

Tesis Doctoral

Factores involucrados en la interacción inicial de *Brucella suis* con el hospedador: rol de los autotransportadores triméricos

Ruiz, Verónica

2014

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ruiz, Verónica. (2014). Factores involucrados en la interacción inicial de *Brucella suis* con el hospedador: rol de los autotransportadores triméricos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Ruiz, Verónica. "Factores involucrados en la interacción inicial de *Brucella suis* con el hospedador: rol de los autotransportadores triméricos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Factores involucrados en la interacción inicial de
Brucella suis con el hospedador: rol de los
autotransportadores triméricos.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área Química Biológica

Verónica Ruiz

Director de Tesis: Dra. Angeles Zorreguieta

Consejero de estudios: Dra. Angeles Zorreguieta

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir, IIBBA-CONICET

Buenos Aires, 2013

Agradecimientos

Tengo la suerte de estar muy agradecida con mucha gente que me ayudó de una u otra forma, a la largo de todo el tiempo que me llevó la tesis. Espero no olvidarme de nadie.

Muchas gracias a Fer y Diana que fueron quienes más me enseñaron en cuanto al trabajo, en particular con *Brucella*. No sé qué hubiera sido de ésta tesis sin las largas charlas con Fer cuando al principio algunas cosas parecían no tener sentido.

Muchas gracias a Gastón, con quien se generaron algunas de las ideas más interesantes/locas. Más allá de lo mucho que me hiciste reír, sos un excelente compañero al cual extrañé muchísimo desde que te fuiste.

Muchas gracias Dani y Pato por todas las charlas y ayuda brindada. Es buenísimo saber que uno cuenta con gente con mucha experiencia que está siempre dispuesta a dar una mano, tanto en lo personal como profesional. Mejor aun cuando uno puede preguntar cualquier cosa, sabiendo que no lo van a tildar de “bobo” por hacer una pregunta básica, que suelen ser las mas importantes. Gracias por la paciencia.

Muchas gracias Caroline por el aguante en todos y cada uno de los cursos que hemos compartido, mas allá del aguante en el labo!

Muchas gracias Valter por ser una compañía incluso cuando estabas en Bélgica, siempre estás “al pie del cañón”. La verdad se te extraña mucho desde que vas y venis. Gracias por saber escuchar sin prejuizar, por esa mente abierta.

Muchas gracias Maga por sumarte al “equipo *Brucella*” a pesar de todas las complicaciones que trae trabajar con esta bacteria. Vino super bien el empuje de alguien nuevo en la línea.

Muchas gracias Rodri por el humor cuando los Westerns no daban. A ponerle pilas que se viene una buena racha de todo (si no nos lo creemos nosotros antes que nadie, quien sino?!).

Muchas gracias Nahuel por todas las charlas compartidas. Lástima que hayas tenido tantos motivos para cargarme los lunes a la mañana!

Muchas gracias Angeles por confiar en mí incluso cuando le proponía ideas medio raras. Muchas gracias por haberme dado la posibilidad de hacer la tesis en tu labo, y haberme dado la confianza que me diste.

Muchas gracias a las chicas del lab 207 y a los chicos del 304 que de a ratos parecíamos ser todos del mismo labo. Gracias Isa, Meli, Sil por la buena onda. Muchas gracias Estela por la buena onda incluso en el cuarto de Micro. Dentro de la gente del 304 si bien les estoy agradecidos a

todos, no quiero dejar de destacar a Gaby y Marie quienes me ayudaron muchísimo sobre todo en los últimos años, discutiendo protocolos y otros temas.

Muchas gracias a las chicas de limpieza y a la gente de mantenimiento. La verdad el poder trabajar en la FIL es un lujo, y en gran parte es gracias al trabajo que todos ellos realizan día a día. Es increíble lo que trabajaron los chicos de mantenimiento en el armado y justamente mantenimiento del cuarto de bioseguridad. Infinitas gracias!!

Muchas gracias a Babu, Gato, Marian, Dani, Juan y Patri por siempre ser un cable a tierra; de esos que de paso te cargan las pilas. Gracias por estar siempre.

Muchas gracias Sabri, Marien, Ivi, Sole, Marian, Mel, Ana por haber seguido compartiendo lo que nos va pasando, aun sin vernos tanto como en otras épocas.

Muchas gracias a Gastón, Ielpi y Parodi por haber aceptado formar mi CST. Año a año escucharon mis avances y complicaciones para después hacerme distintas sugerencias. Tengo que admitir que mi CST fue un lujo!

