieira et al., 2000; Pathak et al., 2018) encontradas en ATCC (www.atcc.org); cepas con las que cuenta la sección de bacteriología médica. Para el crecimiento de dichas cepas se usó el caldo tripticasa de soya (CTS) dónde se mantuvieron hasta el alcance de la fase exponencial de crecimiento.

Cultivo celular e infección

Macrófagos murinos de la línea RAW 264.7 fueron cultivados siguiendo el protocolo detallado en (Chaves-Olarte et al., 2014) (**Figura 3**); las infecciones de macrófagos con las cepas de *B. abortus* se realizaron con una multiplicidad de infección (MOI) de 2000 bacterias/célula como se detalla a continuación (Chaves-Olarte et al., 2014). Los macrófagos se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con antibióticos (penicilina 10 000 µg/mL y estreptomycin 10 000 U/mL) y 10% de suero fetal bovino (SFB), y se llevaron aproximadamente a un 80% de confluencia en placas de 6 pozos.

Seguidamente, se removió el medio y se inocularon los macrófagos con la solución bacteriana respectiva preparada en medio DMEM de infección (sin antibióticos con 10% de SFB), se procedió a centrifugar las placas a 1600 rpm para fomentar el contacto e internalización de *B. abortus* y luego se incubaron por 30 min a 37°C con una atmósfera enriquecida con 5% de CO₂.

Posteriormente, se removió el medio DMEM de infección y se añadió solución para la eliminación de las bacterias extracelulares (medio DMEM de infección con 500 mL de gentamicina a una concentración de 100 mg/mL); luego, se incubaron bajo las mismas condiciones anteriores durante 1 h. Luego de la incubación se sustituyó este medio por solución de mantenimiento de la infección (medio DMEM de infección con gentamicina al 5 mg/mL). El aislamiento y la purificación, así como las mediciones posteriores se realizaron

a las 4 horas post-infección (h.p.i.) según lo propuesto en este trabajo experimental (**Figura 4**)

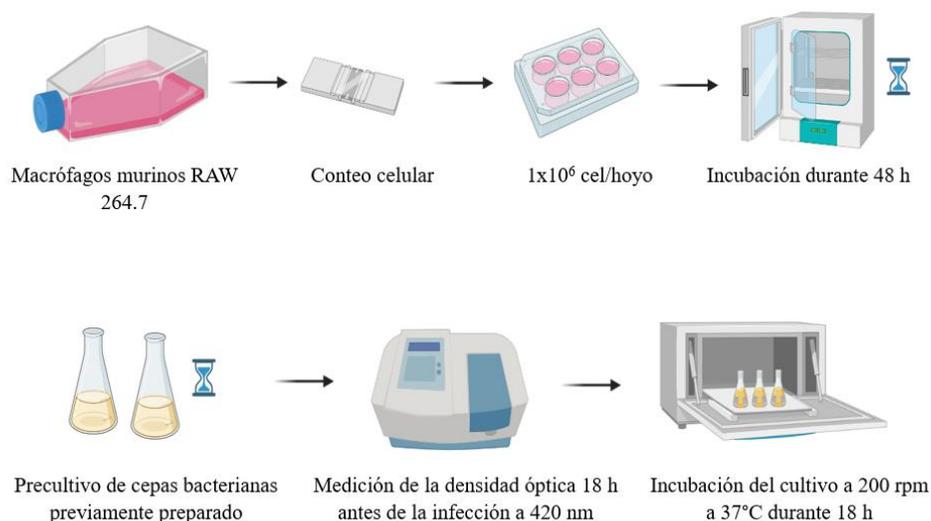


Figura 3. Esquema del proceso de cultivo celular de macrófagos RAW 264.7 y preparación del cultivo de las cepas bacterianas *Brucella abortus* 2308W y *virB10⁻* a partir de sus respectivos precultivos para la elaboración de los inóculos necesarios en la subsiguiente infección.

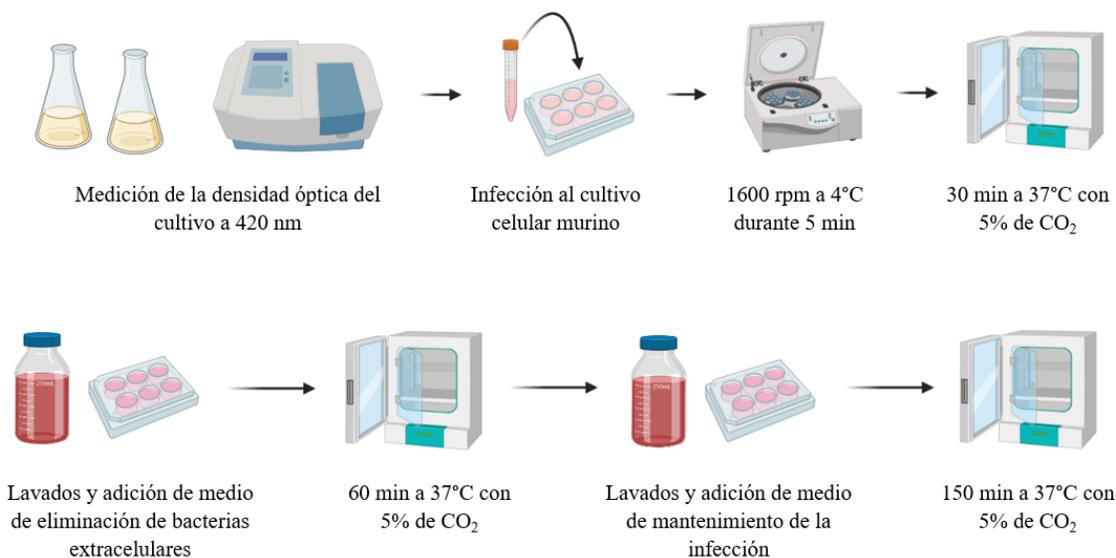


Figura 4. Esquema del proceso de infección de los macrófagos RAW 264.7 a partir de los inóculos bacterianos derivados de los respectivos cultivos según cada cepa utilizada. Una vez inoculados se tomó el tiempo para completar un total de 4 horas de infección para el posterior paso de aislamiento y purificación de las BCVs.

Aislamiento y purificación de BCVs

Para obtener las BCVs, los macrófagos infectados durante 4 horas se lisaron y su contenido intracelular se procedió a fraccionar. Primero, las BCVs fueron aisladas en un sobrenadante post nuclear (SPN) según la metodología descrita por Chaves-Olarte et al. (2014), para posteriormente purificarlas por un gradiente discontinuo de sacarosa con base en la metodología propuesta por Desjardins et al. (1994); salvo las modificaciones descritas a continuación.

Posterior a la incubación con medio de mantenimiento de infección, para mantener las BCVs íntegras y lisar las células infectadas, el precipitado del raspado de las placas de 6 pozos se resuspendió en un amortiguador de lisis isotónico (ILB; sacarosa 250 mM, Hepes 20 mM, EGTA 0.5 mM y cóctel de inhibidores de proteasas, pH 7.4) (Mills & Brett, 1998) y se procedió a pasar de manera manual a través de una aguja de tuberculina (26 G x 1') en una jeringa de 5 mL durante 20-25 veces, para primero lisar las membranas plasmáticas, pero no los núcleos de los macrófagos que fueron infectados.

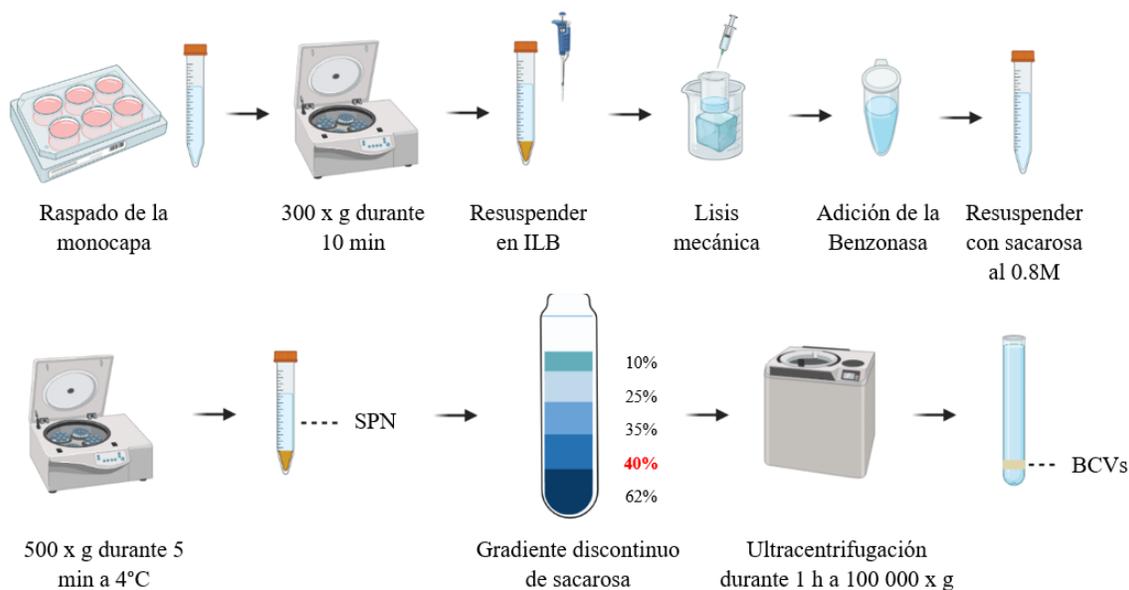


Figura 5. Aislamiento y purificación de las BCVs de macrófagos RAW 264.7 a 4 h.p.i. Las BCVs se enriquecieron mediante un gradiente discontinuo de sacarosa y fueron purificadas mediante ultracentrifugación para la posterior extracción proteica.

Seguidamente se añadió 25 µL de Benzonasa (Sigma-Aldrich) para degradar los ácidos nucleicos y se incubó durante 30 minutos a 37°C para eliminar restos de material genético. En un primer gradiente de sacarosa de 0,8 M (Chaves-Olarte et al., 2014), la solución anterior se cargó para obtener, por medio de centrifugación, el SPN; se procedió a añadir el mismo volumen de sacarosa al 62% para obtener una concentración al 40% de sacarosa (todas las soluciones de sacarosa fueron preparadas por % peso/peso en Imidazol 3 mM, pH 7.4). La solución anterior, se cargó en un gradiente escalonado de sacarosa discontinuo (Desjardins et al., 1994) para purificar las BCVs por medio de ultracentrifugación durante 1 h a 100 000 x g (**Figura 5**).

Extracción de proteínas

Se infectaron 4 placas de 6 pozos de macrófagos RAW 264.7 con las cepas *B. abortus* 2308W o *virB10*-, tal y como se mencionó; con el objetivo de obtener las proteínas del lumen de la vacuola y de la membrana provenientes de las BCVs a las 4 h.p.i. Las fracciones celulares purificadas con las BCVs se diluyeron en 1:4 en ILB para disminuir la concentración de sacarosa y durante 15 minutos a 16 873 x g en un rotor de ángulo fijo (Eppendorf, FA-42-18-11) fueron centrifugadas con el fin de sedimentar las BCVs en una centrífuga Eppendorf 5418.

En Tritón X-100 (0,1% peso/volumen en PBS) el sedimento que se obtuvo fue resuspendido para solubilizar las proteínas de membrana y luminales de las BCVs. Las proteínas de las BCVs, mediante centrifugación (mismas condiciones previas), fueron extraídas en el sobrenadante resultante (**Figura 6.1**), además, en este paso, se separaron las brucelas intracelulares (BI) en el sedimento (Fugier et al., 2009; Monge, 2019).

Las BI no se utilizaron para este trabajo y fueron desechadas; por otro lado, los lisados obtenidos de las BCVs, procedentes de los macrófagos murinos infectados con las cepas utilizadas para este trabajo, se llegaron a procesar con las columnas Pierce Detergent Removal Spin Column (Thermo Scientific), lo anterior con la finalidad de remover los remanentes de Tritón X-100. Se siguieron las indicaciones de la casa comercial (Thermo Scientific, 2015), y a los eluidos se les cuantificó la concentración de proteínas para un

posterior análisis proteómico por HPLC-MS/MS (**Figura 6.2**) utilizando el equipo provisto por el Instituto Clodomiro Picado (ICP).

