

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**

**FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA**

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado de Licenciatura en  
Microbiología y Química Clínica**

**Análisis y caracterización del tránsito intracelular de *Brucella canis* en células  
epiteliales HeLa durante diferentes tiempos de infección.**

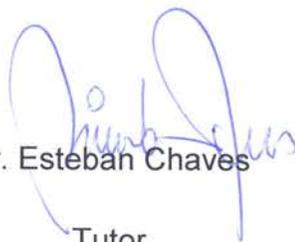
**Melissa Wong Araya**

**A96893**

**Tutor: Esteban Chaves Olarte, Ph.D.**

**Julio, 2015**

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



Dr. Esteban Chaves

Tutor



Dr. Carlos Chacón

Lector



Dra. Pamela Altamirano

Lectora



Dra. Tatiana Murillo

Presidenta del Tribunal



Dra. Gabriela González

Profesora designada

## **Agradecimientos**

Agradezco a Dios, mi creador y mi luz, Él es mi fuerza y el faro que guía mis pasos; a mis padres a quienes amo profundamente, son mi orgullo y un pilar fundamental en mi vida. A mi hermana Yanina y familiares por estar siempre a mi lado. A mi tutor Esteban Chaves, quien además de ser un excelente maestro, es un gran amigo y persona ejemplar, su apoyo y consejos en momentos de dificultad son invaluable. Agradezco a mis amigos, por los consejos, por escucharme y estar conmigo en momentos dulces y amargos.

# Índice

<b>Lista de figuras.....</b>	<b>ii</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>iii</b>
<b>Antecedentes.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Impacto de la brucelosis en el sector salud y ganadero. ....</b>	<b>1</b>
1.1. Brucelosis en animales y humanos.....	2
<b>2. El género <i>Brucella</i>. ....</b>	<b>5</b>
2.1. Generalidades de <i>B. canis</i> .....	7
2.2. Generalidades de <i>B. abortus</i> .....	8
<b>3. Patogénesis: entrada y supervivencia. ....</b>	<b>8</b>
3.1. Factores de virulencia.....	10
<b>4. Tránsito intracelular ....</b>	<b>13</b>
4.1 Culminación del ciclo celular en compartimentos autofágicos. ....	16
<b>Justificación.....</b>	<b>19</b>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>20</b>
<b>Objetivo general.....</b>	<b>20</b>
<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>20</b>
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>21</b>
1. Cepas bacterianas y preparación de inóculos.....	21
2. Infección de células HeLa con bacterias.....	22
3. Ensayos de inmunofluorescencia .....	23
<b>Resultados .....</b>	<b>25</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>37</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>43</b>
<b>Referencias bibliográficas.....</b>	<b>44</b>

## Lista de figuras

**Figura 1:** Modelo de tráfico intracelular de *Brucella*

**Figura 2:** Fenotipo predominante de interacción de *B. canis* con células epiteliales HeLa

**Figura 3:** *B. canis* presenta un fenotipo replicativo similar al observado en *B. abortus*

**Figura 4:** Presentación en parejas de células con fenotipo replicativo de *B. canis*

**Figura 5:** *B. canis* presenta grumos de bacterias a tiempos tardíos de infección

**Figura 6:** Porcentaje de infección de *B. abortus* y *B. canis*

**Figura 7:** Porcentaje de células con fenotipo replicativo infectadas con *B. abortus* y *B. canis*

**Figura 8:** Porcentaje de células con fenotipo en grumos infectadas con *B. abortus* y *B. canis*

**Figura 9:** *B. canis* se encuentra en Retículo Endoplásmico a 48 horas de infección

**Figura10:** *B. canis* se encuentra en autofagosomas rodeados por LAMP a las 72 horas de infección

## **Resumen**

**Análisis y caracterización del tránsito intracelular de *Brucella canis* en células epiteliales HeLa durante diferentes tiempos de infección.**

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado de Licenciatura en Microbiología y Química Clínica**

**Melissa Wong Araya, A96893**

Reportes científicos previos sugieren que *Brucella canis* es incapaz de replicarse intracelularmente, esto se adjudica en parte a su condición rugosa. En el presente estudio se encontró que además de replicarse intracelularmente, realiza un ciclo intracelular de infección similar al de la especie lisa *Brucella abortus*; lo que parece indicar que el antígeno O del lipopolisacárido no es esencial para la replicación intracelular. Para hacer estos hallazgos se infectaron células epiteliales HeLa con ambas bacterias a una MOI de 500, y se utilizaron anticuerpos contra marcadores de superficie de Retículo Endoplásmico y autofagosomas para analizar la co-localización de las bacterias en los mismos, y determinar así la vía de tráfico intracelular durante la infección. Las monocapas celulares infectadas se analizaron mediante microscopía de fluorescencia y confocal a diferentes tiempos de infección.

## Antecedentes

### 1. Impacto de la brucelosis en el sector salud y ganadero.

La brucelosis es una enfermedad producida por bacterias del género *Brucella* sp. que afecta tanto al ser humano como a los animales domésticos, la fauna silvestre y a los mamíferos marinos. Esta infección es de importancia para la salud pública debido a los costos generados por la incapacidad física que produce en el enfermo y a las pérdidas secundarias por la afectación del ganado (Dirección de Epidemiología MDSDLN, 2013).

El hospedero primario de esta enfermedad lo constituyen especies domésticas de ganado vacuno, porcino, caprino y ovino. También pueden afectar a perros, bisontes, camélidos americanos, alces, algunas especies de ciervos, animales silvestres (liebre, zorro, comadreja, etc.) y mamíferos marinos (Dirección de Epidemiología MDSDLN, 2013).

La brucelosis se transmite al humano a través del consumo de lácteos contaminados (principalmente el queso de cabra, leche no pasteurizada, etc.), o por contacto con animales infectados a través de heridas, mucosas o inhalación de aerosoles. Esta característica hace que la enfermedad sea una de las zoonosis más distribuidas en el mundo. La brucelosis ha recibido diferentes nombres en las distintas zonas geográficas a lo largo del tiempo como: fiebre ondulante, fiebre de Malta, fiebre de Gibraltar, fiebre del Mediterráneo, fiebre Napolitana, aborto infeccioso o enfermedad de Bang (WHO, 2005).

Ésta enfermedad causa impactos negativos en la economía ganadera que incluye reducción en la producción de leche, abortos, infertilidad y mortalidad en las hembras que han abortado, mortalidad perinatal, incremento en los intervalos de parto y aumento en la necesidad de reemplazar a los animales (Alves *et al.*, 2014).

Si bien la prevalencia global de la brucelosis en el ser humano es desconocida, debido fundamentalmente al subdiagnóstico y a la subnotificación, se estima que a nivel mundial afecta a 500000 personas al año, especialmente en países del área

mediterránea, Arabia, India, México, América Central y Sudamérica (Pappas *et al.*, 2006).

En Centroamérica la prevalencia de la brucelosis bovina se estima entre 4 y 8%, con mayor prevalencia en los rebaños lecheros, con pérdidas calculadas en 25 millones de dólares al año, siendo Costa Rica y Guatemala los países más afectados (Moreno, 2002).

### **1.1. Brucelosis en animales y humanos**

Las diferentes especies del género muestran predilección por determinados hospederos, dentro de los cuales se puede mencionar a *B. melitensis* que muestra preferencia por ovejas y cabras, *B. abortus* por el ganado vacuno, *B. suis* por los cerdos, *B. neotomae* por la rata de madera del desierto, *B. ovis* por los carneros, *B. canis* por los perros, *B. ceti* por cetáceos, *B. pinnipedialis* por pinnípedos, *B. microti* por roedores y zorros, y *B. inopinata* cuyo hospedero primario es desconocido (Godfroid *et al.*, 2011).

La característica principal de la enfermedad en los animales, aunque la sintomatología puede variar según la especie afectada, es la placentitis y el aborto en las hembras preñadas y la infección del tracto genital en los machos que en general deriva en orquitis y esterilidad (Nicoletti, 1989), lo que afecta la capacidad reproductiva de los animales.

En el hospedero primario se produce una reproducción de la bacteria en el sistema monocito-macrófago en glándulas mamarias y gónadas. Adicionalmente, en hembras preñadas se produce una amplia replicación en trofoblastos corioalantoicos de la placenta y en el feto (Detilleux *et al.*, 1990)

El mecanismo de transmisión en los animales depende de la virulencia del género. Para las cepas más virulentas (*B. abortus* y *B. melitensis*), la transmisión se produce principalmente a través de los fluidos o tejidos asociados con el nacimiento o aborto de fetos infectados o a la transmisión a través de la leche. La transmisión venérea se considera importante para *B. canis*, *B. ovis* y *B. suis*. En general, los animales infectados con *B. canis* secretan por más tiempo la bacteria

en las superficies de las mucosas y en la orina, en comparación con animales infectados con *B. abortus* o *B. melitensis* (Gyles *et al.*, 2010).

En seres humanos, *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* poseen alta patogenicidad, mientras que *B. canis* presenta patogenicidad moderada (Godfroid *et al.*, 2011).

La brucelosis humana presenta síntomas inespecíficos como fiebre alta, mialgia y artralgia. La vía de transmisión más frecuente es a través de la ingestión de leche contaminada, no pasteurizada o subproductos lácteos, como quesos y mantequillas contaminadas. Esta enfermedad ha sido ampliamente relacionada con la ocupación; de esta manera, los trabajadores de alto riesgo como los veterinarios y los ordeñadores se infectan principalmente por el contacto con secreciones vaginales, animales que están en proceso de parto y leches contaminadas (Saldarriaga y Rugeles, 2002).

La transmisión humano a humano es inusual, sin embargo se han reportado casos de contaminación a través de transfusiones sanguíneas, trasplante de médula ósea y por contacto sexual (Doganay y Aygen, 2003). *B. abortus* también infecta la placenta y puede causar abortos (Anderson y Cheville, 1986).

*Brucella* se reproduce en nódulos linfáticos regionales lo cual da origen a bacteremias intermitentes y posteriormente se da una colonización del sistema retículo-endotelial hacia los ganglios linfáticos y a otros órganos, lo que provoca síntomas más acentuados (Baldwin y Goenka, 2006).

El periodo de incubación varía entre 1 a 5 semanas, y la infección puede ser sintomática o asintomática. De acuerdo con la duración y severidad de los síntomas, la brucelosis se clasifica como aguda (menos de 8 semanas), subaguda (de 8 a 52 semanas) o crónica (más de un año). Cualquier afección a la piel, sistema esquelético, gastrointestinal, hematopoyético, nervioso, cardiovascular o genitourinario se conoce como enfermedad localizada, que puede ser producto de la complicación de la brucelosis aguda o la manifestación final de la brucelosis crónica (Zhen *et al.*, 2013; Doganay y Aygen, 2003).

La respuesta típica del tejido a la infección por *B. melitensis* y *B. abortus* es la inflamación granulomatosa, que se ha evidenciado mediante estudios histopatológicos de biopsias con la presencia de pequeños granulomas en hígado, bazo, médula ósea y otros tejidos afectados por la bacteria. Estos granulomas causado por *Brucella* spp. reciben el nombre de brucelomas, y se caracterizan por la presencia de necrosis con un halo periférico de macrófagos epiteloideos, linfocitos, células plasmáticas e infiltrado polimorfonuclear en el área necrótica. Los macrófagos epiteloideos son un sitio de persistencia bacteriana durante la infección. La respuesta granulomatosa se reconoce como una respuesta del hospedero para contener a la bacteria que fue interiorizada pero que no fue eliminada por el macrófago. Se cree que el IFN- $\gamma$ , IL-12/23p40 y el TNF- $\alpha$  son producidos en el bruceloma y participan en su formación y/o mantenimiento. Mientras la respuesta granulomatosa a la infección por *B. abortus*, *B. melitensis* y especies marinas de *Brucella* se ha descrito en la literatura, se sabe poco sobre cómo *B. canis* puede producir este tipo de cuadros en sus hospederos caninos y humanos (Sánchez-Jiménez *et al.*, 2013).

### **1.1.1. Diagnóstico y tratamiento**

Para diagnosticar la brucelosis en animales se emplean pruebas serológicas como seroaglutinación lenta en tubo, fijación del complemento o el ensayo de Rosa de Bengala; además se emplean pruebas alérgicas, que consisten en evidenciar el estado de sensibilización causado por el contacto con *Brucella*, mediante reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado provocadas por la inyección de alérgenos extraídos de *Brucella*. También se realiza diagnóstico por medio de estudios bacteriológicos (Fensterbank, 1986).

El aislamiento de la bacteria a partir del cultivo de tejidos infectados como sangre o médula ósea es el método estándar para el diagnóstico en humanos durante la fase aguda, además se usa el método de concentración de lisis, que da buenos resultados. Los métodos automatizados de incubación son efectivos, pero están limitados por el lento crecimiento del microorganismo. La identificación presuntiva se realiza en base a las propiedades morfológicas, de cultivo y serológicas. La

confirmación requiere procedimientos de genotipo o caracterización del metabolismo oxidativo. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) requiere de procesos de estandarización y evaluación, especialmente en la enfermedad crónica, pero es de gran utilidad para determinar la especie y la magnitud de la carga bacteriana para la diferenciación de casos agudos y crónicos (Corbel, 1997).

Para tratar la brucelosis humana se emplea un esquema de antibioterapia compuesto por tetraciclinas y aminoglicósidos (Corbel, 1997). Como esquema se puede utilizar 100 mg de doxiciclina dos veces al día por 45 días combinado con 1 g de estreptomina diariamente por 15 días. Otra alternativa consiste en utilizar 100 mg de doxiciclina dos veces al día por 45 días en combinación con 15 mg/kg/día (600-900 mg) de rifampicina por 45 días. El tratamiento óptimo para mujeres embarazadas, neonatos y niños menores de 8 años no se ha determinado aún; para niños el tratamiento con trimetoprim/sulfametoxazole combinado con un aminoglicósido (estreptomina, gentamicina) o rifampicina parece dar buenos resultados (WHO, 2005).