Por último quisiera agradecerle a mi familia que siempre es mi apoyo. Gracias a mis viejos que son mi ejemplo en la vida; de que siendo honestos, buena gente y laborantes se puede llegar a buen puerto. Los admiro profundamente. Gracias además por haberme apoyado siempre, aun sin pedirles nada cada vez que pudieron me ayudaron, con todo. Muchas gracias Jean por siempre entenderme tanto cuando había cosas del trabajo que me angustiaban, y por ayudarme por ejemplo con todos los masajes que me hiciste cuando no me daba más la espalda de tanto pipetear! Muchas gracias Pablo por ser un excelente compañero, que aún cuando no entendías el motivo por el cual hacía algunas cosas, me seguiste apoyando y escuchando. Pase lo que pase sé que cuento con vos y eso no tiene precio.

Como alguna vez dijo alguien a quien admiro mucho: “Eternamente gracias”

Este trabajo fue realizado con el apoyo económico de:

- Beca Doctoral del CONICET (Tipo I y II)
- Fundación Instituto Leloir
- Subsidios UBACyT X-245 y X-997 de la Universidad de Buenos Aires

Parte del trabajo presentado en esta tesis fue publicado en los siguientes trabajos:

- Título: “BtaE, and adhesin that belongs to the trimeric autotransporter family, is required for full virulence and defines a specific adhesive pole of *Brucella suis*”

Autores: Verónica Ruiz-Ranwez, Diana M. Posadas, Charles Van der Henst, Silvia Estein, Gastón Arocena, Patricia L. Abdian, Fernando A. Martin, Rodrigo Sieira, Xavier De Bolle y Angeles Zorreguieta.

Revista: Infection and Immunity

Publicación: 2013 81:996-1007

- Título: “The BtaF trimeric autotransporter of *Brucella suis* is involved in attachment to various surfaces, resistance to serum and virulence”

Autores: Verónica Ruiz-Ranwez, Diana M. Posadas, Silvia Estein, Patricia L. Abdian, Fernando A. Martin y Angeles Zorreguieta.

Revista: PLoS One

Publicación: 2013 Nov 13; 8(11):e79770. doi: 10.1371/journal.pone.0079770

Además durante estos años he colaborado en otros proyectos relacionados a la tesis, parcialmente publicados en:

- Título: “BmaC, a novel autotransporter of *Brucella suis*, is involved in bacterial adhesion to host cells”

Autores: Diana M. Posadas, Verónica Ruiz-Ranwez, Hernán R. Bonomi, Fernando A. Martín y Angeles Zorreguieta.

Revista: Cellular Microbiology

Publicación: 2012 14:965-82

Factores involucrados en la interacción inicial de *Brucella suis* con el hospedador: rol de los autotransportadores triméricos.

El género *Brucella* comprende patógenos intracelulares facultativos que causan una zoonosis conocida como brucelosis. Esta zoonosis es una de las más dispersas alrededor del mundo y afecta a una amplia variedad de mamíferos, entre ellos muchos de importancia agropecuaria. Un aspecto fundamental en la virulencia de *Brucella* reside en su capacidad de invadir y replicar dentro de células fagocíticas y no fagocíticas. El objetivo del trabajo de tesis fue identificar y caracterizar moléculas de *B. suis* asociadas a la adhesión y/o invasión a las células del hospedador.

Mediante análisis bioinformáticos del genoma de *B. suis* 1330 se identificaron posibles proteínas que potencialmente podrían cumplir una función en la adhesión y/o invasión. En esta tesis se estudiaron tres de las proteínas candidatas (BtaE, BtaF y MapA). Diferentes análisis *in silico* indicaron que BtaE y BtaF pertenecen a la familia de los autotransportadores triméricos, los cuales median su propia translocación a través de la membrana externa. Enfoques mutacionales y heterólogos demostraron que BtaE y BtaF están involucradas en la adhesión a células no fagocíticas del hospedador y a componentes de la matriz extracelular. En particular, BtaE confirió adhesión a ácido hialurónico mientras que BtaF conferiría una adhesión promiscua a una amplia variedad de componentes de la matriz extracelular del hospedador y participaría en la formación de un *biofilm in vitro*. La adhesina BtaF cumpliría una función adicional ya que confirió a la bacteria que la porta tolerancia a la actividad bactericida del complemento presente en el suero. Ambos autotransportadores fueron necesarios para que *B. suis* genere una completa virulencia en ratones inoculados intragástricamente. Por otro lado, por inmunofluorescencia se pudo detectar a BtaE, BtaF y a la adhesina BmaC en un número reducido de células pero en todos los casos las adhesinas se localizaron en el polo nuevo bacteriano generado luego de la división asimétrica de *Brucella*. Se propuso que en *Brucella* dicho polo estaría funcionalmente diferenciado para la adhesión.