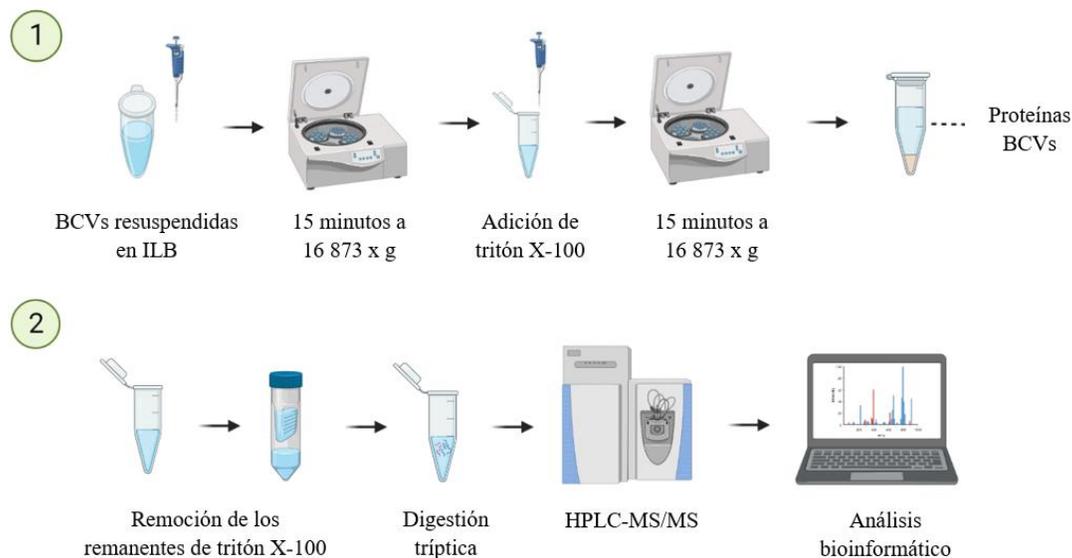


Figura 6. Proteómica de las BCVs. 1) Extracción de las proteínas presentes en las BCVs de los macrófagos murinos previamente infectados con las distintas cepas. 2) Digestión de las proteínas previamente extraídas y preparación para el análisis proteómico mediante HPLC-MS/MS y el posterior análisis bioinformático.

Digestión de las proteínas y HPLC-MS/MS

Se procesaron muestras procedentes de 3 experimentos independientes de aislamiento y purificación de BCVs de macrófagos murinos infectados con una de las 2 cepas utilizadas durante 4 h.p.i. Se utilizó el NanoDrop (Thermo Scientific) para determinar la concentración de las proteínas extraídas en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en cada muestra, lo anterior con la finalidad de conocer el volumen de muestra de proteínas para obtener una concentración final de $15 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína y proceder a hacer la digestión (**Tabla 2**).

Se redujeron $15 \mu\text{g}$ de cada muestra con ditiotretitol (20 mM) durante 30 min a $56 \text{ }^\circ\text{C}$, se alquilaron con yodoacetamida (100 mM) durante 20 min en la oscuridad a temperatura ambiente, se incubaron con ditiotretitol (30 mM) durante 30 min a temperatura ambiente y se digirieron con tripsina grado secuenciación a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante la noche en un volumen total de $35 \mu\text{L}$.

Se añadió 0.2 μL de ácido fórmico, los péptidos trípticos se concentraron utilizando un Vacufuge (Eppendorf), se disolvieron en ácido fórmico al 0.1 % (solución A) y se cargaron 10 μL de la mezcla peptídica (0.7 μg) en una columna trampa C18 (75 μm x 2 cm, partícula de 3 μm ; PepMap, ThermoFisher) en un cromatógrafo nano-Easy 1200 (ThermoFisher). Después de lavar con ácido fórmico al 0.1 % (solución A), los péptidos se separaron a 200 nl/min en una columna C18 Easyspray® (75 μm x 15 cm, partícula de 3 μm ; PepMap, ThermoFisher). Se desarrolló un gradiente hacia la solución B (80 % de acetonitrilo, 0.1 % de ácido fórmico) (1–5 % de B en 1 min, 5–25 % de B en 100 min, 25–70 % de B en 15 min, 70–98 % de B en 5 min y 98% B en 9 min).

Los espectros de MS se adquirieron usando un espectrómetro de masas Q-Exactive Plus® (ThermoFisher) operado en modo positivo a 1.9 kV, con una temperatura capilar de 230 °C, usando 1 μs en el rango 400–1600 m/z, tiempo máximo de inyección de 100 msec, objetivo AGC de 3×10^6 y resolución de 70 000. Los 10 iones principales con 2 a 4 cargas positivas se fragmentaron con un objetivo de AGC de 1×10^5 , AGC mínimo de 2×10^3 , tiempo de inyección máximo de 110 ms, tiempo de exclusión dinámica de 5 s y resolución de 17 500 (**Tabla 1**).

Los espectros de MS/MS se procesaron para la asignación de coincidencias de péptidos a familias de proteínas conocidas por similitud con secuencias contenidas en la base de datos UniProt/SwissProt de los proteomas de *Mus musculus* UP000000589 y *Brucella abortus* 2308 UP000002719 (UniProt, septiembre de 2022) fusionadas en un archivo FASTA utilizando la plataforma MaxQuant 2.0.3.1

La carbamidometilación de cisteína se estableció como una modificación fija, mientras que la desamidación de la asparagina o la glutamina y la oxidación de la metionina se establecieron como modificaciones variables. Se permitió hasta 2 escisiones perdidas por la tripsina. Los parámetros para la aceptación de coincidencias se establecieron en False Discovery Rate (FDR) < 1 %.

Tabla 1. Resumen de los parámetros con los que se obtuvieron los datos MS y MS/MS.

Parámetro	MS	Selección de precursor MS	MS/MS
Resolución	70 000		17 500
Control automático de ganancia (AGC) objetivo	3e6	2e3	1e5
Umbral de intensidad (IT) máximo	100 ms		110 ms
Rango MS	400 - 1600 m/z		
Conteo de bucles			10
Energía de colisión normalizada (NCE)			28
Ventana (ancho) de aislamiento			1.4 m/z
Carga		2-4	

Análisis bioinformático

Se tomaron los datos crudos (raw data) de un experimento previo, realizado bajo condiciones similares, cuyo análisis proteómico fue ejecutado en el Laboratorio de Proteómica de la Universidad de Osnabrück, Osnabrück, Alemania; se cargaron los datos al software MaxQuant 2.0.3.1 para su análisis respectivo y las listas generadas se denominaron experimento Alemania (Al). Del mismo modo, los datos de espectrometría de masas generados por el ICP procedentes de las muestras del experimento realizado en el Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CIET), se analizaron mediante el mismo software y las listas generadas se denominaron experimento Costa Rica (CR).

Las listas de los experimentos CR y Al se exportaron al programa Perseus 1.6.15.0 con el fin de realizar comparaciones entre las proteínas detectadas en las BCVs de células infectadas con *B. abortus* 2308W y *virB10*- a nivel intragrupal como intergrupala. Se determinaron las proteínas de cada grupo (2308W o *virB10*-) que estuvieran presentes en al menos 2 de 3 de las réplicas biológicas analizadas (proteínas validadas) y ausentes en las 3 réplicas del grupo contrario (proteínas exclusivas) tanto para los experimentos CR como Al.

El proceso biológico en el que participan, la función molecular, el compartimiento subcelular en el que se encuentra, así como la ortología según la base de datos KEGG fueron analizados con el uso del mismo programa y la importación de base de datos accesorias (Tyanova et al., 2016).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

Mediante el enfoque comparativo se logró identificar proteínas significativas relacionadas con el movimiento intracelular de las BCVs.

En el marco de esta investigación, se empleó la técnica HPLC-MS/MS para identificar y cuantificar las proteínas presentes en muestras derivadas de las BCVs de macrófagos murinos infectados con las cepas *B. abortus* 2308W y *virB10*- (**Figura 7**). Se utilizó la cepa *virB10*- como control, ya que se sabe que es deficiente en T4SS. Este enfoque permitió identificar las proteínas que difieren entre los compartimentos y que, por lo tanto, tienen un alto poder discriminatorio en el análisis y una relevancia biológica.

Se espera que la presencia de ciertas proteínas exclusivamente encontradas en las vacuolas derivadas de la cepa *B. abortus* 2308W favorezca el establecimiento de una rBCV, mientras que la presencia de proteínas exclusivas en las BCVs, asociadas a procesos degradativos y oxidativos, derivadas de macrófagos infectados con la cepa *virB10*- podrían corresponder a las de un patógeno que no logra evadir la ruta lisosomal.

Tabla 2. Concentración de proteínas presentes en las muestras de BCVs obtenidas mediante el NanoDrop.

Muestras CR	Concentración µg/µL
<i>B. abortus</i> 2308 réplica 1	0.58
<i>B. abortus</i> 2308 réplica 2	0.42
<i>B. abortus</i> 2308 réplica 3	0.77
<i>B. abortus virB10</i> - réplica 1	1.03
<i>B. abortus virB10</i> - réplica 2	0.79
<i>B. abortus virB10</i> - réplica 3	0.20

Para el grupo CR se determinó un promedio de 240 y 250 en las 3 réplicas independientes en las BCVs de las cepas 2308W y *virB10*- respectivamente; del mismo modo, para el grupo Al se encontraron 2 164 y 2 301 proteínas (**Figura 7A**). Se definió como proteínas con alto grado de confianza aquellas que estuviesen presentes como mínimo en 2 de las 3 réplicas (proteínas validadas) para cada cepa y grupo experimental.

De acuerdo con lo anterior, para el grupo CR se halló que el 91,67% y el 89,60% (2308W y *virB10*- respectivamente) de estas proteínas estuvieron presentes como mínimo en 2 de 3 réplicas. En esta misma línea, para el grupo AI se determinó que el 100% de las proteínas halladas tanto para las BCVs de las cepas 2308W y *virB10*- tienen un alto grado de confianza y por ende son consideradas como validadas (**Figura 7B**).

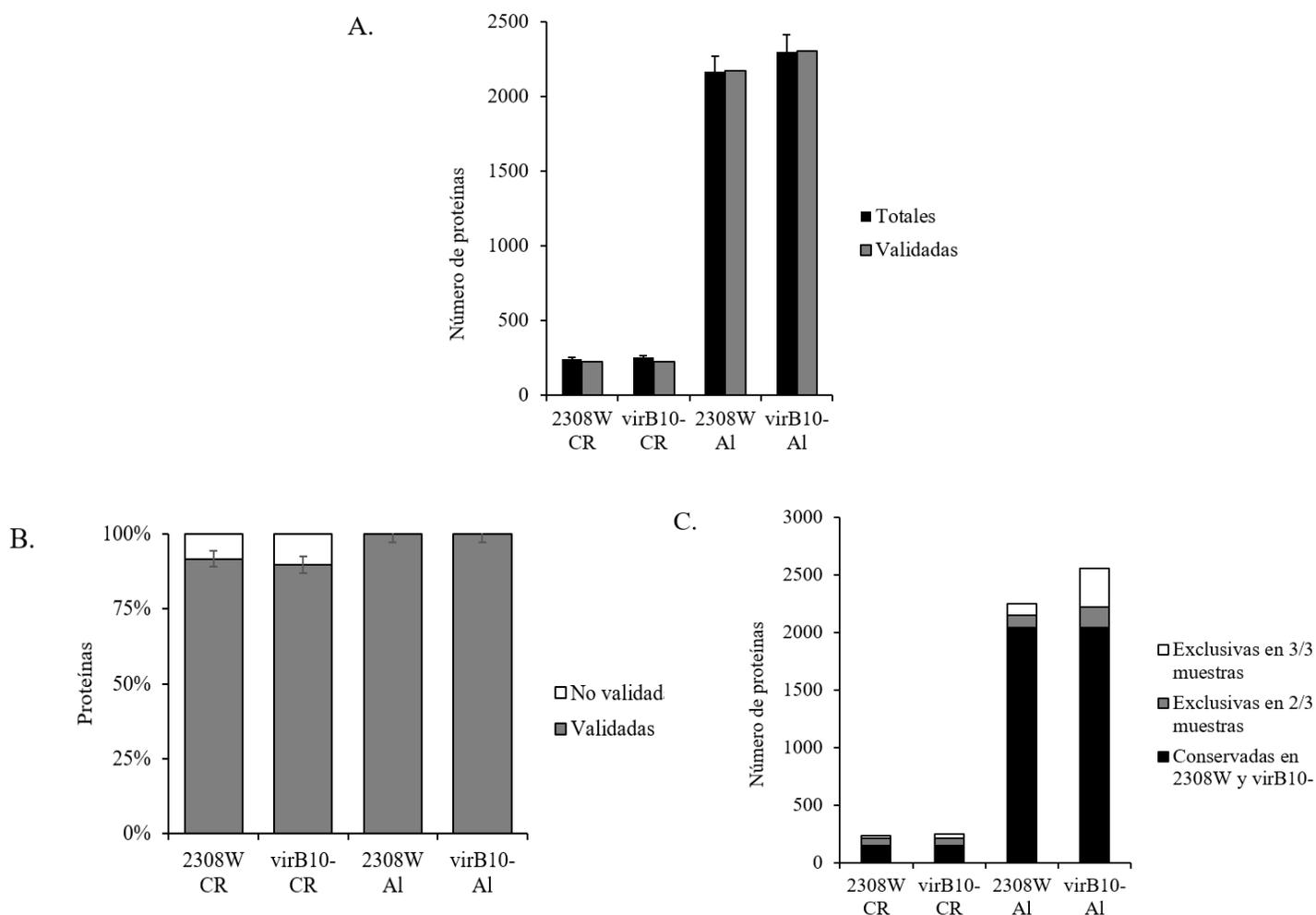


Figura 7. Valores de proteínas detectadas por medio de HPLC-MS/MS en lisados de BCVs purificadas a las 4 h.p.i. (CR) y 6 h.p.i. (AI) de macrófagos RAW 264.7 y la distribución entre los grupos analizados. **(A)** Valores absolutos promedio de proteínas totales y validadas presentes en mínimo 2 de 3 réplicas en cada grupo analizado. **(B)** Valores porcentuales de proteínas validadas y no validadas a nivel intragrupal. **(C)** Número de proteínas conservadas (presentes tanto en 2308W como *virB10*-) y exclusivas (encontradas solo en 2308W o *virB10*-) a nivel intergrupar.