Para el control de esta enfermedad en animales domésticos se ha recurrido al uso de vacunas vivas atenuadas. Hasta 1998 *B. abortus* S19 fue la vacuna oficial para prevenir la enfermedad en bovinos. En 1998 se introdujo una vacuna rugosa, *B. abortus* RB51, la cual es la que se encuentra mayoritariamente disponible en la actualidad. Las vacunaciones en ganado adulto y revacunaciones son comúnmente prácticas sin ningún control entre granjeros, principalmente en áreas de alta prevalencia. Por lo tanto, dificulta la evaluación y eficiencia de *B. abortus* RB51 en América Central. (Saldarriaga y Rugeles, 2002; Vega-Medellín, 2006).

La vacunación en ganado ovino se realiza con *B. melitensis* Rev. 1, una cepa atenuada lisa. Una desventaja del uso de esta cepa viva, es que no puede aplicarse a hembras gestantes y que además es patógena para el ser humano (Cassataro y Pasquevich, 2006).

## **2. El género *Brucella*.**

*Brucella* es un género de bacterias Gram negativas que pertenece al grupo  $\alpha$  2 de las proteobacterias, junto con otros géneros como *Ochobactrum*, *Rizhobium*,

*Rodhobacter*, *Agrobacterium*, *Bartonella* y *Rickettsia* (Moreno *et al.*, 1990). Esta bacteria posee una morfología microscópica cocobacilar, sin motilidad, no forma esporas, son aerobias, y fastidiosas en cuanto a requerimientos nutricionales.

Estos microorganismos son parásitos facultativos que sobreviven casi exclusivamente en los hospederos infectados, muestran preferencia por compartimentos intracelulares o fagocíticos, reticuloendoteliales y células epiteliales especializadas. *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. suis* y otras especies aisladas de muestras clínicas de mamíferos marinos se denominan cepas lisas porque expresan en el lipopolisacárido de la superficie el antígeno o polisacárido O. *B. canis*, *B. ovis* y algunas cepas vacunales se denominan cepas rugosas debido a la ausencia de la expresión del polisacárido O en su superficie (Gyles *et al.*, 2010; Alshaalan *et al.*, 2014).

Estudios moleculares utilizando hibridación ADN-ADN determinaron que todos los miembros del género comparten más del 95% de identidad, por lo que se considera como un género monoespecífico (Verger *et al.*, 1985). A pesar de esto, la clasificación de especies basada en la preferencia de hospedero y características antigénicas y bioquímicas sigue siendo ampliamente usada. Sin embargo diversos estudios indican que la estructura y organización genómica de una especie dada tiene características únicas y distintivas, lo que sugiere que el género consiste en linajes clonales, cada uno adaptado en forma específica, aunque no exclusiva, a su hospedero mamífero (Michaux-Charachon *et al.*, 1997; Jumas-Bilak *et al.*, 1998).

El género presenta una estructura genómica de dos cromosomas. Estudios cromosómicos de cuatro biovariedades de *B. suis* sugieren que el género *Brucella* emerge de un ancestro común con un solo cromosoma, similar al del biotipo tres de *B. suis*. La estructura génica de *B. suis* biotipo uno es similar a la de *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. ovis* y *B. neotomae*. Los biotipos dos y cuatro de *B. suis* difieren en el tamaño de sus dos cromosomas con respecto a las otras biovariedades (Aréstegui *et al.*, 2001).

## 2.1. Generalidades de *B. canis*.

*B. canis* es el agente etiológico de la brucelosis canina caracterizada por abortos, atrofia testicular, infertilidad y linfadenopatías. Carece del antígeno O del LPS, por lo que es una especie naturalmente rugosa. (Barkha *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2014). *B. canis* se puede distinguir de *B. suis*, *B. melitensis* y *B. abortus* por la ausencia de quinovasamina en el LPS y por un perfil de ácidos grasos distinto (Fox *et al.*, 1998).

Esta bacteria es un cocobacilo de 0,5 a 0,7 µm de diámetro por 0,5 a 1,5 µm de longitud, inmóvil, no esporulado, aerobio. Crece en agar sangre y agar tripticosa soya, no produce H<sub>2</sub>S y es oxidasa y ureasa positivo, y posee un patrón de crecimiento mucoide (Larsson y da Costa, 1980; Paulsen *et al.*, 2002; Soloaga *et al.*, 2004).

El diagnóstico serológico para las infecciones causadas por *B. canis* basado en técnicas como aglutinación en plato, inmunodifusión en gel y ELISA es complicado, se han descrito falsos negativos asociados a un aislamiento bacteriano positivo, y falsos positivos debido a reacciones cruzadas con *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, *Bordetella bronchiseptica*, entre otras (Barkha *et al.*, 2011).

Algunos estudios han explorado la caracterización inmunoquímica de los antígenos de *B. canis* para comprender la respuesta humoral durante la infección y realizar estudios de seroprevalencia. Esto se puede lograr a partir de un extracción caliente de antígenos externos (de membrana) con buffer salino de fosfatos (HPBSE) y antígenos sonicados internos (citoplasmáticos). Mediante el uso de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western blot se pueden identificar las proteínas inmunogénicas. Una vez identificados y purificados, los antígenos sonicados internos se pueden utilizar para preparar ELISAS indirectos, porque presentan una alta sensibilidad, y los HPBSE pueden emplearse en la preparación de pruebas confirmatorias de inmunodifusión en gel, por su alta especificidad (Barkha *et al.*, 2011; Carmichael *et al.*, 1989).

La presentación clínica de la brucelosis humana causada por *B. canis* se asemeja a las infecciones causadas por las cepas lisas de *Brucella* spp. con signos y síntomas inespecíficos. La verdadera incidencia es desconocida, pero el contacto directo con perros es una fuente de riesgo para sufrir la enfermedad. La infección parece exacerbar la frecuencia en condiciones subyacentes de ciertos órganos blanco. Se ha descrito una conexión entre la infección humana por *B. canis* y desórdenes en el sistema inmune, perturbaciones metabólicas y complicaciones por endocarditis (Marzetti *et al.*, 2013).

## **2.2. Generalidades de *B. abortus*.**

Esta especie es el agente etiológico de la brucelosis bovina, de la cual se conocen las biovariedades 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 9 que se distinguen por los requerimientos de CO<sub>2</sub>, la producción de H<sub>2</sub>S y la presencia de antígenos de superficie A o M (Meyer y Shaw, 1971). Las biovariedades 1 y 2 son las únicas que se han identificado en América Central (Vega-Medellín, 2006).

*B. abortus* es una bacteria no hemolítica, no licúa la gelatina, posee actividad ureasa lenta, no produce ácidos a partir de glucosa u otros carbohidratos y su crecimiento se optimiza mediante la suplementación de los medios de cultivo con suero o sangre. En aislamientos primarios *B. abortus* es de lento crecimiento a las 48 horas, las colonias observadas son convexas y redondas de tipo liso, que se diferencian de las rugosas que se observan planas y con apariencia más granular. La pared celular de *B. abortus* contiene antígeno O en el LPS, lo que la hace una cepa lisa (Hagan *et al.*, 1988).

## **3. Patogénesis: entrada y supervivencia.**

La patogenicidad de *Brucella* se da a través de su habilidad para adaptarse y sobrevivir a las condiciones encontradas en su nicho de replicación intracelular, como bajos niveles de nutrientes y oxígeno, pH ácido y presencia de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Kohler *et al.*, 2002; He, 2012). La coevolución que existe entre *Brucella* y su nicho se ejemplifica por la habilidad para evitar la degradación lisosomal y la extensiva multiplicación dentro de la célula hospedera

sin restringir funciones básicas de dicha célula o sin inducir muerte celular programada (Celli, 2006).

Específicamente, el ciclo de vida de *Brucella* posee dos fases: la infección crónica de los macrófagos que conduce a la supervivencia y replicación de la bacteria, y la infección aguda en las células epiteliales no fagocíticas que conduce a la patología del tracto reproductivo y al aborto (He, 2012).

Una vez que *Brucella* invade la mucosa, se adhiere a la célula mediante proteínas en la membrana externa que actúan como porinas asociadas al peptidoglicano (Douglas *et al.*, 1984), luego infecta células epiteliales no fagocíticas y células fagocíticas profesionales como macrófagos y neutrófilos mediante fagocitosis tipo *zipper* (Gorvel y Moreno, 2002; Carvalho-Neta *et al.*, 2010).

Mediante la fagocitosis tipo *zipper* la membrana celular engloba a la bacteria a ingerir mediante la unión secuencial de receptores de la célula con ligandos de la bacteria, las prolongaciones de la membrana celular se fusionan formando una vesícula que recibe el nombre de fagosoma en donde queda contenida la bacteria (Tollis *et al.*, 2010; Uribe *et al.*, 2009).

La entrada de *Brucella* a los macrófagos requiere que las balsas lipídicas de la membrana celular sean funcionales, lo que sugiere que el receptor para esta bacteria está presente en esos dominios lipídicos especializados de la membrana plasmática. Se han propuesto como receptores la proteína priónica celular (PrPc) y el receptor scavenger clase A (SR-A) para los ligandos Hsp60 (proteína de choque térmico 60) y el LPS de *Brucella*, respectivamente. Se ha visto que la disrupción de las balsas lipídicas reduce significativamente la supervivencia temprana de *Brucella* dentro de los macrófagos (Celli, 2006; Jimenez de Bagues, 2005).

Las bacterias opsonizadas son internalizadas por macrófagos y monocitos por medio de receptores del complemento y de Fc, mientras que las no opsonizadas penetran las células mediante receptores de lectina y fibronectina. En este sentido, el modo por el cual *Brucella* es internalizada por los fagocitos profesionales parece

estar ligado a su destino dentro de los compartimentos intracelulares. Por el contrario, en los fagocitos no profesionales el modo de entrada no interfiere con el tráfico intracelular de la bacteria ingerida (Gorvel y Moreno, 2002).

La participación secuencial de actina es requerida por la fagocitosis para llevar a cabo la fusión y fisión de membranas; una vez internalizada la partícula fagocitada, hay una interacción con la vía endocítica. Las GTPasas monoméricas de la familia Rab determinan las interacciones específicas entre organelas (Plüddemann y Gordon, 2010).

En células epiteliales tipo HeLa, *Brucella* interactúa con un receptor desconocido, e induce un proceso de fagocitosis en donde se reclutan y activan filamentos de actina en el sitio de la internalización. Estos eventos se deben a la activación de GTPasas monoméricas que pertenecen a la subfamilia Rho como Rho, Rac y Cdc42 quienes regulan el citoesqueleto y una cascada de segundos mensajeros, entre los que se incluyen el GMP cíclico, PIP3-kinasa, tirosina kinasa y MAP kinasas. Una vez ingerida la bacteria, ésta se dirige a compartimentos fagocíticos tempranos que se acidifican mediante bombas de protones, luego se dirigen al retículo endoplásmico por la ruta autofagocítica adonde se replican. *Brucella* puede liberar señales para inhibir la apoptosis en su nicho de replicación (Gorvel y Moreno, 2002; Carvalho-Neta *et al.*, 2010).

### **3.1. Factores de virulencia**

En *Brucella* spp. no se han descrito factores de virulencia clásicos como citolisinas, cápsulas, exotoxinas, secreción de proteasas, fimbrias, toxinas codificadas en fagos, y plásmidos de virulencia; sin embargo, se han identificado factores moleculares críticos para los procesos intracelulares de replicación y supervivencia, como el lipopolisacárido (LPS), sistema de secreción tipo IV y el sistema de dos componentes BvrR/BvrS (He, 2012).

- **Lipopolisacárido (LPS)**

El LPS de *Brucella* exhibe propiedades distintas a otros LPS's. En contraste con el LPS clásico de las enterobacterias, el de *Brucella* es mucho menos activo y tóxico. El LPS de las cepas lisas es un inductor pobre del estallido respiratorio, de intermediarios bactericidas de nitrógeno y de secreción de lisozima, además es altamente resistente a la degradación en los macrófagos. El de las cepas rugosas es más sensible al ataque del complemento (Seleem *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que el LPS de *Brucella* perjudica la respuesta inmune antimicrobiana del hospedero mediante la inhibición de la actividad del complemento, los ataques de péptidos antimicrobianos y la prevención de la síntesis de mediadores inmunes como TNF- $\alpha$  u óxido nítrico (Seleem *et al.*, 2008).

Las cepas lisas interactúan con las balsas lipídicas localizadas en la superficie de los macrófagos y entran a la célula de forma que se evita la fusión con los lisosomas. En contraste las cepas rugosas (que carecen del antígeno O), parecen no entrar por el mecanismo de las balsas lipídicas y más bien se fusionan rápidamente con los lisosomas (Seleem *et al.*, 2008).

Las cepas lisas inhiben la apoptosis de las células hospederas por la acción del antígeno O mediante un mecanismo independiente de TNF que está ausente en las cepas rugosas. Gracias a la inhibición de la apoptosis celular, las bacterias lisas pueden escapar de la vigilancia del sistema inmune y evitar la activación del mismo por factores liberados por las células muertas y también evitan la activación de las células presentadoras de antígenos (Seleem *et al.*, 2008).