Para determinar qué proteínas caracterizan exclusivamente los compartimentos contenedores de las cepas 2308W o *virB10*⁻, se compararon las listas de proteínas obtenidas y luego se evaluó su importancia biológica. La **Figura 7C** muestra que para el grupo experimental CR 150 proteínas se encontraron en ambas cepas, mientras que 70 proteínas fueron detectadas exclusivamente en las muestras de 2308W (**Anexo A1**) y 74 proteínas fueron exclusivas de *virB10*⁻ (**Anexo A2**). En el caso del experimento A1 se hallaron 2 042 proteínas en común entre las cepas, 130 proteínas exclusivas en las muestras de 2308W y 258 exclusivas de *virB10*⁻.

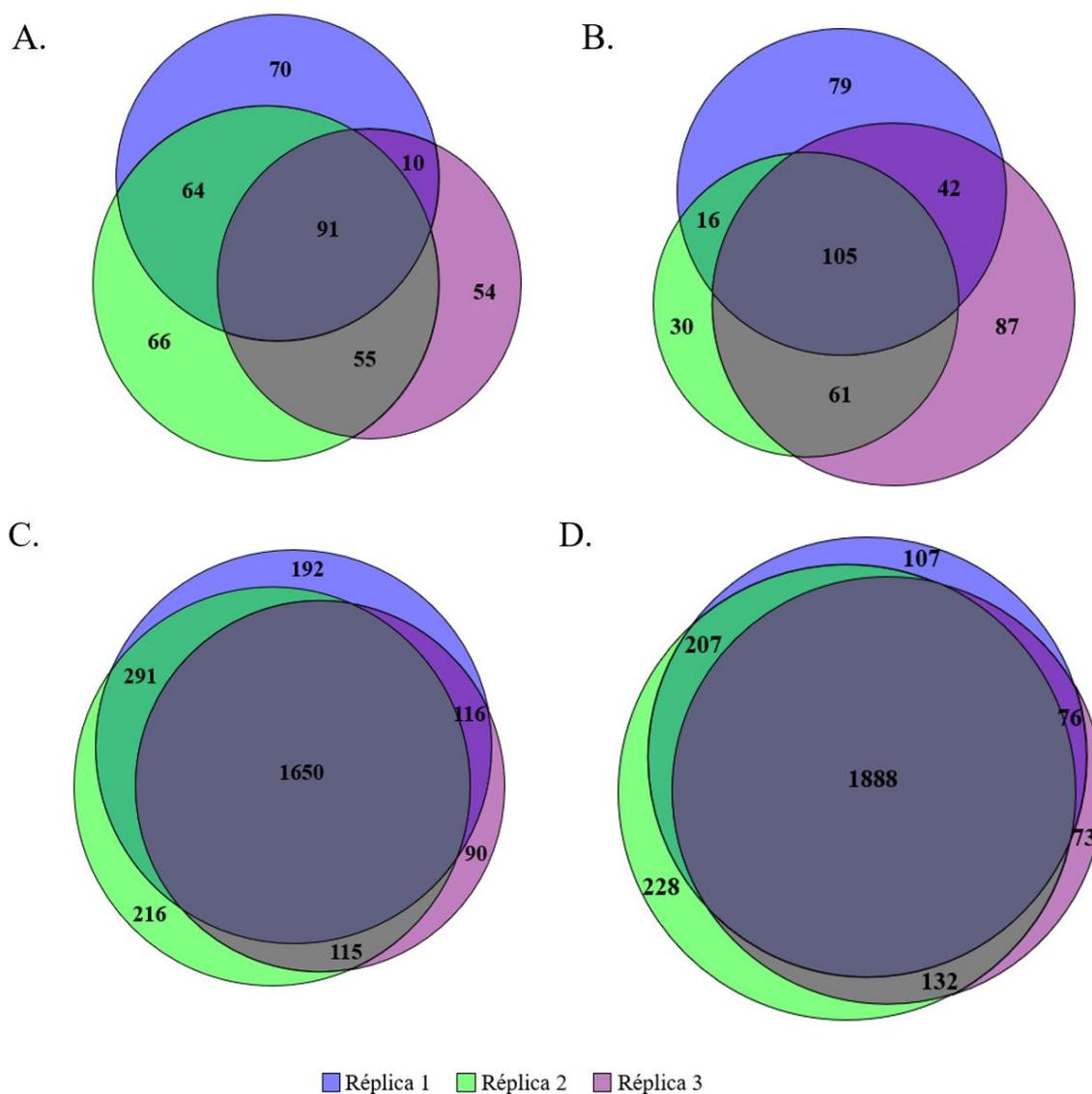


Figura 8. Comparaciones intragrupales del número de proteínas validadas detectadas por réplica para el grupo (A) 2308W CR, (B) *virB10*⁻ CR, (C) 2308W A1 y (D) *virB10*⁻ A1.

Con el fin de determinar la reproducibilidad de los ensayos ejecutados, se realizó una comparativa a nivel intragrupal del número de proteínas validadas que fueron determinadas en las 3 réplicas (**Figura 8**). Según lo indicado en la **Figura 9**, se tiene que en el caso de la cepa 2308W de las proteínas comunes a nivel intragrupal para el grupo CR y Al el porcentaje equivale a un 37.92% y 76.25% respectivamente, con respecto al total de proteínas validadas; mientras que utilizando la cepa *virB10* el valor porcentual equivale a un 42.00% y 82.05% para los experimentos CR y Al.

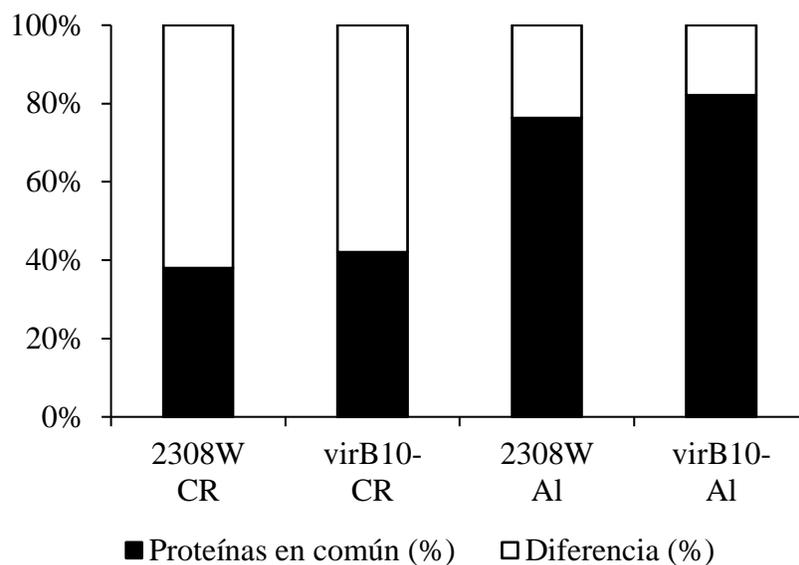


Figura 9. Valores porcentuales de las proteínas conservadas en las 3 réplicas a nivel intragrupal (proteínas en común) con respecto al promedio de proteínas totales determinadas según cada grupo analizado.

Se procedió a realizar comparaciones de las proteínas validadas entre las cepas para los 2 grupos experimentales, como se muestra en la **Figura 10**, para el caso del experimento CR 150 proteínas se hallaron como “comunes o conservadas” entre las cepas 2308W y *virB10*; del mismo modo, para el experimento Al 2 042 proteínas se identificaron como compartidas a nivel de las dos cepas utilizadas.

Fue de interés determinar si las proteínas identificadas como “comunes” se conservaban entre los experimentos CR y Al, por tanto, se procedió a compararlas y se halló que casi la totalidad de las proteínas comunes del experimento CR con excepción de 2, se encuentran incluidas dentro de las proteínas conservadas en el experimento Al (**Figura 11A**).

En esta misma línea, se realizó una comparación con una leve diferencia que consistió en comparar las proteínas validadas (presentes en 2/3 réplicas) e identificadas como conservadas del grupo AI contra las proteínas presentes en 1/3 réplicas y conservadas del grupo CR; se observó que bajo estas condiciones el número de proteínas conservadas que comparten ambos experimentos asciende a 280 (**Figura 11B**).

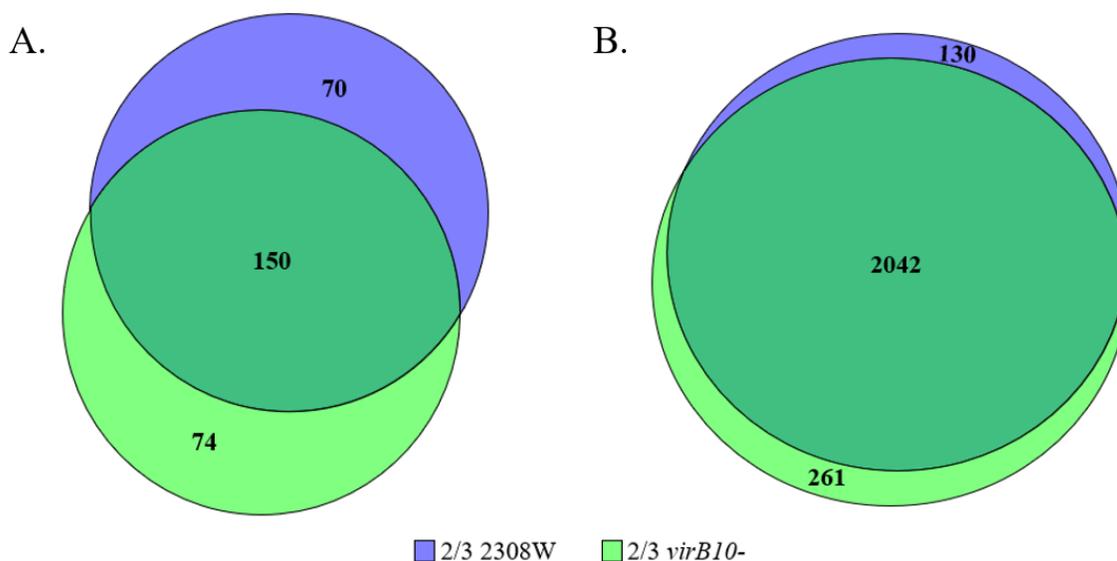


Figura 10. Comparaciones intergrupales de las proteínas validadas detectadas según la cepa para el grupo (A) Costa Rica (CR) y (B) Alemania (AI).

Siguiendo la misma línea comparativa, se procedió a contrastar las proteínas determinadas como exclusivas en 2/3 réplicas de los grupos CR y AI a nivel de las cepas 2308W y *virB10*. Para la primer cepa, no se encontraron proteínas en común entre los dos experimentos (**Figura 12A**), sin embargo, para la segunda cepa, hubo 3 proteínas compartidas por ambos grupos (**Figura 12B**).

Como parte de los objetivos de este trabajo, se determinó el número de proteínas en las BCVs y su distribución según la taxonomía, ya sea que la proteína identificada proviniera de ratón o de la bacteria. Los resultados que se muestran en la **Tabla 3** indican que del total de proteínas validadas se obtuvo una alta proporción de proteínas procedentes de *Mus musculus*, lo anterior tanto a nivel de ambos experimentos como de las cepas utilizadas. Tanto en el experimento CR como AI, de las proteínas pertenecientes a *B. abortus* provenientes de las BCVs de 2308W se encontró la proteína Q2YM08, además, la proteína Q2YIJ3 fue

encontrada en el experimento A1. Asimismo, en el experimento CR también se encontró la proteína Q2YM08 utilizando la cepa *virB10*.

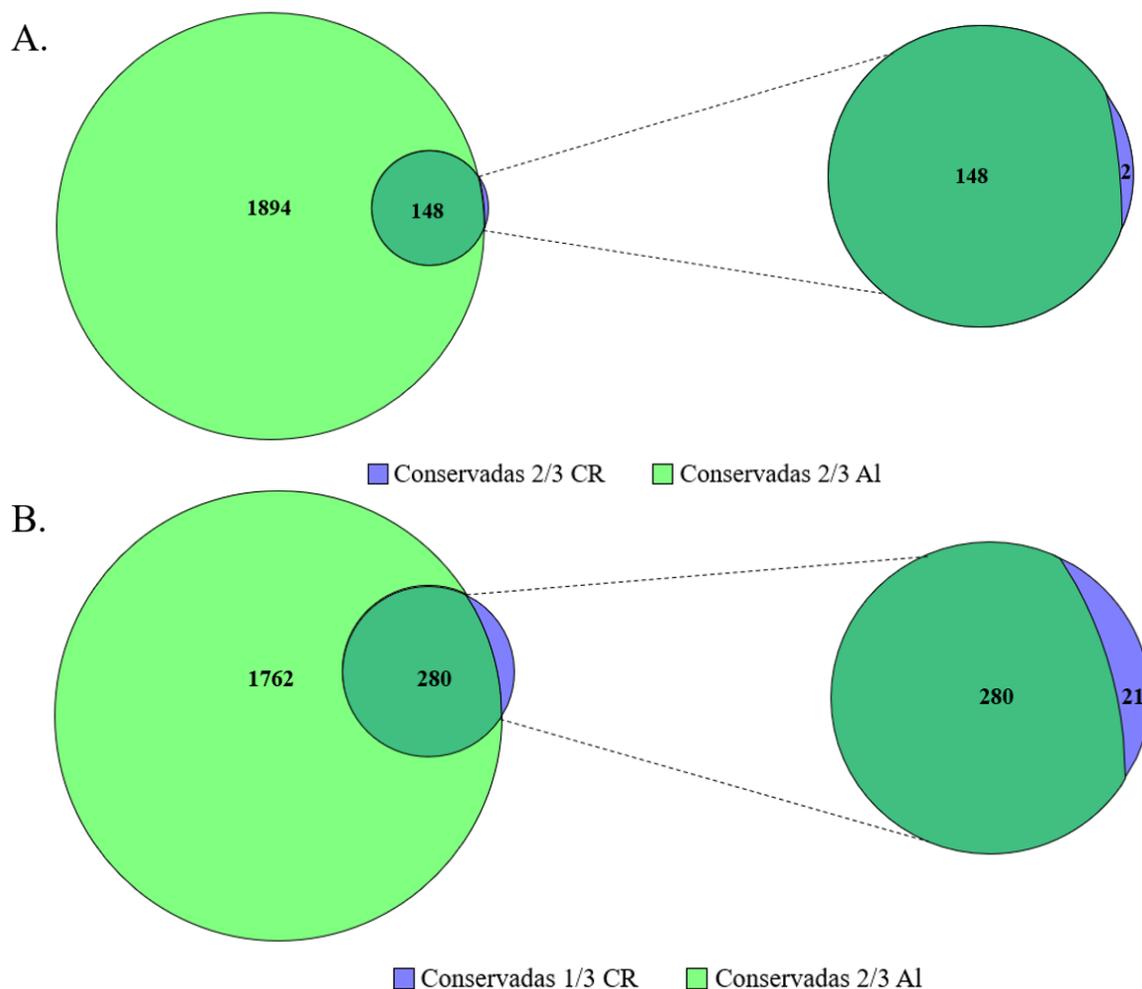


Figura 11. Comparación de las proteínas determinadas como comunes en (A) 2 de 3 réplicas presentes en los grupos CR y A1, y (B) 1 de 3 réplicas del grupo CR con respecto a aquellas presentes en 2 de 3 réplicas del grupo A1.

Con el fin de explicar y categorizar la funcionalidad biológica de las proteínas exclusivas del experimento CR, se procedió a realizar anotaciones funcionales como determinación del proceso biológico, función a nivel molecular, compartimiento subcelular en el que se encuentran y la asignación según las vías KEGG tanto para las BCVs de la cepa 2308W y *virB10* (Anexo A1 y A2).

Tabla 3. Número de proteínas determinadas en las BCVs y su distribución según el grupo taxonómico (ratón o bacteria) para cada grupo experimental (CR y AI).

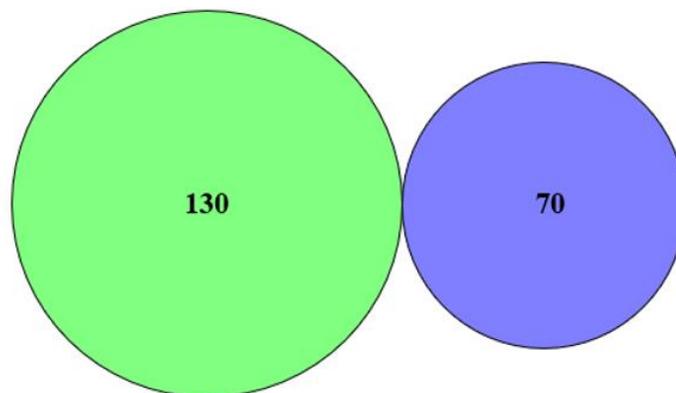
	2308W CR	<i>virB10</i>⁻ CR	2308W AI	<i>virB10</i>⁻ AI
Total proteínas 2/3	220	224	2172	2303
Proteínas <i>Brucella abortus</i>	1	1	2	0
Proteínas <i>Mus musculus</i>	219	223	2170	2303

Relacionado con lo anterior para ambos experimentos y cepas se asociaron proteínas a procesos metabólicos, de señalización y transporte celular así como varios procesos celulares según la función biológica en la que participan. En cuanto al funcionamiento molecular se determinaron proteínas asociadas a transportadores transmembrana, actividad enzimática, procesamiento de la información genética, proteínas de unión entre otras.

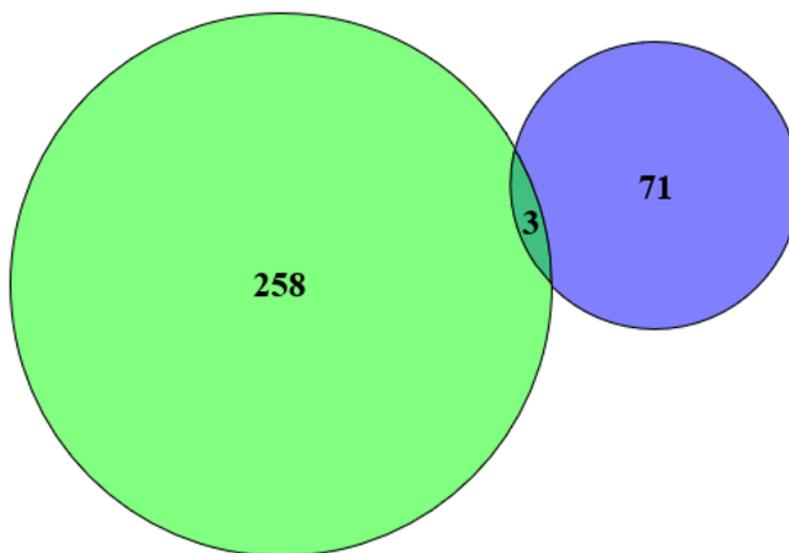
Asimismo, fue posible asociar las proteínas a un compartimiento subcelular, hallándose estas como parte de vesículas intracelulares, asociadas a organelas como el retículo endoplasmático y aparato de Golgi, espliceosoma, proteosoma, citoesqueleto, núcleo, membrana plasmática entre otros. Utilizando el programa comentado en la metodología se relacionaron dichas proteínas con una función determinada por la base de datos KEGG; entre las acciones biológicas en las que participan se encuentran: metabolismo de carbohidratos, lípidos, aminoácidos, purinas, procesos de señalización, transporte de material genético, degradación de ARN, entre otros procesos celulares.

Para ambas cepas, se ha encontrado una cantidad no despreciable de proteínas no categorizadas según su proceso biológico, función molecular o compartimiento subcelular al que pertenecen; además se hace notar que en la base de datos KEGG aún hay un gran número de proteínas que no han sido definidas. Por tanto, no se conoce la información biológica que estas proteínas podrían proporcionar.

A.



B.



■ Exclusivas 2/3 CR ■ Exclusivas 2/3 AI

Figura 12. Comparación de las proteínas determinadas como exclusivas en 2 de 3 réplicas presentes en las BCVs de la cepa (A) 2308W y (B) *virB10*⁻ en los grupos CR y AI.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

Las BCVs son un compartimento altamente complejo que constantemente interactúa con múltiples vías y organelas presentes dentro de la célula hospedera. Es fundamental poder identificar las diversas modificaciones que ocurren en este compartimento durante las distintas etapas del tráfico intracelular, con el fin de comprender mejor la patogénesis de *Brucella* y cómo su sistema de secreción *VirB* modifica su composición para evitar la ruta lisosomal y transportar la bacteria hacia el retículo endoplásmico.

Diferentes técnicas han sido utilizadas en el pasado para purificar los compartimentos que contienen patógenos intracelulares; entre ellas se encuentran la ultracentrifugación para realizar fraccionamiento subcelular, la microscopía de inmunofluorescencia, la inmunopurificación magnética, la filtración, la técnica Western blot entre otras más (Herweg et al., 2015). Se llevó a cabo de manera exitosa en este estudio, la implementación de un protocolo para el enriquecimiento de BCVs durante las primeras etapas de infección en macrófagos murinos RAW 264.7. Como consecuencia de que aún no se han identificado blancos adecuados de *B. abortus* para ser utilizados en técnicas de inmunopurificación, resulta necesario comenzar con la búsqueda y enriquecimiento de las vacuolas utilizando procedimientos basados en el fraccionamiento subcelular como fue ejecutado según la metodología antes descrita.

En estudios previos por medio de inmunofluorescencia se llegó a determinar una buena recuperación de bacterias compartimentalizadas en la interfase de sacarosa al 62% (**Figura 5**) sugiriendo la presencia de una membrana circundante; además del hallazgo de bacterias no envueltas en una membrana fosfolipídica en el precipitado (Monge, 2019), justificándose la selección de esta interfase para el estudio de las BCVs que se llevó a cabo en esta investigación. Cabe destacar que según la técnica antes mencionada en la metodología, se requiere de gran habilidad y cantidad de material celular para obtener resultados visibles de las BCVs, por lo cual no se descarta la posibilidad de contaminación en las preparaciones de dichos compartimentos con otro material que no es de interés perteneciente a las células utilizadas en la infección.

Se llevó a cabo una comparación de las listas de proteínas resultantes de los análisis HPLC-MS/MS entre las cepas 2308W y *virB10*- con el fin de destacar las diferencias a nivel cualitativo y cuantitativo de los compartimentos intracelulares a las 4 h.p.i. (experimento CR) así como también se comparó contra una base de datos de un ensayo previo dónde se efectuó una metodología similar con una diferencia como el tiempo postinfección que fue de 6 horas (experimento AI).

Como muestra la **figura 7A** es evidente la diferencia en el número de proteínas totales entre ambos experimentos, hallándose 9 veces más proteínas en las BCVs del experimento AI a pesar de haberse utilizado las mismas cepas. No obstante, en estudios de proteómica comparativa se ha determinado un menor número de proteínas que las encontradas en AI. En preparaciones de compartimentos intracelulares de bacterias como *Mycobacterium tuberculosis* se hallaron 835 proteínas totales (Geffken et al., 2015), para *Salmonella enterica* 552 proteínas del hospedero (Vorwerk et al., 2015), en el caso de *Legionella pneumophila* 1150 proteínas derivadas de macrófagos infectados (Hoffmann et al., 2014) y 152 expresadas diferencialmente derivadas de un fagosoma de *Dictyostelium* (Shevchuk et al., 2009), 1625 proteínas en un ensayo de infección de células HELA con *Salmonella enterica* serovar *Thyphimurium* (Liu et al., 2015).

Entre las posibilidades que expliquen dichas diferencias se encuentra la metodología antes descrita, existen muchos pasos en los que pequeñas variaciones podrían repercutir en los resultados obtenidos, por ejemplo la confluencia en la que se encontraban los macrófagos utilizados dado que esto se traduce en la cantidad de material celular eucariota disponible para que *Brucella* pueda infectar. Si bien los estudios mencionados en promedio arrojan menos proteínas que las determinadas en el grupo AI, en el experimento CR se encuentran valores aún menores que los indicados en los estudios. En estos se han utilizado técnicas de purificación más finas con uso de determinantes moleculares que se conocían de previo, lo cual no es posible aplicar con *B. abortus*. Otros aspectos que pudieron contribuir a la obtención de resultados discordantes entre ambos experimentos incluyen: el hecho de que en Alemania se encontrara una plataforma distinta, un espectrómetro de masas que utilizó condiciones diferentes a las del ICP; además cabe la posibilidad de que el nanoHPLC fuese distinto. Aunado a lo anterior, se debe considerar si se usó un gradiente diferente así como el tiempo de corrida, factores que con pequeñas variaciones pueden generar resultados diversos.

En efecto, este tipo de investigaciones buscan proveer valiosa información para subsiguientes estrategias de enriquecimiento que a futuro puedan utilizar blancos específicos con la finalidad de obtener una preparación más pura del compartimiento deseado y así obtener resultados de una mayor calidad.

Detectar una gran cantidad de proteínas podría llegar a dificultar los análisis y sus respectivas conclusiones, en esta investigación tanto para el grupo CR como AI se filtraron las proteínas conservadas y exclusivas de las BCVs contenedoras de 2308W o *virB10*- (**Figura 7C**). Los resultados que se obtuvieron a partir de las BCVs de *virB10*- fueron utilizados para comparar diferencialmente a las vacuolas contenedoras de 2308W en función de la capacidad del T4SS *VirB* en la secreción de efectores. Esta información fue utilizada para el desarrollo de un modelo conceptual que permite visualizar cómo *B. abortus* 2308W altera la composición proteica de las BCVs y el destino de estas estructuras según la cepa (**Figura 13**).