- **Sistema de secreción tipo IV (T4SS) *virB***

Los T4SS son una familia de complejos de multiproteínas responsables de la secreción de macromoléculas y proteínas a través de la envoltura bacteriana. El T4SS en *Brucella* está codificado en el operón *virB* que codifica por 12 proteínas con una homología significativa con otros T4SSs. La expresión del operón *virB* está regulada por el regulador de quorum-sensing VjbR. Luego de la entrada a los

macrófagos por la vía de las balsas lipídicas, la vacuola contenedora de *Brucella* (BCV) (no opsonizada) evita la fusión con el lisosoma. La BCV interactúa con el retículo endoplásmico (RE), llevando a la creación de una vacuola especializada en la que la bacteria se multiplica. La BCV interactúa con los sitios de exportación del RE para generar una organela permisiva para la replicación intracelular. La adquisición de membranas del RE depende del T4SS VirB funcional y del factor Sar1 del hospedero. En contraste, las bacterias opsonizadas han demostrado una replicación intracelular extensiva dentro de compartimentos que no presentan una asociación clara con los componentes del RE. Las bacterias mutantes que carecen del T4SS VirB son incapaces de adquirir las membranas del RE, perdiendo así la habilidad para multiplicarse en células HeLa (Seleem *et al.*, 2008), además presentan incapacidad para replicarse adecuadamente dentro de la célula hospedera por lo que son eliminadas (Guzman-Verri *et al.*, 2002).

- **Sistema regulador de dos componentes BvrS/BvrR**

El sistema regulador de dos componentes BvrS/BvrR en *Brucella* es esencial para sensor el ambiente intracelular y permitir así la adaptación del estilo de vida extracelular al intracelular. Dicho sistema codifica por un sensor de histidina kinasa y un regulador transcripcional; y está involucrado en el ciclo de vida intracelular de *Brucella* en células fagocíticas profesionales y no profesionales. En términos generales el sistema BvrS/BvrR participa en la homeostasis estructural y funcional de la membrana externa (Gorvel y Moreno, 2002).

Mutaciones en el sistema BvrR/BvrR disminuyen la expresión de las proteínas Omp25 y Omp22, además impactan la resistencia característica de *Brucella* a policaciones bactericidas, aumenta la permeabilidad a los surfactantes y se disminuye la inhibición de la liberación del TNF- $\alpha$  en los macrófagos. Estos mutantes carecen de habilidad para activar la GTPasa monomérica Cdc42, lo que se traduce en una reducción en la capacidad para invadir células. Adicionalmente, mutantes en este sistema son incapaces de inhibir la fusión con los lisosomas y de replicarse intracelularmente (Seleem *et al.*, 2008). La producción de la proteína Omp3b también se ve afectada por dicha mutación así como la inducción de

defectos en el LPS. El antígeno O, sin embargo, parece no estar afectado (Gorvel y Moreno, 2002).

- **Glucanos cíclicos**

Los glucanos  $\beta$ -1,2 cíclicos son secretados por *Brucella* cuando está dentro de la célula, y modulan la maduración de la BCV para evitar que se fusione con los lisosomas. Se cree que su mecanismo de acción depende de su propiedad de extraer el colesterol de las membranas eucariotas y romper las balsas lipídicas ricas en colesterol presentes en las membranas fagosómicas (Celli, 2006).

- **Ureasa**

Se ha descrito que *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* tienen en su genoma dos operones que codifican por ureasa, ambos localizados en el cromosoma 1, denominados *ure1* y *ure2*. En el genoma de las cepas *B. canis* HSK y *B. canis* ATCC 23365 disponibles en el GenBank, estos dos operones también están presentes. En procariontes, las ureasas son enzimas con varias subunidades que contienen níquel que cataliza la hidrólisis de la urea a dióxido de carbono y amoníaco (Sánchez-Jiménez *et al.*, 2013). Las moléculas de amoníaco se protonan para formar amonio. Lo cual a su vez induce que el pH aumente. De esta forma se facilita la supervivencia en ambientes ácidos como el estómago (Cruz-Ramos *et al.*, 1997).

El operón *ure1* es necesario para el óptimo crecimiento en cultivo, la actividad de la enzima ureasa y la supervivencia a pH bajo. El operón *ure2*, aparentemente, aumenta la tasa de supervivencia a pH bajo (Sánchez-Jiménez *et al.*, 2013).

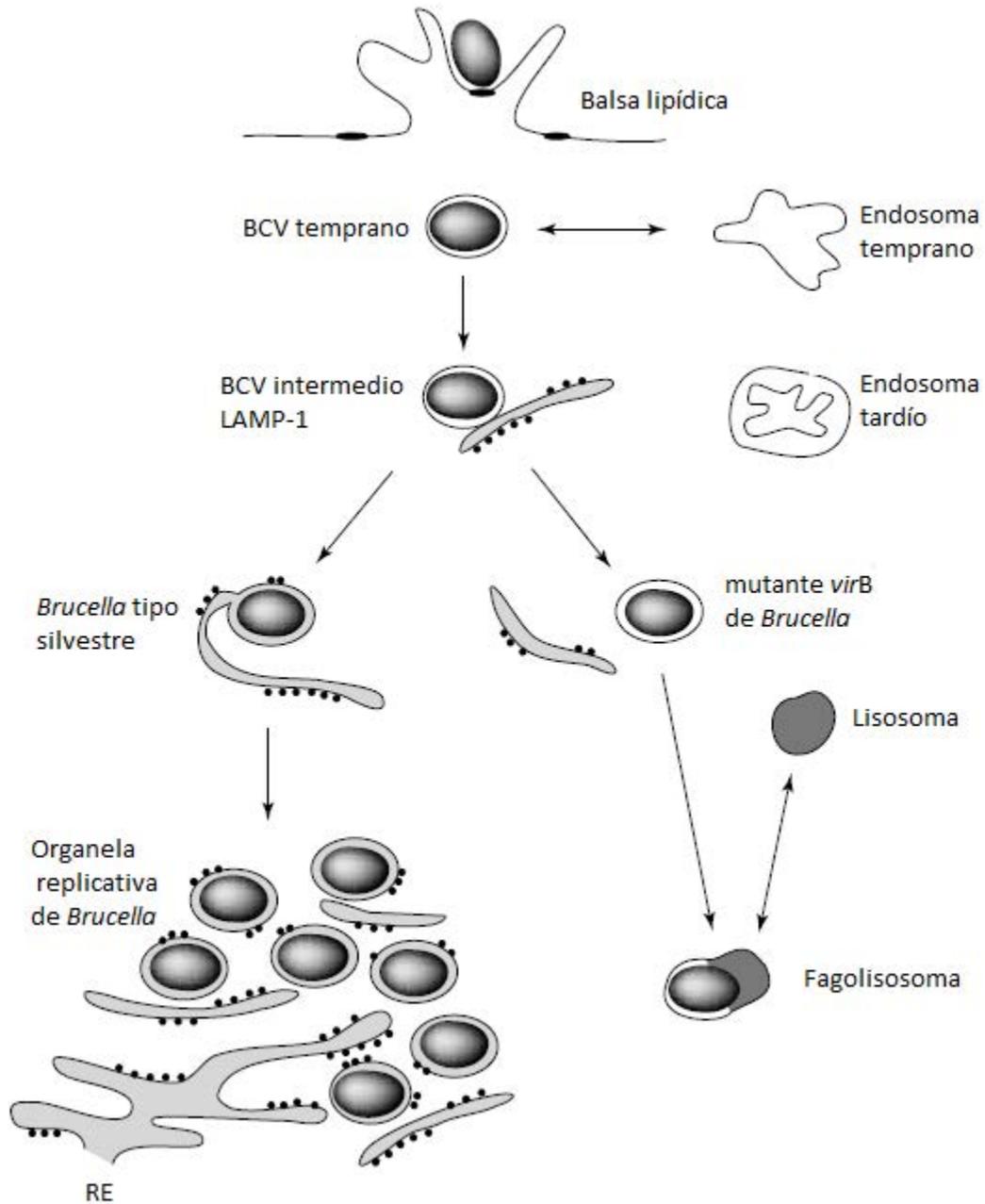
#### **4. Tránsito intracelular**

Los eventos de tránsito intracelular descritos en *Brucella* representan la sumatoria de numerosos estudios en los que se han utilizado diferentes líneas celulares infectadas con especies como *B. abortus* o *B. melitensis*, para las cuales se ha descrito dicho proceso, sin embargo para *B. canis* este proceso es desconocido (von Bargen *et al.*, 2012).

Inicialmente, cuando *Brucella* infecta macrófagos, las membranas de los endosomas nacientes presentan una composición proteica similar a la de la membrana plasmática de la cual se originan, pero rápidamente comienzan a reciclar los componentes de las mismas y a adquirir marcadores de endosomas tempranos como Rab5 y EEA-1. Estos eventos les permite a estos endosomas fusionarse con organelas endocíticas y dar origen al BCV temprano (Comerci y Ugalde, 2002).

En etapas tempranas de maduración se da una acidificación vacuolar concomitante con la adquisición de la glicoproteína-1 de membrana tardía endosomal/lisosomal asociada a lisosomas (LAMP-1) en la membrana de BCV. Sin embargo, otros marcadores de compartimentos endocíticos tardíos no son adquiridos por la BCV, lo que sugiere que las BCV son segregadas por la vía endocítica antes que los endosomas tardíos. Aún no está claro cómo se adquiere LAMP-1 y si es necesaria su adquisición temprana para la maduración de BCV. En contraste, la acidificación es necesaria para la supervivencia de *Brucella* y es requerida para la expresión intracelular del sistema de secreción tipo IV VirB (Celli, 2006).

La maduración de BCV procede durante muchas horas antes de la aparición de la replicación (12 h después de la infección), con el marcador LAMP-1 retenido temporalmente en la BCV antes de ser excluido progresivamente. En esta etapa, BCV interactúa físicamente con el RE, dicho evento se caracteriza por la pérdida del LAMP-1 vacuolar y la adquisición de varios marcadores moleculares específicos del RE, como calnexina, calreticulina, sec61 $\beta$  y PDI, sugiriendo que *Brucella* modula la conversión de su vacuola contenedora en una organela derivada del RE, la cual a su vez permite la replicación bacteriana (Celli, 2006). Mutantes en el TSS4 VirB de *Brucella* son deficientes en el proceso de maduración completa y no son capaces de inducir la interacción y fusión con el RE; por esta razón permanecen en compartimentos inmaduros que al final se fusionan con los lisosomas (Fig. 1) (Celli y Gorvel, 2004).



**Figura 1. Modelo de tráfico intracelular de *Brucella*.** A) Luego de la entrada de la bacteria, se forman las BCV de tráfico en la vía endocítica, secuencialmente hay una interacción con compartimentos tempranos en dicha vía, y con compartimentos tardíos y cuerpos multivesiculares antes de unirse con los lisosomas. Esas interacciones son requeridas para la siguiente etapa del tránsito (B), donde las BCV interactúan con sitios de salida del RE (ERES) y se fusionan con el RE (C) para generar el compartimento derivado del RE, que es la BCV replicativa (D). Las BCV que contienen mutantes con VirB defectuoso no pueden interactuar con el RE y/o limitar la fusión con el

compartimento lisosomal, que madura en una vacuola bactericida (E) (Tomado de Celli y Gorvel, 2004).

En células no fagocíticas como las HeLa, Vero o trofoblastos de cabra preñada, *B. abortus* y *B. melitensis* también previenen la fusión con el lisosoma escapando de la vía endocítica antes de interactuar con endosomas tardíos. Posteriormente, estas bacterias transitan a través de una vacuola intermediaria con características autofágicas, y por último se replican en un compartimento caracterizado por la presencia de marcadores del RE (Celli *et al.*, 2003). Los trofoblastos infectados con *B. abortus* muestran hipertrofia del RE rugoso, además se observa un aumento en el volumen y densidad de superficie del RE que sugiere la multiplicación y síntesis y glicosilación de proteínas bacterianas dentro del mismo (Anderson y Cheville, 1986).

#### **4.1 Culminación del ciclo celular en compartimentos autofágicos.**

La degradación de patógenos intracelulares es una forma selectiva de autofagia denominada xenofagia, que es el sistema de degradación intracelular que entrega componentes citoplasmáticos dentro del lisosoma (Mizushima, 2007; Starr *et al.*, 2012). Existen al menos cuatro formas generales que pueden ser utilizadas para la autofagia dependiente de proteínas. Estas incluyen la fusión facilitada por autofagia de proteínas de las bacterias contenidas en fagosomas con lisosomas, el envolvimiento de los fagosomas o endosomas que contienen bacterias con autofagosomas, o la captura xenofágica de bacterias que han escapado dentro del citoplasma. Muchos estudios definen la autofagia bacteriana como la co-localización de la bacteria y la proteína LC3, que se encuentra en la membrana de los compartimentos autofagosómicos (Levine *et al.*, 2011).

Previamente se ha demostrado en la infección de células HeLa por *B. abortus*, que luego de la interacción con endosomas tempranos se explota la maquinaria autofágica de la célula para localizarse finalmente en el RE, donde se multiplican las bacterias. El compartimento autofagosómico se identificó mediante el marcador autofagosomal monodansilcadaverina (Pizarro-Cerdá *et al.*, 1998), que también se

encuentra en compartimentos endocíticos o lisosomales tardíos o en compartimentos acídicos (von Bargen *et al.*, 2012).

En investigaciones realizadas por Starr *et al.*, se determinó que la replicación de *Brucella* en el RE es seguida por la conversión de la BCV en un compartimento con características autofágicas (aBCV) en tiempos tardíos de la infección. La formación de compartimentos autofágicos requiere de las proteínas de iniciación de autofagia ULK1, Beclina-1, ATG14L y de la actividad PI3-kinasa; adicionalmente se requieren las proteínas autofágicas de elongación ATG5, ATG16L1, ATG4B, ATG7 y LC3B. Sin embargo, se demostró que la formación de aBCV en *Brucella* es independiente del reclutamiento de las proteínas autofágicas de elongación, por esta razón, el tráfico por el RE no se ve afectado en células con autofagia deficiente porque la depleción de dichas proteínas en células HeLa promueve ciertos rearrreglos, que aún deben ser estudiados, en la membrana de la BCV para la biogénesis de la aBCV y completar así el ciclo infeccioso y la propagación célula-célula (Starr *et al.*, 2012).

La aBCV tiene una asociación fuerte con focos de infección, por lo que se sugiere que promueve la liberación de bacterias mediante un proceso exocítico o por muerte celular (Starr *et al.*, 2012).

Actualmente se desconocen los mecanismos de tránsito intracelular de *B. canis*, sin embargo, se ha determinado este proceso en otras especies del género *Brucella*, como *B. abortus*. Estudios realizados en líneas celulares osteoblásticas con *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. canis*, indican la incapacidad de replicación intracelular de *B. canis* dentro de dichas células (Delpino *et al.*, 2009). También se reporta en la literatura que *B. canis* posee la capacidad de sobrevivir dentro de macrófagos, pero no de multiplicarse, lo que sugiere, que ésta es la razón por la cual *B. canis* es poco patogénica para el ser humano (Caron *et al.*, 1994).

En pruebas de infección de células Vero con seis especies diferentes de *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. canis*, y *B. ovis*), se observaron

bacterias en fagosomas y fagolisosomas con la subsecuente localización de las mismas en el RE, pero en el caso de *B. canis* no se observó replicación, ni localización en el RE (Dettileux *et al.*, 1990).

## Justificación

La brucelosis constituye una problemática para la salud humana y animal, y el conocimiento de la patogénesis de la enfermedad es de gran relevancia para la comunidad científica. Se ha descrito la habilidad de *Brucella* spp. para infectar células fagocíticas y no fagocíticas mediante la utilización de sus factores de virulencia atípicos como el sistema de secreción tipo IV VirB y el sistema regulador de dos componentes (BvrS/BvrR). Además se conoce el comportamiento intracelular de *B. abortus*, desde el momento de la infección en macrófagos y células no fagocíticas como las HeLa, hasta la replicación en el retículo endoplásmico y su posterior tránsito a sitios de salida caracterizados por ser compartimentos autofagocíticos.

En la literatura existen vacíos acerca de la capacidad de *B. canis* para replicarse dentro de las células, por lo tanto surge la disyuntiva de cómo *B. canis*, que es una especie zoonótica al igual que *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*, no logra replicarse intracelularmente pero sí es capaz de producir un cuadro clínico en su hospedero primario e incluso en seres humanos similar al que producen las especies mencionadas anteriormente, que además se sabe realizan un ciclo replicativo dentro de las células.

Estudios previos realizados por Medina-Rojas en el 2012, determinaron la capacidad de *B. canis* para multiplicarse intracelularmente en células epiteliales HeLa y macrófagos murinos Raw 264.7; se estandarizaron las condiciones para obtener curvas de crecimiento adecuadas para realizar las infecciones *in vitro*. Sin embargo, en la actualidad se desconoce el proceso y las características del tráfico intracelular de *B. canis* en células fagocíticas y no fagocíticas. El presente proyecto pretende demostrar la capacidad replicativa intracelular de *B. canis* y estudiar dicho proceso para contribuir a entender la patogénesis de *B. canis* y definir un modelo de infección en células HeLa.

A largo plazo, este tipo de estudios contribuirán a comprender de una mejor manera el cuadro clínico causado por esta bacteria con el fin de desarrollar vacunas y tratamientos más efectivos.

### **Hipótesis**

El ciclo de replicación intracelular de *B. canis* sigue una dinámica similar a la de *B. abortus* en cuanto a la cinética replicativa y a los sitios intracelulares por los que transita.

### **Objetivo general**

Caracterizar la cinética de replicación y los sitios de tránsito intracelular de *B. canis*.

### **Objetivos específicos**

- 1) Cuantificar el porcentaje de infección en células Hela a diferentes tiempos para *B. canis* y *B. abortus*.
- 2) Determinar los sitios de tránsito durante el ciclo de vida intracelular de *B. canis*.
- 3) Comparar los parámetros de infección encontrados en *B. canis* con los de *B. abortus*.

## Materiales y métodos

### 1. Cepas bacterianas y preparación de inóculos

La cepa GFP de *B. canis* que se utiliza, es derivada de la cepa bcanCR12 de *B. canis* aislada en el Laboratorio de bacteriología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Costa Rica, a partir de un hisopado vaginal de una hembra cánida de raza Pomeranian. Dicha cepa se modificó genéticamente para que contenga una Proteína Verde Fluorescente (GFP) cromosomal no inducible. La cepa de *B. abortus* 2308 Nalr que se emplea expresa también la GFP (Sangari y Agüero, 1991). Ambas cepas se almacenan en stocks a  $-70^{\circ}\text{C}$  en caldo tripticasa soya (CTS) con una concentración final de 25% de glicerol.

Para obtener resultados óptimos en el ensayo se emplean bacterias en la fase logarítmica de la curva de crecimiento. Con este fin, para *B. abortus*, se inoculan  $5 \times 10^9$  bacterias en un Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 20 mL de CTS. Las bacterias se incuban 18 horas en agitación a 200 rpm a  $37^{\circ}\text{C}$  en condiciones de aireación. Mediante determinación densitométrica a 420 nm se determina que las bacterias estén en fase logarítmica con una absorbancia cercana a 0,5 OD (Starr *et al.*, 2012).

Para obtener un inóculo de *B. canis* en fase logarítmica se inoculan  $5 \times 10^9$  bacterias en 10 mL de CTS en un tubo Falcon, se incuban 18 horas en agitación a 120 rpm a  $37^{\circ}\text{C}$  en condiciones de aireación. Mediante densitometría a 420 nm se determina que las bacterias estén en fase logarítmica con una absorbancia cercana a 0,1 OD.

Una vez obtenida la absorbancia, se calcula la concentración bacteriana del pre-cultivo utilizando la fórmula:  $C_1 = \text{Abs} - 0,0103 / 5 \times 10^{-11}$ . La concentración bacteriana deseada ( $C_2$ ), que corresponde a  $2,5 \times 10^8$  bacterias/pozo, se deriva de  $C_2 = A \times B / \text{mL}$ , donde A corresponde  $5 \times 10^5$  células por pozo y B al MOI (Multiplicidad de infección) que es igual a 500 bacterias por célula.

Conociendo la concentración deseada de bacterias/pozo, es posible determinar el volumen de precultivo a utilizar para realizar el paso siguiente del procedimiento mediante la siguiente fórmula  $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ . Donde  $C_1$  es la concentración del precultivo,  $V_1$  es el volumen del precultivo,  $C_2$  corresponde a la concentración bacteriana deseada y  $V_2$  al volumen a preparar para la infección.

A partir de estos cálculos, se realiza la solución con bacterias en DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco, Sigma) + 5% FBS (suero fetal bovino).

## **2. Infección de células HeLa con bacterias.**

Para los cultivos celulares se utiliza la línea celular eucariota HeLa (ATCC No.CCL-2) de la colección de la American Type Culture Collection (ATCC).

Los cultivos de células HeLa se realizan en placas de plástico de 24 pozos (Costar). En cada pozo se deposita un cubreobjetos de vidrio de 12 mm sobre el cual se siembran las células. La confluencia al día de la infección debe ser de un 70-80% por pozo. Para obtener dicha confluencia se colocan  $5 \times 10^5$  células en cada pozo, se agrega DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino, penicilina y estreptomina y se incuban a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

Dos horas antes de realizar el procedimiento para la infección, se añade a la mitad de los pocillos la toxina factor citotóxico necrotizante (CNF-1) de cada placa para comparar los porcentajes de infección con y sin la influencia de dicha toxina. La CNF-1 se aísla a partir de cepas patogénicas de *Escherichia coli* y cataliza la activación de Rho GTPasas mediante la desaminación de residuos de glutamina para inducir cambios celulares como un aumento en el volumen celular, multinucleación y una reorganización de los filamentos de actina del citoesqueleto para promover la fagocitosis en células no fagocíticas (Richard *et al.*, 1999).

Una vez que se tiene la dilución bacteriana preparada en DMEM + 5% FBS para infectar las células y las placas de 24 pozos con la confluencia deseada, se lava cada pocillo con PBS 1X y se agrega la solución preparada DMEM conteniendo las bacterias. Se centrifuga 5 minutos a 1600 rpm a 4 °C para favorecer el contacto directo entre las células eucariotas y las bacterias. Luego se incuban 30-

45 minutos a 37 °C. Después de la incubación se hacen lavados con PBS 1X a cada pocillo. Para eliminar las bacterias extracelulares se prepara una solución de DMEM suplementado con 5% SFB y 100 µg/ml de gentamicina que se añade a cada pocillo, incubando 1 hora a 37°C. Se descarta el medio y se agrega 1ml de DMEM+ 5µg/ml de gentamicina y se incuba a 37°C durante 24 horas, 48 horas y 72 horas.

### **3. Ensayos de inmunofluorescencia**

A los tiempos indicados, las células se lavan con PBS 1X y se fijan con paraformaldehído al 3,5% durante 10 minutos. Con el fin de bloquear sitios de unión inespecífica de los anticuerpos, las células se incuban por 10 minutos con Cloruro de Amonio 50 mM y seguidamente se permeabilizan con saponina al 0,1%.

Posteriormente se realiza la inmunofluorescencia indirecta, para lo cual se incuba por 30 minutos con el anticuerpo primario monoclonal anti-Lamp1 hecho en ratón (H4A3 abcam), o el anticuerpo policlonal anti-calnexina hecho en conejo (ab75801 abcam). Luego se realizan lavados con PBS y se procede a incubar con los anticuerpos secundarios anti-ratón hecho en cabra Alexa Fluor 488 conjugado con Texas Red o con el anticuerpo anti-conejo Alexa Fluor 594 conjugado con Texas Red, según sea el caso (Invitrogen).

Las muestras finalmente se fijan en medio de montaje Prolong (Lifetechnologies), que contiene DAPI para teñir los núcleos de las células, y se colocan los cubreobjetos de vidrio con la preparación sobre portaobjetos de vidrio.

Se analiza cada lámina en un microscopio de fluorescencia (Nikon) a 60 X y 100 X y se contabiliza de forma manual por campo el número de células totales, el número de células infectadas, el número de células en replicación y el número de células con grumos bacterianos en autofagosomas, tanto para *B. canis* como para *B. abortus*, con y sin CNF a las 24 horas, 48 horas y 72 horas post-infección. Además se analizan los diferentes fenotipos infectivos en cada tiempo.

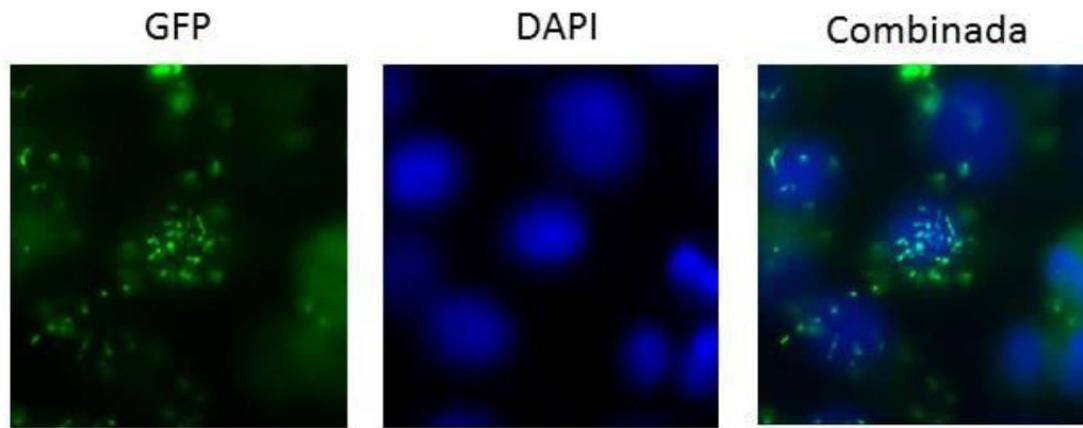
Mediante microscopía confocal (Nikon) en un plano de 60X con lente de inmersión se observa la co-localización de la cepa *B. canis* que expresa GFP con los marcadores de compartimentos intracelulares LAMP y calnexina a 48 horas y 72 horas post infección.

Las fotografías fueron adquiridas y procesadas utilizando Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated).