En términos generales, se observó una menor presencia de proteínas totales y exclusivas en las muestras de 2308W comparado con las *virB10*- para ambos grupos, tal como se muestra en la **figura 7** y se ejemplifica en la **figura 13**. Esto sugiere que la bacteria silvestre podría estar impidiendo el reclutamiento temprano de proteínas a la BCV, lo que permite que la bacteria pase relativamente desapercibida en esta etapa del tránsito intracelular sin inducir una respuesta por parte de la célula hospedera, contrario a lo que sucedería en el caso de la mutante *virB10*- en cuyo caso las BCVs se caracterizarían por ser compartimentos degradativos y oxidativos (Monge, 2019).

Profundizando en los resultados, se determinó el número de proteínas comunes entre las 3 réplicas realizadas por cepa y a nivel de los grupos CR y AI (**figura 8**). Para el primero, el porcentaje de proteínas en común, a nivel intragrupal para cada cepa, respecto al total de proteínas determinadas corresponde a un valor menor en comparación con los datos obtenidos con el grupo AI (**figura 9**); obteniéndose una reproducibilidad 2 veces mayor en el segundo experimento. Una de las posibilidades que puede explicar estos hallazgos recae en el cultivo celular, dado que el entorno físico de las células se ve influenciado por diversos factores a lo largo del procedimiento realizado, situaciones como una confluencia excesiva

pueden afectar la reproducibilidad del ensayo; así como el número de pasajes del cultivo y el número inicial de células utilizadas para hacer los subcultivos (Baker, 2016).

Para las siguientes comparaciones, se decidió determinar como proteínas validadas aquellas que se encontraran como mínimo en 2 de las 3 réplicas realizadas, tal y como se describe en el capítulo de la metodología (**figura 7B**). Tomando como base lo anteriormente dicho, se procedió a comparar las proteínas validadas entre cepas, la **figura 10** muestra el número de proteínas en común y exclusivas según la cepa y para cada grupo experimental. Resulta interesante destacar que el número de proteínas en común es mayor al de las exclusivas, lo anterior para ambos experimentos. Con esta información se compararon las proteínas en común entre cepas del experimento CR contra el mismo grupo de proteínas del experimento A1. Como muestra la **figura 11A**, a pesar de que en el experimento CR se determinaran una menor cantidad de proteínas, las que se encontraban en común entre las cepas están incluidas dentro de las proteínas determinadas como comunes en el experimento A1, con la excepción de 2.

Lo anterior indica que pesar de las diferencias en los ensayos, se obtuvieron resultados esperados en relación con las proteínas en común a nivel de las cepas en ambos experimentos, considerando las diferencias antes mencionadas, validando así la metodología empleada y los análisis. Para complementar esta investigación, se procedió a aclarar la interrogante que consistía en comparar las proteínas validadas y en común, entre las cepas del experimento A1 contra las proteínas que se encontraban presentes en al menos 1 de las 3 réplicas del experimento CR y que de igual manera eran compartidas entre las cepas (**figura 11B**).

En esta misma línea, lo que se comprobó fue que primero, el número de proteínas en común en el experimento CR se incrementaría y segundo que al utilizar estas en el análisis comparativo contra las del experimento A1 en la situación recién mencionada, aumentaría el número de las proteínas comunes que se comparten entre ambos grupos. Lo expuesto previamente consistió en un hallazgo esperado, el principal objetivo radicaba en determinar si el aumento era un cambio trascendental; no obstante, no se consideró de esta forma, por ende, los posteriores análisis se mantuvieron utilizando las proteínas validadas para mantener la robustez de la investigación con base en los hallazgos de un ensayo previo (Monge, 2019). Por otro lado, como se observa en la **figura 12**, también se compararon el número de

proteínas exclusivas entre las cepas y a nivel de cada experimento realizado; es evidente que no hubo una similitud entre dicho grupo de proteínas al comparar las respectivas entre los grupos Al y CR.

En un estudio se encontraron 56 proteínas conservadas entre vacuolas contenedoras de *Legionella* spp., *Salmonella* spp., *Simkania* spp., *Chlamydia* spp. y *Mycobacterium* spp.; 35 de esas proteínas fueron identificadas en esta investigación; el valor anterior se desglosa de la siguiente manera: 26 proteínas correspondientes al grupo de conservadas a nivel de cepas, únicamente para el experimento Al y 7 pertenecientes al grupo de conservadas entre cepas tanto para el experimento Al y CR. Además, 2 exclusivas de la cepa *virB10*⁻ (1 para el grupo CR y otra para el grupo Al). Este hallazgo comprueba que las proteínas detectadas en BCVs también se han encontrado en otros estudios, lo que valida nuestros resultados (Herweg et al., 2015).

Se identificó en 2 de 3 réplicas del grupo Al la proteína procariota EF-Tu como exclusiva de las BCVs de 2308W; esta proteína facilita la unión de los ARN de transferencia cargados en el sitio A de los ribosomas durante la síntesis de proteínas, dependiendo de la presencia de ATP (Prezioso et al., 2017). Del mismo modo, en una investigación anterior se identificó la proteína bacteriana GroEL como exclusiva de las BCVs de la cepa 2308W (Monge, 2019); en el análisis realizado en este proyecto también se logró identificar la proteína en la misma cepa.

GroEL es una proteína que se encuentra en el citoplasma y es responsable de facilitar el correcto plegamiento de los polipéptidos a través de la hidrólisis de ATP. Esta proteína es ampliamente conservada en células procariotas y eucariotas (Hayer-Hartl et al., 2016). Cuando las bacterias son fagocitadas por una célula hospedera, se encuentran en un ambiente estresante debido a la acidificación fagosomal, la explosión oxidativa y la fusión del fagosoma con el lisosoma (**figura 13**). Como respuesta, se produce una expresión elevada de proteínas de choque térmico, incluyendo a GroEL, que ayuda a contrarrestar el ambiente hostil y facilitar la patogénesis (Neckers & Tatu, 2008).

Como perspectiva futura estas proteínas podrían ser candidatos para la generación de mutantes y su evaluación de tráfico intracelular en modelos de cultivo celular con el fin de evidenciar si son posibles blancos para terapias dirigidas a afectar el tránsito y la replicación

intracelular de *B. abortus*. Además, en el futuro, sería útil llevar a cabo enfoques complementarios para analizar los cambios en la abundancia relativa de las proteínas que se han identificado. Hay técnicas de marcado que permiten cuantificar de manera más precisa los péptidos en muestras biológicas complejas, como el marcaje isobárico para una cuantificación absoluta y relativa (iTRAQ) (Treumann & Thiede, 2010). En esta misma línea, este tipo de investigaciones como la recién comentada, permiten sentar bases para futuros experimentos que utilicen bacterias con un mecanismo patogénico similar a *B. abortus* y cuya vía de tránsito intracelular sea similar.

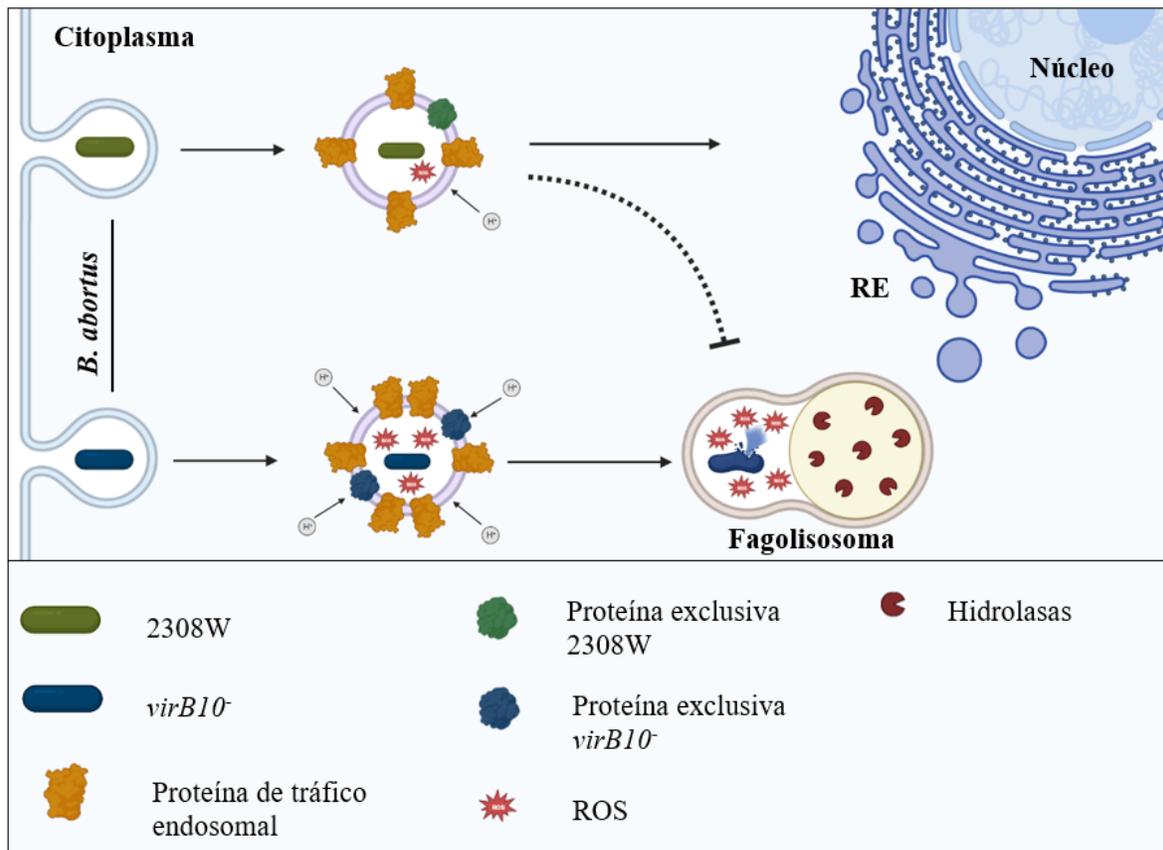


Figura 13. Representación esquemática de las BCVs obtenidas a las 4-6 horas después de la infección de macrófagos RAW 264.7 con *B. abortus* 2308W y *virB10*⁻.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

En conclusión, la vida intracelular de *Brucella* spp. ha sido ampliamente estudiada lo que ha permitido definir parte de los mecanismos de invasión, interacciones con la célula hospedera, las modificaciones que la bacteria ejerce sobre esta para permitir su replicación intracelular y los cambios en la proteómica que facilitan la infección por esta bacteria a nivel de la célula infectada. No obstante, aún no se conocía con completa claridad la proteómica de las BCVs, parte fundamental de la patogénesis.

Se ratificó la eficiencia de un protocolo para el aislamiento y purificación de las BCVs, el cual permitió corroborar que las BCVs de la cepa de *B. abortus virB10⁻* se caracterizan por ser compartimentos degradativos y oxidativos, semejantes a los compartimentos endolisosomales dirigidos a la destrucción bacteriana, además de presentar mayor cantidad de proteínas implicadas en tráfico intracelular.

A pesar de que existen diferencias en el número de proteínas totales encontradas en los análisis HPLC-MS/MS entre los experimentos CR y AI, esto podría deberse a pequeñas variaciones en la metodología utilizada y no necesariamente a la cantidad de material celular eucariota disponible para la infección, lo que sugiere la necesidad de seguir investigando y mejorando las técnicas de enriquecimiento de los compartimentos intracelulares para futuras estrategias de estudio. Sin embargo, se debe considerar que la plataforma utilizada en el experimento CR logró identificar menos proteínas comparando contra la utilizada en Alemania, por ende, se debe plantear en la optimización de las corridas y la mejora de los parámetros que se utilizaron en el experimento hecho en CR para aumentar la eficiencia en la identificación proteica de las BCVs.

No obstante, los análisis comparativos arrojaron buenos resultados en relación con el grupo de proteínas conservadas a nivel de cepa y entre los experimentos CR y AI; asimismo, los resultados obtenidos fueron validados con hallazgos reportados en la literatura en cuanto a microorganismos que poseen una ruta intracelular similar a la protagonista de este trabajo.

Para finalizar, el presente trabajo cumplió los objetivos planteados, de manera general, se espera que los resultados obtenidos en este estudio sirvan de base para futuras

investigaciones y para la formulación de nuevas interrogantes e hipótesis por comprobar en relación con el mecanismo patogénico y caracterización proteómica de los compartimientos intracelulares que utiliza *Brucella abortus* y otras bacterias intracelulares; lo anterior con la finalidad de comprender mejor este tipo de microorganismos y a futuro dar paso al desarrollo de estrategias terapéuticas que permitan limitar la transmisión e impactar negativamente en la prevalencia de la brucelosis en las zonas más afectadas.