## Resultados

### Tipificación de los fenotipos replicativos de *B. canis* y *B. abortus* en células HeLa.

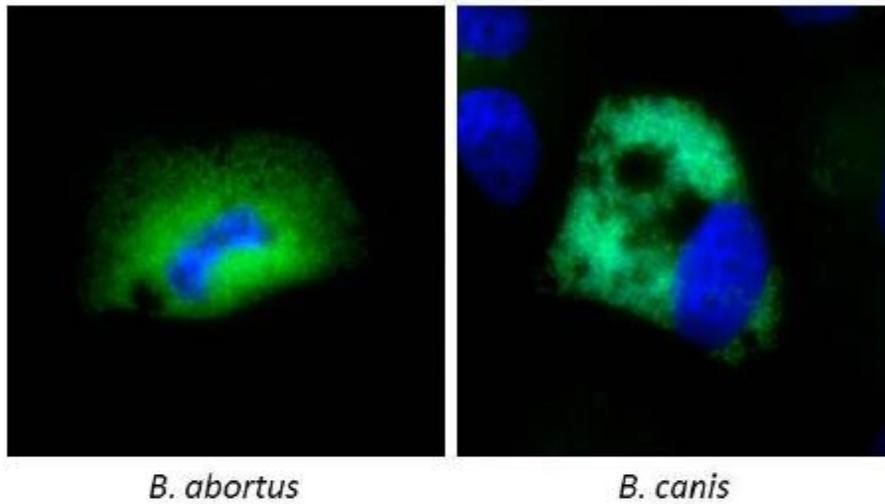
Con el fin de describir la interacción de *B. canis* con células no fagocíticas y de realizar un análisis de la capacidad replicativa en las mismas se procedió a infectar monocapas de células HeLa con dicha bacteria. En paralelo se realizaron infecciones con *B. abortus* para hacer comparaciones entre las dos especies. Los análisis se realizaron mediante microscopía de fluorescencia en tiempos intermedios (24 horas) y tardíos (48 y 72 horas) de la infección. En todas las condiciones analizadas, el fenotipo de interacción más frecuentemente encontrado se caracteriza por la presencia de varias decenas de bacterias localizadas aparentemente en el exterior de la célula (Fig. 2). Cuando se analiza este patrón de interacción es posible notar que al colocar en posición focal las bacterias, el núcleo aparece desenfocado (Fig. 2). Cuando se sobreponen las fotografías tomadas en ambos canales (azul para DAPI y verde para GFP) se puede notar como en apariencia las bacterias se localizan sobre la superficie celular y no alrededor del núcleo (Fig. 2) como es usual observar en *B. abortus* replicándose intracelularmente. Este fenotipo está ampliamente extendido encontrándose más de un 70% de las células interaccionando con *B. canis* de esta forma. Al contrario, este fenotipo no se encuentra presente en células infectadas con *B. abortus*.



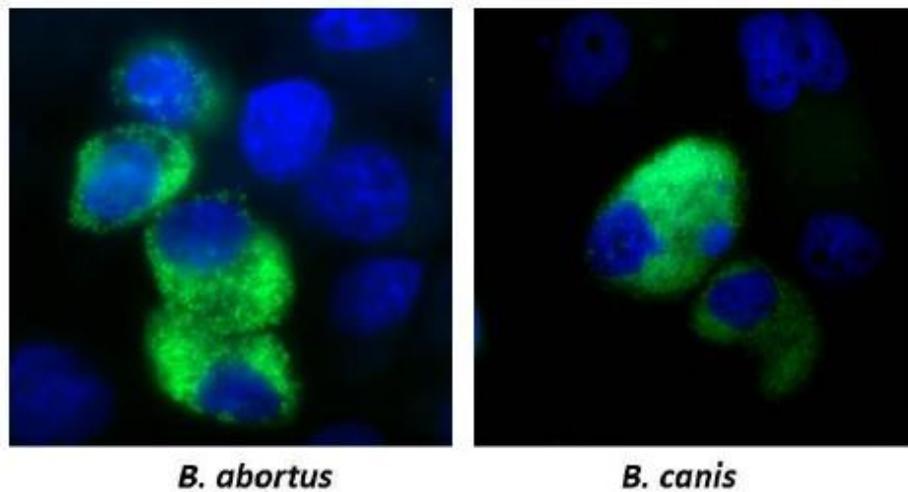
**Figura 2. Fenotipo predominante de interacción de *B. canis* con células epiteliales HeLa.** Monocapas de células HeLa fueron infectadas con *B. canis*-GFP a una MOI de 500. 48 horas después de la infección el ADN fue teñido con DAPI y las células visualizadas mediante microscopía de fluorescencia a una magnificación de 60 X.

Como está bien documentado, *B. abortus* tiene la capacidad de multiplicarse intracelularmente en células no fagocíticas mientras que por el contrario, no existen reportes de multiplicación intracelular de *B. canis*. Con el fin de determinar si esta última tiene la habilidad de replicarse intracelularmente se analizó el fenotipo replicativo mediante inmunofluorescencia. Dicho fenotipo replicativo se refiere a toda aquella célula que contiene bacterias con una alta tasa de multiplicación. El panorama típico de dichas células es la presencia de una gran cantidad de bacterias en todo su citoplasma las cuales se encuentran en el mismo plano focal que el núcleo. Cuando se infectan células HeLa con *B. abortus* GFP, estas células se encuentran fácilmente tal y como ha sido reportado previamente (Fig. 3). Al examinar con detenimiento una monocapa infectada con *B. canis* también es posible encontrar células con fenotipo replicativo (Fig. 3) a pesar de que el principal fenotipo encontrado es el patrón descrito anteriormente. En el caso de *B. abortus* es común encontrar células en parejas con fenotipo replicativo rodeadas por una gran cantidad de células no infectadas (Fig. 4). La razón de este fenómeno se desconoce pero se ha especulado que se debe a la división de una

célula originalmente infectada. En el caso de la infección con *B. canis*, fue posible también encontrar este fenómeno reforzando el paralelismo y semejanza entre el ciclo celular de *B. abortus* y el de *B. canis* (Fig. 4).

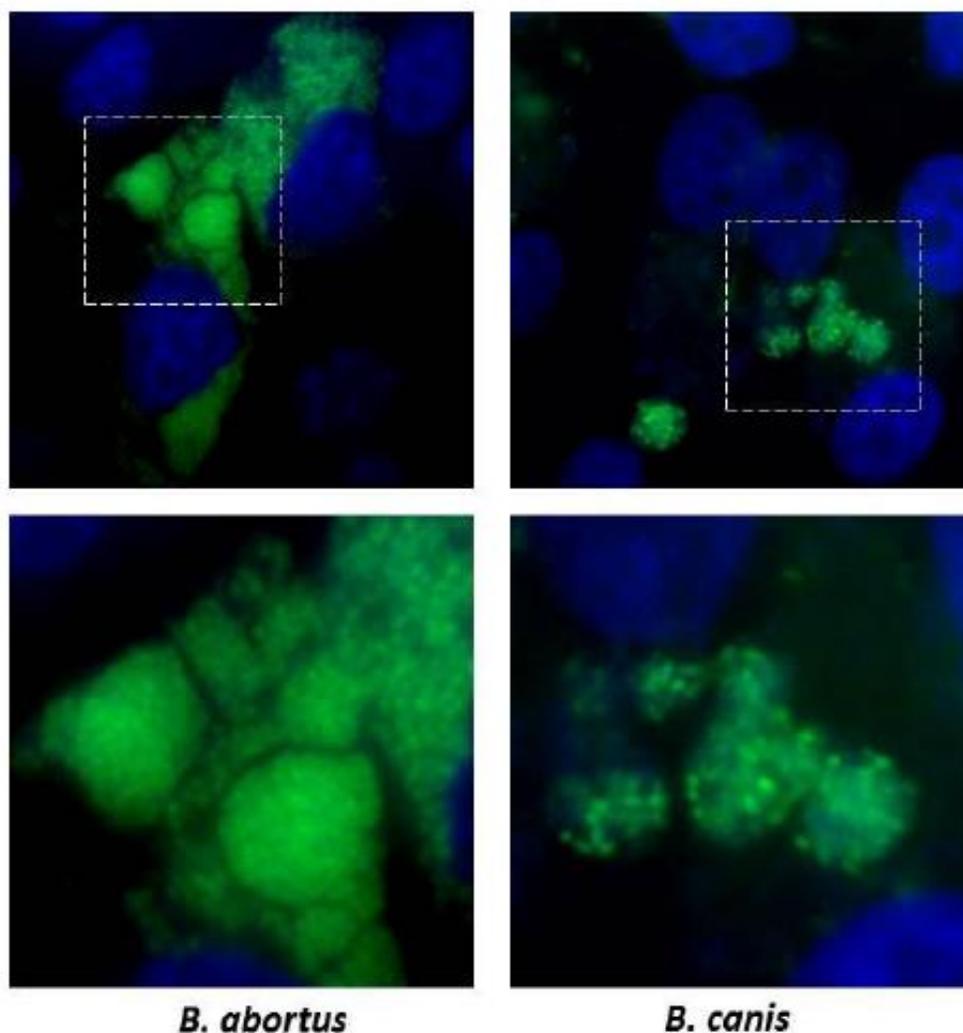


**Figura 3. *B. canis* presenta un fenotipo replicativo similar al observado en *B. abortus*.** Monocapas de células HeLa fueron infectadas con *B. canis*-GFP o *B. abortus*-GFP a una MOI de 500. 48 horas después de la infección el ADN fue teñido con DAPI y las células visualizadas mediante microscopía de fluorescencia a una magnificación de 100 X.



**Figura 4. Presentación en parejas de células con fenotipo replicativo de *B. canis*.** Monocapas de células HeLa fueron infectadas con *B. canis*-GFP O *B. abortus*-GFP a una MOI de 500. 48 horas después de la infección el ADN fue teñido con DAPI y las células visualizadas mediante microscopía de fluorescencia a una magnificación de 100 X.

Está documentado que el ciclo intracelular de *B. abortus* culmina a tiempos tardíos de la infección con el paso de las bacterias del retículo endoplásmico a autofagosomas rodeados por la proteína LAMP (Starr *et al.*, 2012). Dicha parte del ciclo se manifiesta mediante la aparición de grupos de bacterias tal y como se pudo observar en este trabajo (Fig. 5). En el caso de *B. canis*, fue posible observar la presencia de dichos grumos a tiempos tardíos de la infección lo cual indica que sigue el mismo viaje intracelular que *B. abortus* (Fig. 5).



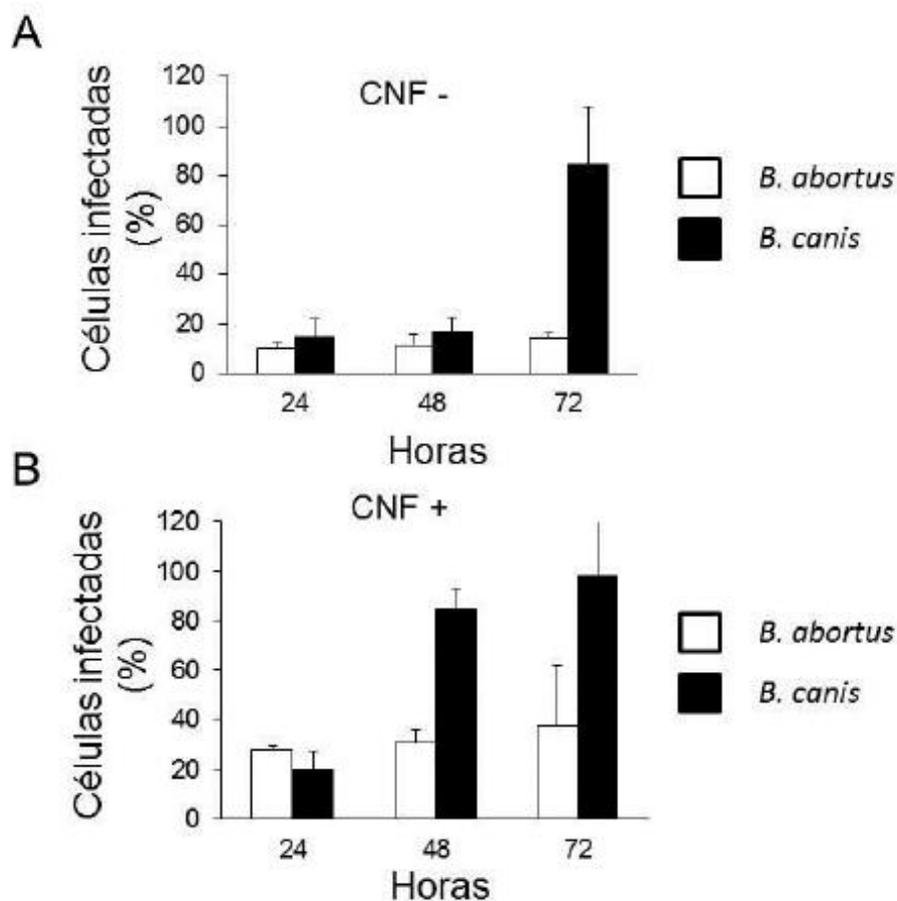
**Figura 5. *B. canis* presenta grumos de bacterias a tiempos tardíos de infección.** Monocapas de células HeLa fueron infectadas con *B. canis*-GFP o *B. abortus*-GFP a una MOI de 500. 72 horas después de la infección el ADN fue teñido con DAPI y las células visualizadas mediante microscopía de fluorescencia a una magnificación de 100 X. Los recuadros de abajo corresponden a la región marcada en el cuadro punteado.

### **Cuantificación de los diferentes fenotipos en células HeLa**

Para comprender de mejor manera el tráfico intracelular de *B. canis* y poder compararlo con el de *B. abortus*, se cuantificó cada uno de los fenotipos descritos anteriormente a diferentes tiempos en presencia o ausencia de la toxina CNF. Una vez cuantificados, se calculó el porcentaje de células infectadas (células infectadas/células totales x 100), porcentaje de replicación (células con fenotipo

replicativo/células infectadas x 100) y porcentaje de fenotipo en grumos (células con fenotipo en grumos/células en replicación x 100). La desviación estándar de los datos se obtuvo a partir de tres experimentos independientes.