CAPÍTULO 7

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2015). *Molecular Biology of The Cell* (6.^aed.). Garland Science. <https://doi.org/10.3390/ijms161226074>
- Altamirano-Silva, P., Meza-Torres, J., Castillo-Zeledón, A., Ruiz-Villalobos, N., Zuñiga-Pereira, A. M., Chacón-Díaz, C., Moreno, E., Guzmán-Verri, C. & Chaves-Olarte, E. (2018). *Brucella abortus* senses the intracellular environment through the BvrR/BvrS two-component system, which allows *B. abortus* to adapt to its replicative niche. *Infection and Immunity*, 86(4). <https://doi.org/10.1128/IAI.00713-17>
- Avila-Calderón, E. D., Lopez-Merino, A., Jain, N., Peralta, H., López-Villegas, E. O., Sriranganathan, N., Boyle, S. M., Witonsky, S. & Contreras-Rodríguez, A. (2012). Characterization of outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* and protection induced in mice. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 352493. <https://doi.org/10.1155/2012/352493>
- Baker, M. (2016). *Reproducibility: Respect your cells!* *Nature*, 537(7620), 433–435. doi:10.1038/537433a
- Baron, C., & Coombes, B. (2007). *Targeting Bacterial Secretion Systems: Benefits of Disarmament in the Microcosm.* *Infectious Disorders - Drug Targets*, 7(1), 19–27. doi:10.2174/187152607780090685
- Barquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., Weiss, D. S., Guzman-Verri, C., Chacón-Díaz, C., Rucavado, A., Moriyón, I & Moreno, E. (2007). *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PloS one*, 2(7), e631. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000631>
- Billard, E., Dornand, J., & Gross, A. (2007). *Brucella suis* Prevents Human Dendritic Cell Maturation and Antigen Presentation through Regulation of Tumor Necrosis Factor Alpha Secretion. *Infection and Immunity*, 75(10), 4980–4989. doi:10.1128/iai.00637-07

- Bonifacino, J. S. & Glick, B. S. (2004). *The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion*. *Cell*, 116(2), 153–166. doi:10.1016/s0092-8674(03)01079-1
- Celli J. (2015). The changing nature of the Brucella-containing vacuole. *Cellular microbiology*, 17(7), 951–958. <https://doi.org/10.1111/cmi.12452>
- Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D. M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., & Gorvel, J. P. (2003). Brucella evades macrophage killing via *VirB*-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *The Journal of experimental medicine*, 198(4), 545-556
- Centers for Food Safety and Public Health (CFSPH). (2021). Brucellosis. Recuperado de <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis.pdf>
- Chaves-Olarte, E., Guzmán-Verri, C., Méresse, S., Desjardins, M., Pizarro-Cerdá, J., Badilla, J., Gorvel, J. P. & Moreno, E. (2002). Activation of Rho and Rab GTPases dissociates *Brucella abortus* internalization from intracellular trafficking. *Cellular Microbiology*, 4(10), 663-676. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00221.x>
- Chaves-Olarte E, Altamirano-Silva P, Guzmán-Verri C & Moreno E. (2014). Purification of Intracellular Bacteria: Isolation of Viable *Brucella abortus* from Host Cells. En A. N. Vergunst & D. O'Callaghan (eds.) *Host-Bacteria Interactions: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (pp. 245-260). Springer.
- Dean, A. S., Crump, L., Greter, H., Schelling, E., & Zinsstag, J. (2012). *Global Burden of Human Brucellosis: A Systematic Review of Disease Frequency*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(10), e1865. doi: 10.1371/journal.pntd.0001865
- De Barse, M., Jamet, A., Filopon, D., Nicolas, C., Laloux, G., Rual, J. F., ... & De Bolle, X. (2011). Identification of a Brucella spp. secreted effector specifically interacting with human small GTPase Rab2. *Cellular microbiology*, 13(7), 1044-1058.
- Den Hartigh, A. B., Rolan, H. G., de Jong, M. F., & Tsolis, R. M. (2008). *VirB3 to VirB6 and VirB8 to VirB11, but Not VirB7, Are Essential for Mediating Persistence of Brucella in the Reticuloendothelial System*. *Journal of Bacteriology*, 190(13), 4427–4436. doi:10.1128/jb.00406-08

- De Jong, M. F., Starr, T., Winter, M. G., den Hartigh, A. B., Child, R., Knodler, L. A., ... & Tsolis, R. M. (2013). Sensing of bacterial type IV secretion via the unfolded protein response. *MBio*, *4*(1), e00418-12.
- De Jong M. F., Sun Y. H., Den Hartigh A. B., Van Dijl J. M., Tsolis R. M. (2008). Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the Brucella type IV secretion system. *Mol Microbiol* *70*:1378–1396. 50.
- Desjardins, M., Huber, L. A., Parton, R. G. & Griffiths, G. (1994). Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *Journal of Cell Biology*, *124*(5), 677–688. <https://doi.org/10.1083/jcb.124.5.677>
- Dornand, J., Gross, A., Lafont, V., Liautard, J., Oliaro, J. & Liautard, J. P. (2002). The innate immune response against *Brucella* in humans. *Veterinary Microbiology*, *90*(1-4), 383-394. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00223-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00223-7)
- Ducrotoy, M. J., Bertu, W. J., Ocholi, R. A., Gusi, A. M., Bryssinckx, W., Welburn, S., & Moriyón, I. (2014). *Brucellosis as an Emerging Threat in Developing Economies: Lessons from Nigeria*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *8*(7), e3008. doi: 10.1371/journal.pntd.0003008
- Eskra, L., Mathison, A., & Splitter, G. (2003). Microarray analysis of mRNA levels from RAW264.7 macrophages infected with *Brucella abortus*. *Infection and Immunity*, *71*(3), 1125-1133. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.3.1125-1133.2003>
- Ferrero, M. C., Alonso, I. M., González, F. M., & Baldi, P. C. (2020). Pathogenesis and immune response in *Brucella* infection acquired by the respiratory route. *Microbes and Infection*, *22*(9), 407-415. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2020.06.001>
- Franco, M. P., Mulder, M., Gilman, R. H., & Smits, H. L. (2007). *Human brucellosis*. *The Lancet Infectious Diseases*, *7*(12), 775–786. doi:10.1016/s1473-3099(07)70286-4
- Fu, Y., Wang, Z., Lu, B., Zhao, S., Zhang, Y., Zhao, Z., Zhang, C., Li, J., Zhou, B., Guo, Z., Qian, J. & Liu, L. (2018). Immune response and differentially expressed proteins in the lung tissue of BALB/c mice challenged by aerosolized *Brucella melitensis* 5. *Journal of International Medical Research*, *46*(11), 4740-4752. <https://doi.org/10.1177/0300060518799879>

- Fugier, E., Salcedo, S.P., De Chastellier, C., Pophillat, M., Muller, A., Arce-Gorvel, V., Fourquet, P. & Gorvel, J. P. (2009). The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and the small GTPase rab 2 are crucial for *Brucella* replication. *PLoS Pathogens*, 5(6), e1000487. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000487>
- Geffken AC, Patin EC, Schaible UE. 2015. Isolation of bead phagosomes to study virulence function of M. Tuberculosis cell wall lipids. *Methods Mol Biol*.
- Godfroid, J., Scholz, H. C., Barbier, T., Nicolas, C., Wattiau, P., Fretin, D., ... Letesson, J.-J. (2011). *Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century*. *Preventive Veterinary Medicine*, 102(2), 118–131. doi: 10.1016/j.prevetmed.2011.04.007
- González-Espinoza, G., Arce-Gorvel, V., Mémet, S., & Gorvel, J.-P. (2021). *Brucella: Reservoirs and Niches in Animals and Humans*. *Pathogens*, 10(2), 186. doi:10.3390/pathogens10020186
- Gorvel, J., & Moreno, E. (2002). *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Veterinary Microbiology*, 90(1-4), 281–297. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00214-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00214-6)
- Guzmán-Verri, C., Chaves-Olarte, E., von Eichel-Streiber, C., López-Goñi, I., Thelestam, M., Arvidson, S., Gorvel, J. P. & Moreno, E. (2001). GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in nonprofessional phagocytes: direct activation of Cdc42. *Journal of Biological Chemistry*, 276(48), 44435-44443. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105606200>
- Guzmán-Verri, C., González-Barrientos, R., Hernández-Mora, G., Morales, J.-A., Baquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., & Moreno, E. (2012). *Brucella ceti* and *Brucellosis* in *Cetaceans*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2. doi:10.3389/fcimb.2012.00003
- Hayer-Hartl M, Bracher A, Hartl FU. 2016. The GroEL-GroES Chaperonin Machine: A Nano-Cage for Protein Folding. *Trends Biochem Sci* 41:62–76.

- Hernández, G., Bonilla, R., Barrantes, O., Esquivel, A., Montero, D., González, R., Fallas-Monge, Z., Palacios-Alfaro, J. D., Baldi, M., Campos, E., Chanto, G., Barquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., Guzmán, C., Romero-Zúñiga, J. J. & Moreno, E. (2017). Brucellosis in mammals of Costa Rica: an epidemiological survey. *PLoS One*, 12(8), e0182644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182644>
- Hernández, G., Ruiz, N., Bonilla, R., Romero, J. J., Jiménez, J., González-Barrientos, R., Barquero-Calvo, E., Chacón-Díaz, C., Rojas, N., Chaves-Olarte, G., Gúzman-Verri, C. & Moreno, E. (2017). Epidemiology of bovine brucellosis in Costa Rica: Lessons learned from failures in the control of the disease. *PloS one*, 12(8), e0182380. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182380>
- Herweg J-A, Hansmeier N, Otto A, Geffken AC, Subbarayal P, Prusty BK, Becher D, Hensel M, Schaible UE, Rudel T, Hilbi H. 2015. Purification and proteomics of pathogen-modified vacuoles and membranes. *Front Cell Infect Microbiol* 5.
- Hielpos, M. S., Ferrero, M. C., Fernández, A. G., Falivene, J., Vanzulli, S., Comerci, D. J., & Baldi, P. C. (2017). *Btp Proteins from Brucella abortus Modulate the Lung Innate Immune Response to Infection by the Respiratory Route. Frontiers in Immunology*, 8. doi:10.3389/fimmu.2017.01011
- Hoffmann C, Finsel I, Otto A, Pfaffinger G, Rothmeier E, Hecker M, Becher D, Hilbi H. 2014. Functional analysis of novel Rab GTPases identified in the proteome of purified Legionella-containing vacuoles from macrophages. *Cell Microbiol*.
- Huotari, J., & Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *The EMBO Journal*, 30(17), 3481-3500. doi: 10.1038/emboj.2011.286
- Jakka, P., Namani, S., Murugan, S., Rai, N., & Radhakrishnan, G. (2017). The Brucella effector protein TcpB induces degradation of inflammatory caspases and thereby subverts non-canonical inflammasome activation in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 292(50), 20613-20627.

- Jones, L. M., Montgomery, V. & Wilson, J.B. (1965). Characteristics of Carbon Dioxide-Independent Cultures of *Brucella abortus* Isolated from Cattle Vaccinated with Strain 19. *The Journal of Infectious Diseases*, 115(3), 312–320. <https://doi.org/10.1093/infdis/115.3.312>
- Kahl-McDonagh, M. M., & Ficht, T. A. (2006). Evaluation of Protection Afforded by *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* Unmarked Deletion Mutants Exhibiting Different Rates of Clearance in BALB/c Mice. *Infection and Immunity*, 74(7), 4048–4057. doi:10.1128/iai.01787-05
- Ke, Y., Wang, Y., Li, W., & Chen, Z. (2015). Type IV secretion system of *Brucella* spp. and its effectors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5. doi:10.3389/fcimb.2015.00072
- Lacerda, T., Salcedo, S. & Gorvel, J. (2013). Brucella T4SS: the VIP pass inside host cells. *Current Opinion in Microbiology*, 16(1), 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.11.005>
- Liu, D. (2015). Brucella. En Y. Tang, D. Liu, J. Schwartzman, M. Susana, & I. Poxton (eds.), *Molecular Medical Microbiology* (pp. 1781–1788). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2010-1-67744-9>
- Liu, Y., Zhang, Q., Hu, M., Yu, K., Fu, J., Zhou, F., & Liu, X. (2015). Proteomic Analyses of Intracellular *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Reveal Extensive Bacterial Adaptations to Infected Host Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 83(7), 2897–2906. doi:10.1128/iai.02882-14
- Luini, A., & Parashuraman, S. (2016). Signaling at the Golgi: sensing and controlling the membrane fluxes. *Current Opinion in Cell Biology*, 39, 37–42. doi:10.1016/j.ceb.2016.01.014
- Martínez-Núñez, C., Altamirano-Silva, P., Alvarado-Guillén, F., Moreno, E., Guzmán-Verri, C., & Chaves-Olarte, E. (2010). The two-component system BvrR/BvrS regulates the expression of the type IV secretion system *VirB* in *Brucella abortus*. *Journal of Bacteriology*, 192(21), 5603-5608. <https://doi.org/10.1128/JB.00567-10>

- Méndez, M., Rodríguez, E. J., & Sánchez, L. M. (2015). Brucellosis, una zoonosis presente en la población: estudio de series de tiempo en México. *Salud pública de México*, 57(6), 519-527. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0036-36342015000600010&script=sci_abstract
- Miller, C. N., Smith, E. P., Cundiff, J. A., Knodler, L. A., Blackburn, J. B., Lupashin, V., & Celli, J. (2017). A Brucella type IV effector targets the COG tethering complex to remodel host secretory traffic and promote intracellular replication. *Cell host & microbe*, 22(3), 317-329.
- Mills SD, Brett Finlay B. 1998. Isolation and characterization of Salmonella typhimurium and Yersinia pseudotuberculosis-containing phagosomes from infected mouse macrophages: Y. pseudotuberculosis traffics to terminal lysosomes where they are degraded. *Eur J Cell Biol* 77:35–47
- Monge, H. (2019). Modificaciones proteicas inducidas por *Brucella abortus* 2308W en compartimientos intracelulares tempranos de macrófagos Raw 264.7. [Tesis de Maestría no publicada]. Universidad de Costa Rica.
- Moreno, E. (2014). *Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis*. *Frontiers in Microbiology*, 5. doi:10.3389/fmicb.2014.00213
- Murugaiyan, J., Eravci, M., Weise, C., Roesler, U., Sprague, L. D., Neubauer, H. & Wareth, G. (2020). Pan-Proteomic Analysis and Elucidation of Protein Abundance among the Closely Related *Brucella* Species, *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Biomolecules*, 10(6), 836. <https://doi.org/10.3390/biom10060836>
- Myeni, S., Child, R., Ng, T. W., Kupko III, J. J., Wehrly, T. D., Porcella, S. F., ... & Celli, J. (2013). Brucella modulates secretory trafficking via multiple type IV secretion effector proteins. *PLoS pathogens*, 9(8), e1003556.
- Neckers L, Tatu U. 2008. Molecular Chaperones in Pathogen Virulence: Emerging New Targets for Therapy. *Cell Host Microbe* 4:519–527
- Rivas, O. (2015). Brucella abortus: patogénesis y regulación génica de la virulencia. *Revista Tecnología en Marcha*, 28(2), 61-73. <https://doi.org/10.18845/tm.v28i2.2334>

- Rivas-Solano, O., Van der Henst, M., Castillo-Zeledón, A., Suárez-Esquivel, M., Muñoz-Vargas, L., Capitan-Barrios, Z., ... & Guzmán-Verri, C. (2022). The regulon of *Brucella abortus* two-component system BvrR/BvrS reveals the coordination of metabolic pathways required for intracellular life. *Plos one*, *17*(9), e0274397
- Ruiz-Palma, M. S., Avila-Calderón, E. D., Aguilera-Arreola, M. G., López-Merino, A., Ruiz, E. A., del Rosario Morales-García, M., López-Villegas, E. O., Gomez-Lunar, Z., Arellano-Reynoso, B. & Contreras-Rodríguez, A. (2021). Comparative proteomic analysis of outer membrane vesicles from *Brucella suis*, *Brucella ovis*, *Brucella canis* and *Brucella neotomae*. *Archives of Microbiology*, *203*(4), 1611-1626. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02170-w>
- Pan American Health Organization (PAHO). (2021). Brucellosis. Retrieved from <https://www.paho.org/es/temas/brucelosis>
- Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., & Tsianos, E. V. (2006). The new global map of human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases*, *6*(2), 91-99. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70382-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70382-6)
- Paredes-Cervantes, V., Flores-Mejía, R., Moreno-Lafont, M. C., Lanz-Mendoza, H., Tello-López, Á. T., Castillo-Vera, J., Pando-Robles, V., Hurtado-Sil, G., González-González, E., Rodríguez-Cortés, O., Gutiérrez-Hoya, A., Vega-Ramírez, M- T- & López-Santiago, R. (2011). Comparative proteome analysis of *Brucella abortus* 2308 and its *virB* type IV secretion system mutant reveals new T4SS-related candidate proteins. *Journal of proteomics*, *74*(12), 2959-2971. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.07.020>
- Park, S., Choi, Y. S., Park, S. H., Kim, Y. R., Chu, H., Hwang, K. J., & Park, M. Y. (2013). Lon mutant of *Brucella abortus* induces tumor necrosis factor-alpha in murine J774. A1 macrophage. *Osong Public Health and Research Perspectives*, *4*(6), 301-307. <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2013.10.002>
- Paschos, A., den Hartigh, A., Smith, M. A., Atluri, V. L., Sivanesan, D., Tsolis, R. M., & Baron, C. (2010). An *In Vivo* High-Throughput Screening Approach Targeting the Type IV Secretion System Component *VirB8* Identified Inhibitors of *Brucella abortus* 2308 Proliferation. *Infection and Immunity*, *79*(3), 1033–1043. doi:10.1128/iai.00993-10

- Pathak, P., Kumar, A., Sarangi, P. P., Bhagyawant, S., & Thavaselvam, D. (2018). *Cloning, expression, and purification of virB10 protein of Brucella melitensis and evaluation of its role as a serological marker for Brucella infection in experimental and natural host. Protein Expression and Purification, 145*, 53–58. doi: 10.1016/j.pep.2017.12.014
- Poetsch, A. & Marchesini, M. I. (2020). *Proteomics of Brucella, Proteomes, 8*(2), 8 <https://doi.org/10.3390/proteomes8020008>
- Prezioso SM, Brown NE, Goldberg JB. 2017. Elfamycins: inhibitors of elongation factor-Tu. *Mol Microbiol* 106:22–34.
- Salcedo SP, Marchesini MI, Degos C, Terwagne M, Von Bargen K, Lepidi H, Herrmann CK, Santos Lacerda TL, Imbert PRC, Pierre P, Alexopoulou L, Letesson J-J, Comerci DJ, Gorvel J-P. (2013). BtpB, a novel Brucella TIRcontaining effector protein with immune modulatory functions. *Front Cell Infect Microbiol* 3:1–13.
- Shevchuk, O., Batzilla, C., Hägele, S., Kusch, H., Engelmann, S., Hecker, M., ... Steinert, M. (2009). Proteomic analysis of Legionella-containing phagosomes isolated from Dictyostelium. *International Journal of Medical Microbiology, 299*(7), 489–508. doi: 10.1016/j.ijmm.2009.03.006
- Sieira, R., Comerci, D. J., Sanchez, D. O. & Ugalde, R.A. (2000). A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *Journal of Bacteriology, 182*, 4849– 4855. <https://doi.org/10.1128/JB.182.17.4849-4855.2000>
- Smith, J. A., Khan, M., Magnani, D. D., Harms, J. S., Durward, M., Radhakrishnan, G. K., ... & Splitter, G. A. (2013). Brucella induces an unfolded protein response via TcpB that supports intracellular replication in macrophages. *PLoS pathogens, 9*(12), e1003785.
- Thermo Scientific. (2015). *Pierce Detergent Removal Spin Column. https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011676_Pierce_Detergent_Remov_SpinColumn_UG.pdf?_ga=2.212870551.2080591500.1674005393-767102395.1674005393*

- Treumann A, Thiede B. 2010. Isobaric protein and peptide quantification: Perspectives and issues. *Expert Rev Proteomics* 7:647–653.
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M. Y., Geiger, T., ... & Cox, J. (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote) omics data. *Nature methods*, 13(9), 731-740.
- Uzureau, S., Lemaire, J., Delaive, E., Dieu, M., Gaigneaux, A., Raes, M., ... Letesson, J.-J. (2010). *Global Analysis of Quorum Sensing Targets in the Intracellular Pathogen Brucella melitensis* 16 M. *Journal of Proteome Research*, 9(6), 3200–3217. doi:10.1021/pr100068p
- Vorwerk S, Krieger V, Deiwick J, Hensel M, Hansmeier N. 2015. Proteomes of host cell membranes modified by intracellular activities of Salmonella enterica. *Mol Cell Proteomics*.
- Wang, Y., Chen, Z., Qiao, F., Ying, T., Yuan, J., Zhong, Z., Zhou, L., Du, X., Wang, Z., Zhao, J., Dong, S., Jia, L., Yuan, X., Yang, R., Sun, Y. & Huang, L. (2009). Comparative Proteomics Analyses Reveal the vir B of *B. melitensis* Affects Expression of Intracellular Survival Related Proteins. *PLoS One*, 4(4), e5368. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005368>
- Whatmore, A. M. (2009). *Current understanding of the genetic diversity of Brucella, an expanding genus of zoonotic pathogens. Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1168–1184. doi: 10.1016/j.meegid.2009.07.001
- Xavier, M. N., Paixao, T. A., den Hartigh, A. B., Tsolis, R. M., & Santos, R. L. (2010). Pathogenesis of *Brucella* spp. *The Open Veterinary Science Journal*, 4(1), 109-118. [10.2174/1874318801004010109](https://doi.org/10.2174/1874318801004010109)
- Xiong, X., Li, B., Zhou, Z., Gu, G., Li, M., Liu, J., & Jiao, H. (2021). The VirB system plays a crucial role in *Brucella* intracellular infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13637.
- Yan, X., Hu, S., Yang, Y., Xu, D., Liu, W., Li, G., Cai, W. & Bu, Z. (2021). Proteomics investigation of the time course responses of RAW264.7 macrophages to infections with the wild-type and twin-arginine translocation mutant strains of *Brucella melitensis*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.679571>

Young, E. J. (2018). *Brucella* Species (Brucellosis). En S. Long, C. Prober & M. Fischer (eds.), *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases* (5.^aed., pp. 886–889). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/C2013-0-19020-4>

ANEXOS

Anexo A1. Lista de proteínas determinadas como exclusivas en 2/3 réplicas de las BCVs de *Brucella abortus* 2308W.

Accession Number	Nombre de la proteína	Proceso biológico	Función molecular	Compartimiento celular	KEGG
D3Z7P3	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Vesícula intracelular	Metabolismo de aminoácidos
O08547	Vesicle-trafficcking protein SEC22b	Procesos celulares	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	Fagosoma
O35129	Prohibitin-2	Procesos celulares	ND	Vesícula intracelular	ND
O35857	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44	Procesos celulares	Transportador transmembrana	Vesícula intracelular	ND
O54734	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Vesícula intracelular	Metabolismo de carbohidratos
O55128	Histone deacetylase complex subunit SAP18	Procesamiento de información genética	ND	Vesícula intracelular	Transporte de ARN
O55143	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	Procesos celulares	Transportador transmembrana	Citoesqueleto y uniones celulares	Señalización y procesos celulares
O88384	Vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1B	Procesos celulares	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	ND
P10126	Elongation factor 1-alpha 1	Procesamiento de información del entorno	Proteínas de unión	Citoesqueleto y uniones celulares	Transporte de ARN
P10810	Monocyte differentiation antigen CD14	Procesos celulares	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	Señalización y procesos celulares
P23780	Beta-galactosidase	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Vesícula intracelular	Metabolismo de carbohidratos
P24270	Catalase	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Citoesqueleto y uniones celulares	Metabolismo de aminoácidos
P26443	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	Procesos metabólicos	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	Metabolismo de aminoácidos

P31230	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1	Procesamiento de información genética	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	ND
P31996	Macrosialin	Procesos celulares	ND	Vesícula intracelular	Lisosoma
P37040	NADPH--cytochrome P450 reductase	Procesos metabólicos	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	ND
P46664	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	Procesos metabólicos	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	Metabolismo de aminoácidos
P50516	V-type proton ATPase catalytic subunit A	Procesos metabólicos	Transportador transmembrana	Vesícula intracelular	Señalización y procesos celulares
P50544	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Vesícula intracelular	Metabolismo de lípidos
P51569	Alpha-galactosidase A	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Vesícula intracelular	ND
P51660	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Vesícula intracelular	Peroxisoma
P51863	V-type proton ATPase subunit d 1	Procesos celulares	Transportador transmembrana	Vesícula intracelular	Lisosoma
P57776	Elongation factor 1-delta	Procesamiento de información genética	Procesamiento de información genética	Vesícula intracelular	ND
P60766	Cell division control protein 42 homolog	Procesos celulares	Proteínas de unión	Citoesqueleto y uniones celulares	Señalización y procesos celulares
P61027	Ras-related protein Rab-10	Procesos celulares	Proteínas de unión	Citoesqueleto y uniones celulares	ND
P62849	40S ribosomal protein S24	Procesos celulares	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	Ribosoma
P67778	Prohibitin	Procesos celulares	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	ND
P70404	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma 1, mitochondrial	Procesos metabólicos	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	Metabolismo energético
P85094	Isochorismatase domain-containing protein 2A, mitochondrial	Procesamiento de información genética	Actividad enzimática	Vesícula intracelular	ND