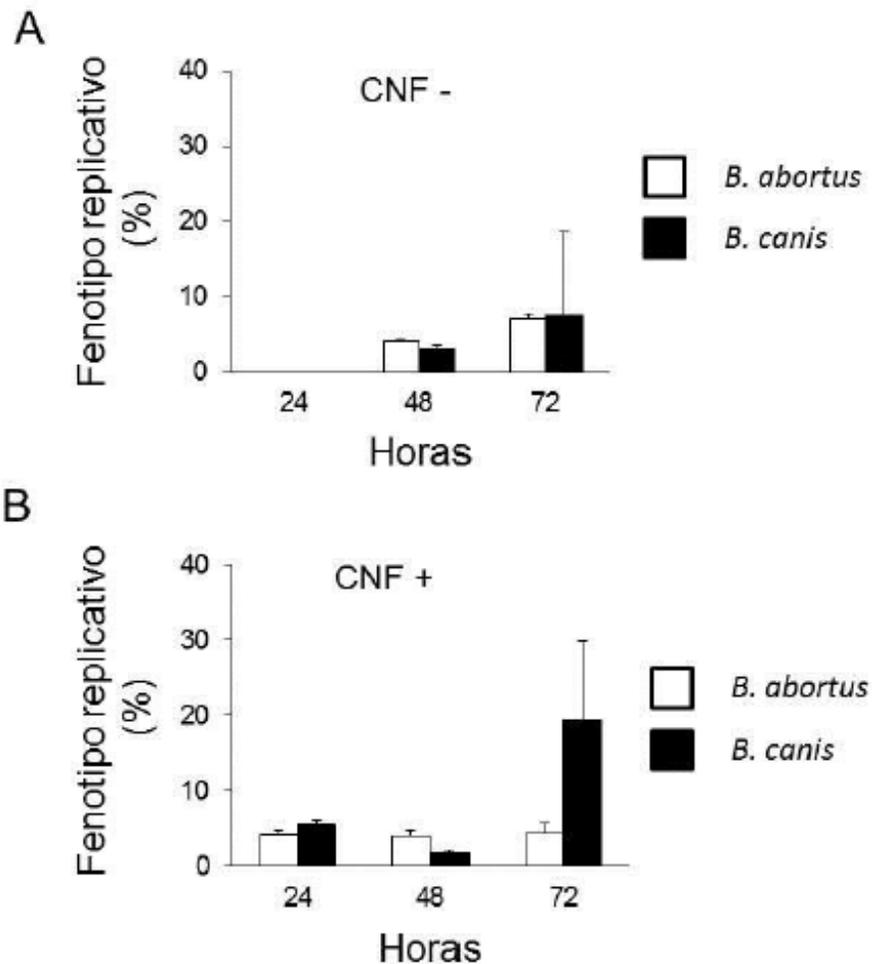
*B. canis* y *B. abortus* muestran un porcentaje relativamente bajo de células infectadas. Dicho porcentaje es similar entre ambas especies a excepción de las 72 horas cuando hay un abrupto aumento en el porcentaje de células infectadas con *B. canis* (Fig. 6). Los porcentajes de células infectadas se incrementan significativamente cuando las células son pre intoxicadas con CNF (Fig. 6B). En estas condiciones *B. canis* mostró porcentajes de infección mayores que *B. abortus*, con una diferencia marcada particularmente a tiempos tardíos de infección con y sin CNF (Fig. 6A y 6B).



**Figura 6. Porcentaje de infección de *B. abortus* y *B. canis*.** Monocapas de células HeLa fueron infectadas con *B. abortus* y *B. canis*, en ausencia (A) y presencia (B) de la toxina CNF, a una MOI de 500. Después de la infección las bacterias extracelulares fueron removidas mediante la adición de gentamicina. A los tiempos indicados las células fueron fijadas y procesadas por inmunofluorescencia. Se tomó como célula infectada aquella que tuviera una o más bacterias en su interior para realizar los cálculos correspondientes. La desviación estándar de los datos se obtuvo a partir de tres experimentos independientes.

En cuanto al fenotipo replicativo, *B. canis* y *B. abortus* presentan una dinámica similar en ausencia de CNF (Fig. 7A), obteniendo los porcentajes más altos en ambas bacterias a tiempos más tardíos de infección. Al tratar la monocapa celular con CNF previo a la infección el panorama varía, *B. abortus* mantiene porcentajes de replicación constantes a lo largo del tiempo, pero *B. canis* muestra un patrón similar a *B. abortus* a las 24 horas de infección, luego un pequeño descenso a las

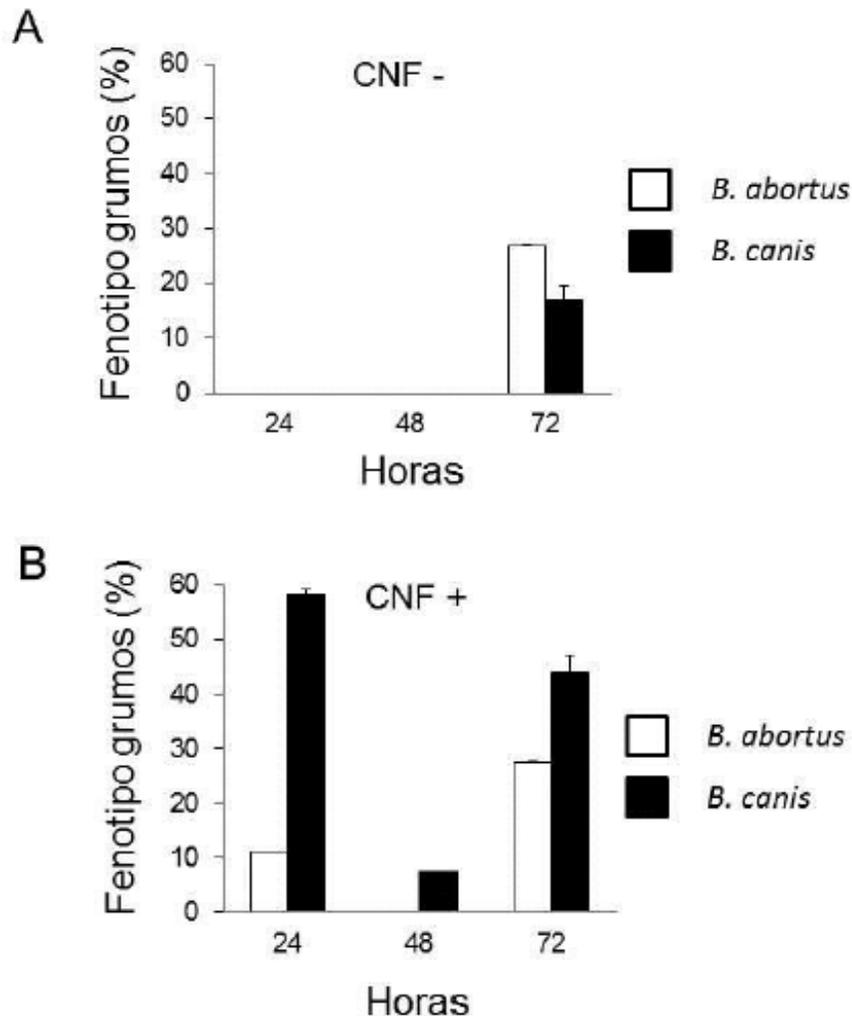
48 horas de infección, y un incremento notable a las 72 horas de infección (Fig. 7B).



**Figura 7. Porcentaje de células con fenotipo replicativo infectadas con *B. abortus* y *B. canis*.** Monocapas de células HeLa fueron infectadas con *B. abortus* y *B. canis*, en ausencia (A) y presencia (B) de la toxina CNF, a una MOI de 500. Después de la infección las bacterias extracelulares fueron removidas mediante la adición de gentamicina. A los tiempos indicados las células fueron fijadas y procesadas por inmunofluorescencia. Los cálculos se realizaron cuantificando células con fenotipo replicativo/células infectadas x 100. La desviación estándar de los datos se obtuvo a partir de tres experimentos independientes.

En cuanto a la aparición del fenotipo en grumos, en ausencia de pre tratamiento con toxina CNF, *B. canis* y *B. abortus* presentan un comportamiento similar,

siendo a tiempos tardíos de infección (72 horas) que este fenotipo se manifiesta en la monocapa celular (Fig. 8A). Esta observación es compatible con lo reportado anteriormente para esta fase del ciclo celular. La monocapa tratada con CNF presenta un panorama distinto (Fig. 8B). En este caso, *B. canis* presenta porcentajes notablemente mayores que *B. abortus* en los tres tiempos analizados. Adicionalmente, a las 24 horas de infección *B. canis* presenta un porcentaje extremadamente alto de células con bacterias en grumos, luego un abrupto descenso a las 48 horas de infección seguido de un incremento a las 72 horas de infección *B. abortus* manifiesta una dinámica similar, con la diferencia de que a las 72 horas de infección se identifica el porcentaje más alto de células con fenotipo en grumos (Fig. 8B).

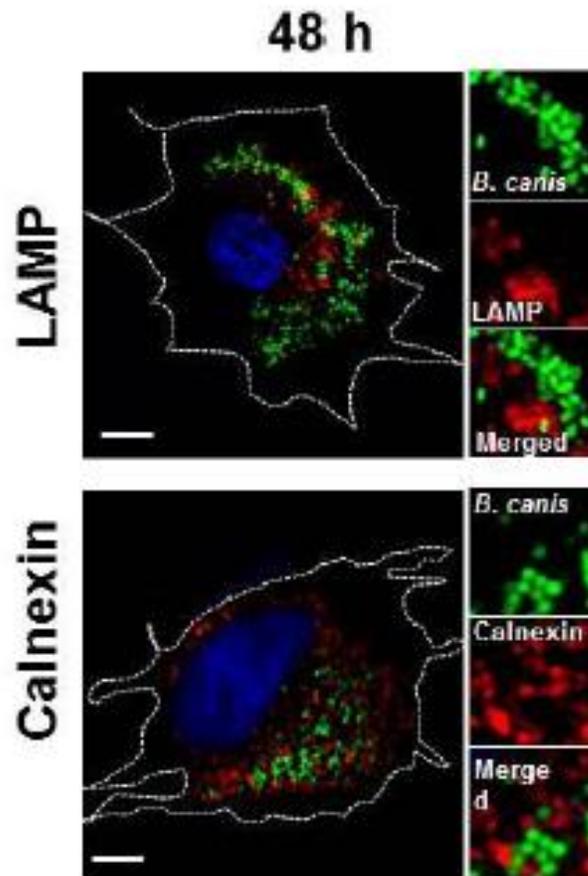


**Figura 8. Porcentaje de células con fenotipo en grumos infectadas con *B. abortus* y *B. canis*.**

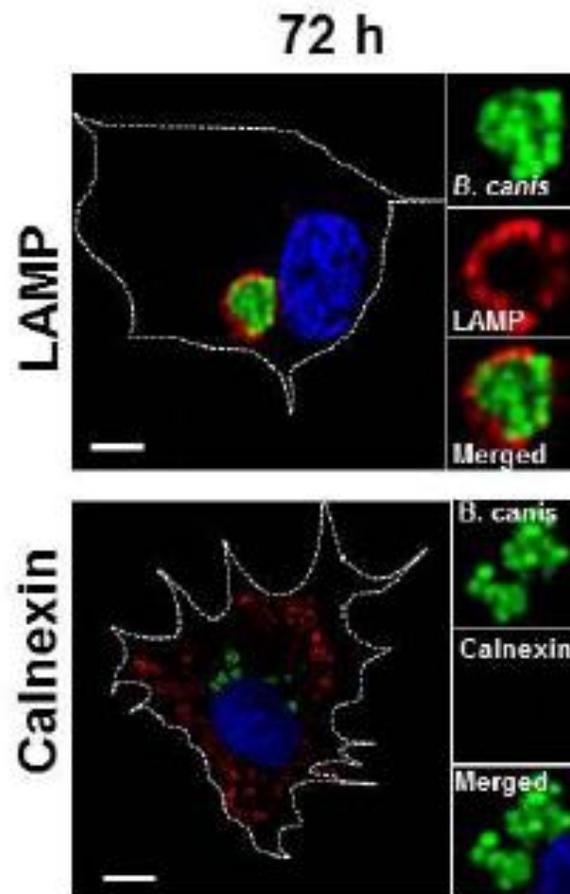
Monocapas de células HeLa fueron infectadas con *B. abortus* y *B. canis*, en ausencia (A) y presencia (B) de la toxina CNF, a una MOI de 500. Después de la infección las bacterias extracelulares fueron removidas mediante la adición de gentamicina. A los tiempos indicados las células fueron fijadas y procesadas por inmunofluorescencia. Los cálculos se realizaron cuantificando células con fenotipo en grumos/células con fenotipo en replicación x 100. La desviación estándar de los datos se obtuvo a partir de tres experimentos independientes.

**Co-localización bacteriana en compartimentos celulares.**

Con el fin de determinar la vía de tránsito intracelular de *B. canis* y compararla con *B. abortus* se utilizaron anticuerpos para marcar las proteínas calnexina y LAMP, como marcadores de retículo endoplásmico y autofagosomas respectivamente. A las 48 horas post-infección, se observa que *B. canis* no co-localiza con el marcador LAMP, pero sí con calnexina indicando que a ese tiempo se encuentra localizada en retículo endoplásmico (Fig. 9). A las 72 horas el patrón se invierte, y *B. canis* co-localiza con LAMP, mas no con calnexina indicando la presencia en autofagosomas (Fig. 10).



**Figura 9. *B. canis* se encuentra en Retículo Endoplásmico a 48 horas de infección.** Monocapas de células HeLa fueron infectadas con *B. canis*-GFP a una MOI de 500. 48 horas post infección las células fueron fijadas y teñidas con anticuerpos contra LAMP o calnexina. Las células fueron visualizadas mediante microscopía confocal.



**Figura 10. *B. canis* se encuentra en autofagosomas rodeados por LAMP a las 72 horas de infección.** Monocapas de células fueron infectadas con *B. canis*-GFP a una MOI de 500. 72 horas post infección las células fueron fijadas y teñidas con anticuerpos contra LAMP o calnexina. Las células fueron visualizadas mediante microscopía confocal.