P97493	Thioredoxin, mitochondrial	Procesos celulares	Actividad enzimática	Vesícula intracelular	ND
Q3U7R1	Extended synaptotagmin-1	Señalización y transporte celular	Proteínas de unión	Retículo endoplásmico	ND
Q571E4	N-acetylgalactosamine-6-sulfatase	ND	Actividad enzimática	Vesícula intracelular	Metabolismo de carbohidratos
Q62393	Tumor protein D52	Procesos celulares	Proteínas de unión	Retículo endoplásmico	ND
Q7TPV4	Myb-binding protein 1A	Procesos celulares	Procesamiento de información genética	Vesícula intracelular	ND
Q80ZW2	Protein THEM6	ND	ND	Región extracelular	ND
Q8BFR5	Elongation factor Tu, mitochondrial	Procesos celulares	Actividad enzimática	Vesícula intracelular	Señalización y procesos celulares
Q8BH86	UPF0317 protein C14orf159 homolog, mitochondrial	ND	ND	Vesícula intracelular	ND
Q8BLF1	Neutral cholesterol ester hydrolase 1	Procesos metabólicos	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	ND
Q8BLN5	Lanosterol synthase	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Retículo endoplásmico	Metabolismo de lípidos
Q8BSY0	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	Señalización y transporte celular	Proteínas de unión	Retículo endoplásmico	ND
Q8CAQ8	MICOS complex subunit Mic60	Señalización y transporte celular	ND	Vesícula intracelular	ND
Q8JZU0	Nucleoside diphosphate-linked moiety X motif 13	ND	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	ND
Q8K0D5	Elongation factor G, mitochondrial	Procesos celulares	Actividad enzimática	Vesícula intracelular	ND
Q8VCL2	Protein SCO2 homolog, mitochondrial	Señalización y transporte celular	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	ND

Q8VDN2	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	Señalización y transporte celular	Transportador transmembrana	Vesícula intracelular	Metabolismo de carbohidratos
Q8VEM8	Phosphate carrier protein, mitochondrial	ND	Transportador transmembrana	Vesícula intracelular	ND
Q91VC3	Eukaryotic initiation factor 4A-III	Procesos celulares	Procesamiento de información genética	Espliceosoma	Transporte de ARN
Q91YW3	DnaJ homolog subfamily C member 3	Señalización y transporte celular	Proteínas de unión	Retículo endoplásmico	Señalización y procesos celulares
Q922Q4	Pyrroline-5-carboxylate reductase 2	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Vesícula intracelular	Metabolismo de aminoácidos
Q922Q9	Chitinase domain-containing protein 1	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Región extracelular	ND
Q99P88	Nuclear pore complex protein Nup155	Señalización y transporte celular	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	Transporte de ARN
Q99P91	Transmembrane glycoprotein NMB	Señalización y transporte celular	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	ND
Q9CPY7	Cytosol aminopeptidase	ND	Actividad enzimática	Citoesqueleto y uniones celulares	Metabolismo de carbohidratos
Q9CQH3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 5, mitochondrial	Procesos metabólicos	ND	Vesícula intracelular	Metabolismo energético
Q9CZR8	Elongation factor Ts, mitochondrial	Procesos celulares	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	ND
Q9D172	ES1 protein homolog, mitochondrial	ND	ND	Vesícula intracelular	ND
Q9D2G2	Dihydropyridyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Región extracelular	Metabolismo energético
Q9D6R2	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Vesícula intracelular	Metabolismo energético

Q9DBG7	Signal recognition particle receptor subunit alpha	Señalización y transporte celular	Actividad enzimática	Retículo endoplásmico	Ribosoma
Q9DBR1	5-3 exoribonuclease 2	Procesamiento de información genética	Procesamiento de información genética	Vesícula intracelular	Ribosoma
Q9EQU5	Protein SET	Procesos celulares	Procesamiento de información genética	Retículo endoplásmico	ND
Q9JJF3	Bifunctional lysine-specific demethylase and histidyl-hydroxylase NO66	Procesos metabólicos	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	ND
Q9QXT0	Protein canopy homolog 2	Procesos celulares	ND	Retículo endoplásmico	ND
Q9QYR9	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Región extracelular	Metabolismo de lípidos
Q9R0E1	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Retículo endoplásmico	Metabolismo de aminoácidos
Q9WTP6	Adenylate kinase 2, mitochondrial	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Región extracelular	Metabolismo de purinas
Q9WUM4	Coronin-1C	Señalización y transporte celular	Proteínas de unión	Citoesqueleto y uniones celulares	ND
Q9WVA4	Transgelin-2	Procesos celulares	ND	Región extracelular	ND
Q9Z2G6	Protein sel-1 homolog 1	Señalización y transporte celular	ND	Retículo endoplásmico	Señalización y procesos celulares
Q9Z2I8	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial	Procesos metabólicos	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	Metabolismo energético

ND: No determinado

Anexo A2. Lista de proteínas determinadas como exclusivas en 2/3 réplicas de las BCVs de *Brucella abortus virB10-*.

Accession Number	Nombre de la proteína	Proceso biológico	Función molecular	Compartimiento celular	KEGG
A0A0U1RPR8	ND	ND	ND	ND	ND
C0HKE9	Histone H2A type 1-H	Procesos celulares	Procesamiento de información genética	Núcleo	Otros
O35405	Phospholipase D3	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Retículo endoplásmico	ND
O35855	Branched-chain-amino-acid aminotransferase, mitochondrial	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Vesícula intracelular	Metabolismo de aminoácidos
O54782	Epididymis-specific alpha-mannosidase	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Región extracelular	Metabolismo de carbohidratos
P09528	Ferritin heavy chain	Procesos celulares	Actividad enzimática	Vesícula intracelular	Otros
Q8CGP2	Histone H2B type 1-P	Procesos celulares	Procesamiento de información genética	Región extracelular	Otros
P11438	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	Procesos celulares	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	Lisosoma
P12265	Beta-glucuronidase	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Retículo endoplásmico	Metabolismo de carbohidratos
P14733	Lamin-B1	Procesos celulares	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	ND
P17047	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	Procesamiento de información genética	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	Lisosoma
P17742	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	Procesos celulares	Actividad enzimática	Citoesqueleto y uniones celulares	ND
P21107	Tropomyosin alpha-3 chain	ND	ND	Citoesqueleto y uniones celulares	Otros
P22892	AP-1 complex subunit gamma-1	Procesos celulares	Actividad enzimática	Citoesqueleto y uniones celulares	Lisosoma
P24452	Macrophage-capping protein	Procesos celulares	ND	Región extracelular	ND

P24549	Retinal dehydrogenase 1	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Región extracelular	Metabolismo de aminoácidos
P26350	Prothymosin alpha	Procesos celulares	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	ND
P28798	Granulins	Procesos celulares	ND	Región extracelular	ND
P34884	Macrophage migration inhibitory factor	Procesos celulares	Actividad enzimática	Región extracelular	Metabolismo de aminoácidos
P35550	rRNA 2-O-methyltransferase fibrillar	Procesamiento de información genética	Actividad enzimática	Vesícula intracelular	Ribosoma
P36552	Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, mitochondrial	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Vesícula intracelular	Otros
P40124	Adenylyl cyclase-associated protein 1	Procesos celulares	ND	Citoesqueleto y uniones celulares	ND
P45878	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Retículo endoplásmico	ND
P47962	60S ribosomal protein L5	Procesos celulares	Proteínas de unión	Citoesqueleto y uniones celulares	Ribosoma
P52293	Importin subunit alpha-1	Señalización y transporte celular	Transportador transmembrana	Vesícula intracelular	ND
P53395	Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex, mitochondrial	ND	Actividad enzimática	Vesícula intracelular	Metabolismo de aminoácidos
P55302	Alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein	Procesos celulares	Proteínas de unión	Retículo endoplásmico	ND
P57759	Endoplasmic reticulum resident protein 29	Señalización y transporte celular	ND	Vesícula intracelular	Señalización y procesos celulares
P61358	60S ribosomal protein L27	Procesos celulares	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	Ribosoma
P62082	40S ribosomal protein S7	Procesos celulares	Proteínas de unión	Citoesqueleto y uniones celulares	Ribosoma
P62281	40S ribosomal protein S11	Procesos celulares	Proteínas de unión	Citoesqueleto y uniones celulares	Ribosoma

P62897	Cytochrome c, somatic	Procesos celulares	Proteínas de unión	Citoesqueleto y uniones celulares	Otros
P62918	60S ribosomal protein L8	Procesos metabólicos	Proteínas de unión	Citoesqueleto y uniones celulares	Ribosoma
P63323	40S ribosomal protein S12	Procesos celulares	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	ND
P67984	60S ribosomal protein L22	Procesos celulares	Proteínas de unión	Citoesqueleto y uniones celulares	Ribosoma
P97461	40S ribosomal protein S5	Procesos celulares	Proteínas de unión	Citoesqueleto y uniones celulares	Ribosoma
Q05816	Fatty acid-binding protein, epidermal	Procesos metabólicos	Proteínas de unión	Región extracelular	Señalización y procesos celulares
Q07417	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Vesícula intracelular	Metabolismo de lípidos
Q3UGC7	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J-A	Procesos celulares	Proteínas de unión	Núcleo	Transporte de ARN
Q60668	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	Procesos celulares	Proteínas de unión	Región extracelular	ND
Q60930	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	Procesos celulares	Transportador transmembrana	Región extracelular	Señalización y procesos celulares
Q61937	Nucleophosmin	Procesos celulares	Proteínas de unión	Citoesqueleto y uniones celulares	ND
Q62318	Transcription intermediary factor 1-beta	Procesos celulares	Actividad enzimática	Núcleo	ND
Q64523	Histone H2A type 2-C; Histone H2A type 2-A	Procesos celulares	Proteínas de unión	Región extracelular	Otros
Q6DFW4	Nucleolar protein 58	Procesos celulares	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	Ribosoma
Q6P4T2	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	Procesos celulares	Actividad enzimática	Espliceosoma	Espliceosoma
Q8BFZ3	Beta-actin-like protein 2	ND	Actividad enzimática	Citoesqueleto y uniones celulares	ND

Q8BH04	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Región extracelular	Señalización y procesos celulares
Q8BIJ6	Isoleucine--tRNA ligase, mitochondrial	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Vesícula intracelular	Metabolismo de aminoácidos
Q8CCH2	NHL repeat-containing protein 3	ND	ND	Región extracelular	ND
Q8CGK3	Lon protease homolog, mitochondrial	Procesos celulares	Actividad enzimática	Vesícula intracelular	ND
Q8K297	Procollagen galactosyltransferase 1	ND	Actividad enzimática	Retículo endoplásmico	Metabolismo de aminoácidos
Q8R180	ERO1-like protein alpha	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Retículo endoplásmico	Señalización y procesos celulares
Q91V41	Ras-related protein Rab-14	Señalización y transporte celular	Actividad enzimática	Vesícula intracelular	ND
Q91VM5	RNA binding motif protein, X-linked-like-1	Procesos celulares	Proteínas de unión	Espliceosoma	Espliceosoma
Q922K7	Probable 28S rRNA (cytosine-C(5))-methyltransferase	Procesamiento de información genética	Actividad enzimática	Vesícula intracelular	ND
Q922V4	Pleiotropic regulator 1	Procesos celulares	ND	Espliceosoma	Espliceosoma
Q9CQR4	Acyl-coenzyme A thioesterase 13	Procesos celulares	Actividad enzimática	Región extracelular	ND
Q9CR57	60S ribosomal protein L14	Procesos celulares	Proteínas de unión	Región extracelular	Ribosoma
Q9CX86	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	Procesamiento de información genética	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	ND
Q9D0S9	Histidine triad nucleotide-binding protein 2, mitochondrial	Procesos celulares	Actividad enzimática	Vesícula intracelular	ND
Q9D1H8	39S ribosomal protein L53, mitochondrial	ND	ND	Vesícula intracelular	ND
Q9D1Q6	Endoplasmic reticulum resident protein 44	Procesos celulares	Actividad enzimática	Retículo endoplásmico	ND

Q9DCD0	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Región extracelular	Metabolismo energético
Q9DCL9	Multifunctional protein ADE2	Procesos celulares	Actividad enzimática	Región extracelular	Metabolismo de purinas
Q9DCW4	Electron transfer flavoprotein subunit beta	Procesos metabólicos	Otros	Región extracelular	ND
Q9JHJ3	Glycosylated lysosomal membrane protein	Señalización y transporte celular	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	ND
Q9JIX8	Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus	Procesos celulares	Proteínas de unión	Citoesqueleto y uniones celulares	Transporte de ARN
Q9JLZ6	Hypermethylated in cancer 2 protein	Procesos celulares	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	ND
Q9QX47	Protein SON	Procesos celulares	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	ND
Q9R0E2	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	Procesos celulares	Actividad enzimática	Retículo endoplásmico	Metabolismo de aminoácidos
Q9R0X4	Acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial;Acyl-coenzyme A thioesterase 10, mitochondrial	Procesos metabólicos	Actividad enzimática	Vesícula intracelular	ND
Q9WV32	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	Procesos celulares	Proteínas de unión	Citoesqueleto y uniones celulares	Otros
Q9Z110	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	Procesos metabólicos	Proteínas de unión	Vesícula intracelular	Metabolismo de aminoácidos

ND: No determinado