## Discusión

Actualmente la literatura científica apunta a que *B. canis* es incapaz de replicarse intracelularmente. Se argumenta que a diferencia de especies lisas como *B. abortus*, *B. suis* o *B. melitensis*; *B. canis* es incapaz de establecer un nicho intracelular de replicación mediante la fusión de la BCV con el RER (Detilleux *et al.*, 1990; Rittig *et al.*, 2003). A la hora de comparar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) intracelulares y el crecimiento intracelular de *B. canis*, *B. abortus* y *B. suis*, se observa que *B. canis* es la que posee conteos significativamente inferiores a los de las otras dos especies lisas (Ferrero *et al.*, 2009).

El fenotipo rugoso se ha asociado con baja virulencia e incapacidad para sobrevivir y replicarse dentro de la célula porque se cree que el antígeno O del LPS juega un papel determinante para evitar la vía lisosomal (Allen *et al.*, 1998; Porte *et al.*, 2003; Rittig *et al.*, 2003). Las BCV que contienen *B. canis* se fusionan rápidamente con lisosomas, por lo cual no se multiplican. Lo mismo ocurre con mutantes rugosas de cepas lisas que no logran replicarse intracelularmente de forma adecuada (Porte *et al.*, 2003). No obstante, estudios han observado mediante microscopía electrónica que la especie rugosa *B. ovis* es capaz de co-localizar con el RER, lo que permite su replicación; contrario a la co-localización de *B. canis* en fagolisosomas, en donde esta es incapaz de multiplicarse y sobrevivir (Detilleux *et al.*, 1990).

Estudios previos demuestran que las estirpes lisas virulentas de *Brucella* no causan un efecto citopático en las células fagocíticas y epiteliales cuando las infectan y que además, son capaces de interferir en la apoptosis de las células hospederas y favorecer así su multiplicación y supervivencia. En contraste, las cepas mutantes rugosas obtenidas a partir de *B. abortus* y *B. melitensis*, se replican poco o no se replican del todo y causan la muerte celular, lo que provoca que las bacterias sean liberadas tempranamente al medio extracelular y sean destruidas por diferentes mecanismos bactericidas (Ferrero *et al.*, 2009).

*B. canis*, sin embargo es un patógeno primario en perros en los cuales produce un cuadro clínico similar al que *B. abortus* produce en vacas o *B. suis* en cerdos, incluso puede producir también brucelosis en seres humanos (Ugalde *et al.*, 2000), por lo cual el presente estudio pretende determinar si en efecto *B. canis* no se multiplica intracelularmente o si por el contrario lo hace y en condiciones similares o diferentes especies de tipo liso de *Brucella*.

Estudios en paralelo de nuestro grupo de investigación habían determinado que modulando adecuadamente las condiciones del crecimiento del inóculo se podrían lograr recuentos replicativos de *B. canis* intracelularmente. Utilizando este método se procedió a analizar el fenotipo replicativo mediante microscopía. Se logró determinar que la mayoría de las *B. canis* presentes en la monocapa no parecen estar replicándose.

La estandarización previa de la infección y preparación del inóculo de *B. canis* juegan un papel determinante en una replicación bacteriana exitosa. En este trabajo se utilizaron condiciones de crecimiento de *B. canis* un tanto diferentes a los utilizados en otros estudios previamente publicados. Estas variaciones permitieron detectar la replicación de dicha bacteria y caracterizar de este modo el tránsito de *B. canis* en condiciones replicativas. Requerimientos como niveles de aireación baja potencian el estado infectivo, parece ser que esta variable está relacionada con el sistema regulador del quorum sensing VjbR (Uzureau *et al.*, 2007). Incluso la densidad bacteriana determinada por el nivel de agitación y tipo de recipiente utilizado para el crecimiento del inóculo, influyen en la capacidad infectiva. Estas variables en el protocolo de infección pueden explicar las diferencias observadas entre los resultados obtenidos y los reportados por otros autores.

Realizar un análisis con detenimiento permitió encontrar fenotipos compatibles con replicación intracelular. Por un lado se encontraron células repletas de bacterias en plano focal con el núcleo, se encontraron células infectadas en parejas y se encontraron células con bacterias en grumos.

Debido a que el presente trabajo pretende comprender y contrastar el tráfico intracelular de *B. canis* con respecto al de *B. abortus*, se monitorearon mediante microscopía de fluorescencia los fenotipos de infección. Para ambas bacterias, en etapas tempranas de infección el fenotipo de células infectadas corresponde a la fase no proliferativa endosomal. Conforme avanza el tiempo de infección se observa la aparición de los fenotipos replicativos que corresponden a la etapa proliferativa en donde la BCV interactúa con el RE, esta interacción permite evadir la unión de la BCV con los lisosomas y propiciar de así un nicho idóneo para la multiplicación bacteriana. El ciclo culmina con la formación de grumos bacterianos, que corresponden a las BCV con características autofágicas; este proceso es necesario para poder completar el ciclo de vida intracelular y promover la propagación de *Brucella* de célula a célula (Choy y Roy, 2013), contrario a las conclusiones de estudios anteriores en los que el tráfico intracelular de *B. canis* se restringe a los fagolisosomas, y no realiza la subsecuente localización en el RE y replicación, a diferencia de otras especies como *B. abortus* y *B. melitensis* (Detiellieux *et al.*, 1990; Rittig *et al.*, 2003).

Estos mismos fenotipos son conocidos y encontrados en *B. abortus*. Cuando se cuantifican estos fenotipos en monocapas infectadas se encuentran muy pocas diferencias entre *B. abortus* y *B. canis*. Esta cuantificación se realizó también en las células tratadas con CNF. Este tratamiento induce un comportamiento fagocítico en células epiteliales y permite dissociar el evento de entrada del evento de multiplicación intracelular. En términos generales la toxina CNF incrementó significativamente la capacidad fagocítica de las células gracias a su capacidad para modificar la actina del citoesqueleto gracias a la acción de las proteínas Rho y GTPasas. El aumento en los porcentajes de los fenotipos infectivos tras el uso de CNF evidenció el estímulo en la fagocitosis (Fabbri *et al.*, 2010).

Bajo estas condiciones también *B. canis* se comportó igual que *B. abortus*. Esto habla de potenciales similares de replicación intracelular. Se vieron fenotipos interesantes en células intoxicadas con CNF. Por ejemplo, los grumos que aparecen al final de la infección en células no tratadas, se encuentran en grandes

cantidades en células intoxicadas con CNF. Esto puede indicar que CNF altera temporalmente los compartimientos por los que transita *Brucella*. Interesantemente esta alteración se presentó para *B. canis* y *B. abortus*, lo que refuerza la idea de que ambos transitan por la misma vía intracelular.

Tanto para *B. canis* como para *B. abortus*, las células multinucleadas tratadas con la toxina CNF, mostraron infección y replicación. En células infectadas por *B. abortus* se observó un patrón interesante en el fenotipo replicativo concordante con lo reportado en literatura; la mayoría de éstas células no se encontraron de forma individual, si no en parejas o tríos, lo que sugiere que provienen de una célula que se dividió y dio origen a las mismas. Esto indica que los niveles altos de replicación de *Brucella* dentro de la célula eucariota no afecta la habilidad de esta para replicarse (Chaves-Olarte *et al.*, 2002).

Se ha descrito que bacterias lisas como *B. abortus* muestran un alto grado de virulencia, adjudicado en gran parte a su alta capacidad infectiva; mientras que *B. canis* posee poca capacidad infectiva (Detiellieux *et al.*, 1990; Rittig *et al.*, 2003). Al analizar los porcentajes de células infectadas, con y sin CNF, se observa que *B. abortus* mantiene un porcentaje constante, mientras que *B. canis* aumenta el número de células infectadas de forma significativa a través del tiempo. Esto indica que *B. canis* poseen una mayor capacidad infectiva que *B. abortus*, por lo que es necesario realizar más estudios para comprender adecuadamente la virulencia de *B. canis*. Al tomar una cepa lisa silvestre de *B. abortus* y convertirla en una cepa mutante que carece de O-polisacárido, ésta se comporta como una cepa rugosa, y no puede concluir adecuadamente el ciclo infectivo dentro de la célula (Porte *et al.*, 2003). Partiendo de este análisis, *B. canis* es una bacteria rugosa que se comporta como una bacteria lisa dentro de la célula, porque logra alcanzar altos porcentajes de infección y replicación.

La adhesión a la célula es requerida para la internalización e invasión. Se han identificado estructuras de adhesión en *Brucella* como la proteína de superficie SP41 que interactúa con la célula eucariota. Al realizar una delección de la isla genómica que codifica por dicha proteína, disminuye significativamente el número

de bacterias infectantes tanto en células HeLa como en macrófagos (Van Der Henst *et al.*, 2013). Estudios realizados indican que el fenotipo del LPS que posea *Brucella* influye en la unión e internalización de la misma en monocitos humanos. En términos generales, las bacterias rugosas se internalizan en números mayores que las bacterias lisas. Al comparar la internalización de una cepa lisa de *B. melitensis* contra una mutante rugosa esta diferencia se evidencia. Se puede especular que la ausencia de la cadena-O enmascara ligandos del core de oligosacáridos o permite interacciones hidrofóbicas, y favorecer así la internalización de bacterias con LPS de fenotipo rugoso (Ritting *et al.*, 2003).

Para el análisis de las propiedades de adherencia e invasión, *B. canis* y una cepa mutante rugosa de *B. abortus* muestran una tendencia más eficiente en estos dos parámetros que las cepas naturalmente lisas *B. abortus* y *B. suis* (Allen *et al.*, 1998; Ferrero *et al.*, 2009). Sin embargo, existen reportes en los que se menciona que el hecho de que un mutante rugoso carezca del antígeno O no significa que va a perder la habilidad para replicarse dentro de la célula, porque al analizar el comportamiento de un mutante rugoso de *B. abortus* que carece de antígeno O, éste es capaz de multiplicarse en células HeLa, indicando que el LPS completo no es esencial para la invasión o la replicación intracelular (Ugalde *et al.*, 2000).

Siguiendo este parámetro, se podría explicar la diferencia en los porcentajes de células infectas, tanto con CNF como sin CNF. *B. canis* es una bacteria rugosa que muestra mayor adherencia a la célula y por ende una mayor internalización, a diferencia de *B. abortus* que es una bacteria lisa. Incluso, al observar mediante microscopía de fluorescencia el fondo del cubreobjetos sobre el cual creció la monocapa de células HeLa, *B. canis* se adhiere al mismo de forma notoria, abundante y con un patrón desordenado, mientras que *B. abortus* se adhiere en menor cantidad y con un patrón más homogéneo.

El paso de *B. canis* por los diferentes compartimentos celulares se evidencia mediante la co-localización de la bacteria con marcadores de membrana como LAMP y calnexina. Al analizar la infección a las 48 horas, el comportamiento predominante de *B. canis* es que ésta no co-localiza con LAMP, porque dicho

marcador se expresa en la membrana de organelas como endosomas tempranos o en autofagosomas, pero sí se observa co-localización con calnexina, que se expresa en la BCV una vez que interactúa con el RE. A las 72 horas de infección, el comportamiento general y predominante de *B. canis* es su no co-localización con LAMP, pero sí con calnexina. Este comportamiento ya ha sido observado y caracterizado previamente en *B. abortus* (Brumell, 2012; Kim *et al.*, 2012).

## Conclusiones

Es de suma importancia recalcar que las diversas investigaciones que se han realizado con *B. canis*, aseveran que dicho microorganismo es incapaz de llevar a cabo de forma exitosa el proceso de la replicación debido a su condición de cepa rugosa (Detielleux *et al.*, 1990; Rittig *et al.*, 2003), contrario a los hallazgos realizados en el presente estudio que validan la hipótesis en la que se plantea que *B. canis* no es solo capaz de replicarse dentro de células epiteliales, sino que además su tráfico intracelular es similar al de *B. abortus* en tiempos tempranos y tardíos de infección.

Cuando se analiza la co-localización de los fenotipos replicativos con marcadores de RE y autofagosomas se determina que *B. canis* pasa primero por el RE y luego forma grumos rodeados de LAMP. Este patrón es el mismo observado en *B. abortus*. Por lo tanto se concluye que *B. canis* sí se replica intracelularmente, sigue un ciclo de vida intracelular muy parecido al de *B. abortus*. Es importante controlar muy bien el inóculo y su crecimiento para poder realizar estudios intracelulares de *B. canis*. En este estudio se cuestiona el papel del antígeno O en la vida intracelular, puesto que diversos reportes indican que es esencial para la multiplicación intracelular de la bacteria, pero no parece ser el caso.

## Referencias bibliográficas

- 1) **Allen C a., Adams LG, Ficht T a.** 1998. Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. *Infect. Immun.* **66**:1008–1016.
- 2) **Alves AJS, Rocha F, Amaku M, Ferreira F, Telles EO, Filho JHHG.** 2014. Economic analysis of vaccination to control bovine brucellosis in the States of Sao Paulo and Mato Grosso, Brazil. *Prev. Vet. Med.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.12.010>.
- 3) **Alshaalan A M, Alalola S A, Almuneef M A, Albanyan E A, Balkhy H H, AlShahrani D A, AlJohani S.** 2014. Brucellosis in children: Prevention, diagnosis and management guidelines for general pediatricians endorsed by the Saudi Pediatric Infectious Diseases Society (SPIDS). *International Journal of Pediatrics and Adolescent Medicine* **1**: 40-46.
- 4) **Anderson TD, Cheville NF.** 1986. Ultrastructural morphometric analysis of *Brucella abortus*-infected trophoblasts in experimental placentitis. Bacterial replication occurs in rough endoplasmic reticulum. *Am. J. Pathol.* **124**:226–237.
- 5) **Aréstegui M B, Gualtieri C, Domínguez J, Scharovsky G.** 2001. El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico. *Vet. Méx.*, **32**: 131-139
- 6) **Baldwin CL, Goenka R.** 2006. Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: Does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? *Crit Rev Immunol.* **26**: 407-42.
- 7) **Barkha S, Dharmendra Kumar S, Dhirendra Kumar S.** 2011. Immunochemical characterization of antigens of *Brucella canis* and their use in seroprevalence study of canine brucellosis. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **4**:857–861.
- 8) **Brumell JH.** 2012. *Brucella* “hitches a ride” with autophagy. *Cell Host Microbe* **11**:2–4.

- 9) **Carmichael LE, Joubert JC, Jones L.** 1989. Characterization of *Brucella canis* proteina antigens and polypeptide antibody responses of infected dogs. *Veterinary Microbiology*, **19**: 373-387.
- 10) **Caron E, Liautard JP, Köhler S.** 1994. Differentiated U937 cells exhibit increased bactericidal activity upon LPS activation and discriminate between virulent and avirulent *Listeria* and *Brucella* species. *J. Leukoc. Biol.* **56**:174–181.
- 11) **Carvalho-Neta A V, Mol JPS, Xavier MN, Paixão T a., Lage AP, Santos RL.** 2010. Pathogenesis of bovine brucellosis. *Vet. J.* **184**:146–155.
- 12) **Cassataro J, Pasquevich K a.** 2006. Nueva vacuna contra la brucelosis. *Acta Bioquím Clín Latinoam* **40**:83–88.
- 13) **Celli J.** 2006. Surviving inside a macrophage: The many ways of *Brucella*. *Res. Microbiol.* **157**:93–98.
- 14) **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. *J. Exp. Med.* **198**:545–556.
- 15) **Celli J, Gorvel JP.** 2004. Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**:93–97.
- 16) **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. *Cell. Microbiol.* **4**:663-675.
- 17) **Choy A, Roy CR.** 2013. Autophagy and bacterial infection: An evolving arms race. *Trends Microbiol.* **21**:451–456.
- 18) **Comerci DJ, Ugalde R a.** 2002. Factores de virulencia en *Brucella abortus*: Caracterización del sistema VirB y su rol en la colonización de la célula huésped. Desarrollo de un sistema de expresión de proteínas recombinantes en *Brucella abortus* S-19. Tesis para optar al título Dr. en Biol. Mol. y Biotecnol. la Univ. Nac. Gen. San Martín.
- 19) **Corbel MJ.** 1997. Brucellosis: An Overview. *Emerg. Infect. Dis.* **3**:213–221.

- 20) Cruz-Ramos H, Glaser P, Wray LV, Fisher SH.** 1997. The Bacillus subtilis ureABC operon. *J. Bacteriol.* **179**: 3371–3373.
- 21) Delpino MV, Fossati C a., Baldi PC.** 2009. Proinflammatory response of human osteoblastic cell lines and Osteoblast-monocyte interaction upon infection with Brucella spp. *Infect. Immun.* **77**:984–995.
- 22) Detilleux PG, Deyoe B L y Cheville N F.** 1990. Entry and intracellular localization of Brucella spp. In Vero cells: fluorescence and electron microscopy. *Vet Pathol* **27**: 317-328.
- 23) Doganay M, Aygen B.** 2003. Brucellosis: an overview. *Int J Infect Dis* **7**:173–182.
- 24) Douglas JT, Rosenberg EY, Nikaido H, Verstreat DR, Winter AJ.** 1984. Porins of Brucella species. *Infect Immun* **44**(1):16-21.
- 25) Dirección de Epidemiología MDSDLN.** 2013. Enfermedades infecciosas: Brucelosis Guía para el equipo de salud 55.
- 26) Fabbri A, Travaglione S, Fiorentini C.** 2010. Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1): Toxin biology, in Vivo applications and therapeutic potential. *Toxins (Basel).* **2**:283–296.
- 27) Fensterbank R.** 1986. Brucellosis bovina, ovina y caprina: diagnóstico, control y vacunación. *Rev. Sci. Tech.* **5**(3): 619-633.
- 28) Ferrero MC, Fossati C a., Baldi PC.** 2009. Smooth Brucella strains invade and replicate in human lung epithelial cells without inducing cell death. *Microbes Infect.* **11**:476–483.
- 29) Fox KF, Fox A, Nagpal M, Steinberg P, Heroux K.** 1998. Identification of Brucella by Ribosomal-Spacer-Region PCR and differentiation of Brucella canis from other Brucella spp. Pathogenic for humans by carbohydrate profiles. *Journal of Clinical Microbiology,* **36**: 3217-3222.
- 30) Godfroid J, Scholz HC, Barbier T, Nicolas C, Wattiau P, Fretin D, Whatmore a. M, Cloeckert a., Blasco JM, Moriyon I, Saegerman C, Muma JB, Al Dahouk S, Neubauer H, Letesson JJ.** 2011. Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. *Prev. Vet. Med.* **102**:118–131.

- 31) **Gorvel JP, Moreno E.** 2002. Brucella intracellular life: From invasion to intracellular replication. *Vet. Microbiol.* **90**:281–297.
- 32) **Guzman-Verri C, Manterola L, Sola-Landa A, Parra A, Cloeckert A, Garin J, Gorvel JP, Moriyon I, Moreno E, Lopez-Goni I.** 2002. The two-component system BvrR/BvrS essential for Brucella abortus virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(19):12375-12380.
- 33) **Gyles CL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO.** 2010. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Wiley-Blackwell, Iowa, USA. 1<sup>st</sup> ed, 429-438.
- 34) **Hagan WA, Bruner D, Timoney J.** 1988. Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals: with reference to etiology, epizootiology, pathogenesis, immunity, diagnosis, and antimicrobial susceptibility. Ithaca: Comstock Pub. Associates. 8<sup>th</sup> ed. pp. 135-138
- 35) **He Y.** 2012. Analyses of Brucella pathogenesis, host immunity, and vaccine targets using systems biology and bioinformatics. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **2**: 1-17.
- 36) **Jiménez de Bagues M-P, Dudal S, Dornand J, Gross A.** 2005. Cellular bioterrorism: How Brucella corrupts macrophage physiology to promote invasion and proliferation. *Clin. Immunol.* **114**:227–238.
- 37) **Jumas-Bilak, E., S. Michaux-Charachon, G. Bourg, D. O'Callaghan, and M. Ramuz.** 1998. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. *Mol. Microbiol.* **27**:99-106.
- 38) **Kang S, Lee S, Kim J, Lee K, Kim J, Lee H, Sung S, Heo Y, Chan S, Her M.** 2014. Comparative Immunology , Microbiology and Infectious Diseases A new Brucella canis species-specific PCR assay for the diagnosis of canine brucellosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **37**:237–241.
- 39) **Kim DH, Lim JJ, Lee JJ, Kim DG, Lee HJ, Min W, Kim KD, Chang HH, Rhee MH, Watarai M, Kim S.** 2012. Identification of genes contributing to the intracellular replication of Brucella abortus within HeLa and RAW 264.7 cells. *Vet. Microbiol.* **158**:322–328.

- 40) Kohler S, Foulongne V, Ouahrani-Bettache S, Bourg G, Teyssier J, Ramuz M, Liutard JP.** 2002. The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **99**: 15711–15716.
- 41) Larsson MMMA, da Costa EO.** 1980. Isolation of *Brucella canis*. International Journal of zoonoses. **7**: 125-130.
- 42) Levine B, Mizushima N, Virgin HW.** 2011. Autophagy in immunity and inflammation. Nature **469**:323–335.
- 43) Marzetti S, Carranza C, Roncallo M, Escobar GI, Lucero NE.** 2013. Recent trends in human *Brucella canis* infection. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. **36**:55–61.
- 44) Meyer KF, Shaw EB.** 1971. A comparison of the morphologic, cultural and biochemical characteristics of *B. abortus* and *B. melitensis*: Studies on the genus *Brucella*. Médecine Mal. Infect. **1**:109–112.
- 45) Michaux-Charachon, S., G. Bourg, E. Jumas-Bilak, P. Guigue-Talet, A. Allardet-Servent, D. O’Callaghan, and M. Ramuz.** 1997. Genome structure and phylogeny in the genus of *Brucella*. *J. Bacteriol.* **179**:3244-3249.
- 46) Mizushima N.** 2007. Autophagy: Process and function. Genes Dev. **21**:2861–2873.
- 47) Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Wolters J, Busch M, Mayer H.** 1990. *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. J Bacteriol. **172**(7):3569-3576.
- 48) Moreno E.** 2002. Brucellosis in Central America. Veterinary Microbiology, **90**: 31-38.
- 49) Nicoletti P.** 1989. Relationship between animal and human disease. Brucellosis: Clinical and Laboratory aspects. CRC Press. 41-51
- 50) Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos E V.** 2006. The new global map of human brucellosis. Lancet Infect. Dis. **6**:91–99.

- 51) Paulsen IT, Seshadri R, Nelson KE, Eisen JA, Heidelberg JF, Read TD.** 2002. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. Proc Natl Acad Sci U.S.A. **99**:13148–53.
- 52) Pizarro-Cerdá J, Méresse S, Parton RG, Van Der Goot G, Sola-Landa A, Lopez-Goñi I, Moreno E, Gorvel JP.** 1998. Brucella abortus transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. Infect. Immun. **66**:5711–5724.
- 53) Plüddemann A, Gordon S.** 2010. Chapter 68. Biochemistry and Functions of Monocytes and Macrophages. In Lichtman M.A., Kipps T.J., Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal J.T. (Eds), *Williams Hematology, 8<sup>th</sup>*. Retrieved January 28, 2015 from <http://accessmedicine.mhmedical.com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr:2048/content.aspx?bookid=358&Sectionid=39835888>.
- 54) Porte F, Naroeni A, Ouahrani-bettache S, Liautard J.** 2003. Role of the Society **71**:1481–1490.
- 55) Richard JF, Petit L, Gibert M, Marvaur JC, Bouchaud C, Popoff M.** 1999. Bacterial toxins modifying the actin cytoskeleton. Int. Microbiol. **2**:185–194.
- 56) Rittig MG, Kaufmann A, Robins A, Shaw B, Sprenger H, Gemsa D, Foulongne V, Rouot B, Dornand J.** 2003. Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of Brucella induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes. J. Leukoc. Biol. **74**:1045–1055.
- 57) Saldarriaga O a, Rugeles MT.** 2002. Inmunobiología de la infección por Brucella spp: Fundamentos para una estrategia vacunal . Rev Col Cienc Pec **15**:188–197.
- 58) Sánchez-Jiménez MM, Giraldo-Echeverri CA, Olivera-Angel M.** 2013. Infección por Brucella canis en humanos: propuesta de un modelo teórico de infección a través de la ruta oral. Infectio **17**:193–200.

- 59) Sangari F, Agüero J.** 1991. Mutagenesis of *Brucella abortus*: comparative efficiency of three transposon delivery systems. *Microb Pathog.* **11**: 443–446.
- 60) Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N.** 2008. *Brucella*: A pathogen without classic virulence genes. *Vet. Microbiol.* **129**:1–14.
- 61) Soloaga R, Salinas A, Poterallo M, Margari A, Suar B, Lucero N, Almuzaea M.** 2004. Bacteremia por *Brucella canis*: Aislamiento con el sistema Bact-Alert. *Revista Argentina de Microbiología.* **36**: 81-84.
- 62) Starr T, Child R, Wehrly T, Hansen B, Hwang S, López-Otin C, Virgin H, Celli J.** 2012. Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the *Brucella* intracellular cycle. *Cell Host Microbe.* **11**(1):33-45.
- 63) Tollis S, Dart AE, Tzircotis G, Endres RG.** 2010. The zipper mechanism in phagocytosis: energetic requirements and variability in phagocytic cup shape. *BMC Systems Biology.* **4**: 149. doi:10.1186/1752-0509-4-149.
- 64) Ugalde JE, Czibener C, Feldman MF, Ugalde R a.** 2000. Identification and characterization of the *Brucella abortus* phosphoglucomutase gene: Role of lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication. *Infect. Immun.* **68**:5716–5723.
- 65) Uribe JA, Rugeles LMT, Patiño PJ, Montoya GCJ.** 2009. *Inmunología una ciencia activa*. Medellín, Colombia: Editorial Universidad de Antioquia.
- 66) Uzureau S, Godefroid M, Deschamps C, Lemaire J, De Bolle X, Letesson JJ.** 2007. Mutations of the quorum sensing-dependent regulator VjbR lead to drastic surface modifications in *Brucella melitensis*. *J. Bacteriol.* **189**:6035–6047.
- 67) Van Der Henst C, De Barsy M, Zorreguieta A, Letesson JJ, De Bolle X.** 2013. The *Brucella* pathogens are polarized bacteria. *Microbes Infect.* **15**:998–1004.
- 68) Vega-Medellín DM.** 2006. *Brucella abortus*: Antecedentes y avances en aspectos de patogénesis, diagnóstico y control. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C.

- 69) Verger JM, Grimont F, Grimont PAD, Grayon M.** 1985. *Brucella*: a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**:292-295.
- 70) Von Bargaen K, Gorvel JP, Salcedo SP.** 2012. Internal affairs: Investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**:533–562.
- 71) WHO.** Brucellosis in humans and animals.: WHO guidance. Geneva, World Health Organization, 2005. Heymann DL (ed.). Control of communicable diseases manual: an official report of the American Public Health Association. 18<sup>th</sup> ed. Washington DC, World Health Organization/American Public Health Association, 2004.
- 72) Zhen Q, Lu Y, Yuan X, Qiu Y, Xu J, Li W, Ke Y, Yu Y, Huang L, Wang Y, Chen Z.** 2013. Asymptomatic brucellosis infection in humans: Implications for diagnosis and prevention. *Clin. Microbiol. Infect.* **19**:8–10.