En cuanto a MapA, la cepa mutante defectiva en esta proteína fue menos eficiente en la adhesión a células no fagocíticas. Sin embargo, la mutante también presentó una sensibilidad notable a diversos compuestos, como polimixina B, Triton X-100 y lisozima, sugiriendo que la membrana externa se encuentra alterada. Proponemos que MapA estaría involucrada en la síntesis de algún componente de membrana, lo cual a su vez podría afectar directa o indirectamente la adhesión a componentes del hospedador y alterar la resistencia característica de *Brucella* al sistema inmune del hospedador. Estudios futuros permitirán dilucidar la función bioquímica de MapA en la biogénesis de la membrana de *Brucella* y su rol en la interacción de la bacteria con el hospedador.

Palabras claves: *Brucella*, autotransportador, adhesina, virulencia, complemento, polo nuevo, membrana externa

Factors involved in the initial interaction of *Brucella suis* with the host: role of trimeric autotransporters

The *Brucella* genus contains facultative intracellular pathogens, which cause a zoonotic disease called brucellosis. This zoonosis is spread around the world and affects a wide range of mammals, among them many of agricultural importance. A fundamental aspect in the virulence of *Brucella* is its ability to invade and replicate within phagocytic and non-phagocytic cells. The aim of this thesis was to identify and characterize *Brucella suis* molecules associated to adhesion and/or invasion of host cells.

Proteins that potentially could play a role in adhesion and/or invasion were identified through bioinformatic analysis of the *B. suis* 1330 genome. In this thesis three of the candidate proteins (BtaE, BtaF and MapA) were studied. Different *in silico* analysis indicated that BtaE and BtaF belong to the trimeric autotransporter family, which mediate their own translocation across the outer membrane. Mutational and heterologous approaches demonstrated that BtaE and BtaF are involved in the adhesion to non-phagocytic cells and components of the extracellular matrix. Particularly, it was shown that BtaE confers adhesion to hyaluronic acid while BtaF confers a promiscuous adhesion to a variety of compounds of the extracellular matrix and it would be involved in the formation of *biofilms in vitro*. The adhesin BtaF was involved in an additional function since it conferred the bacteria that carried it, tolerance to the bactericidal activity of the complement present in serum. Both autotransporters were necessary for *B. suis* to exhibit a full virulence in mice inoculated intragastrically. On the other hand, by immunofluorescence BtaE, BtaF and BmaC were detected in a reduced number of cells but in all cases the adhesins were localized at the new bacterial pole generated after the asymmetric division of *Brucella*. We propose that this pole of *Brucella* is functionally differentiated for adhesion.

Regarding MapA, the mutant strain defective in this protein was less efficient in the adhesion to non-phagocytic cells. However, this mutant also presented a remarkable sensitivity to several compounds such as polymyxin B, Triton x-100 and lysozyme, suggesting that the bacterial outer membrane is altered. We propose that MapA would be involved in the synthesis of some membrane component, which could directly or indirectly affect the adhesion to components of the host and alter the characteristic resistance of *Brucella* to the immune system of the host. Future studies will be carried out to determine the biochemical function of MapA in the biogenesis of *Brucella*'s membrane and its role in the interaction of the bacteria with the host.

Key words: *Brucella*, autotransporter, adhesin, virulence, complement, new pole, outer membrane.

Índice

| | |
|--|----------------|
| Introducción | 1 - 36 |
| 1. <i>Brucella</i> spp. y brucelosis | 1 - 14 |
| 1.1. Generalidades | 1 |
| 1.2. Brucelosis en animales | 5 |
| 1.3. Brucelosis en humanos | 9 |
| 1.4. Diagnóstico de brucelosis | 13 |
| 2. Patogénesis de <i>Brucella</i> | 15 - 23 |
| 2.1. Etapas iniciales de la infección y tráfico intracelular | 15 |
| 2.2. Factores de virulencia de <i>Brucella</i> | 17 |
| a. Particularidades del LPS y de la membrana externa de <i>Brucella</i> y su rol en la patogenia | 17 |
| b. Otros factores que confieren resistencia a la respuesta inmune del hospedador | 21 |
| c. Glucanos cíclicos | 21 |
| d. Sistema de secreción VirB: un factor de virulencia crucial para la vida intracelular | 21 |
| e. Sistema de dos componentes BvrR/BvrS | 23 |
| f. Sistemas de detoxificación | 23 |
| 3. Adhesión a componentes del hospedador | 23 - 36 |
| 3.1. Importancia de la adhesión e invasión en patógenos | 23 |
| 3.2. Adhesinas | 26 |
| a. Autotransportadores (Sistema de secreción tipo V) | 26 |
| b. Adhesinas en <i>Brucella</i> | 34 |
| Hipótesis | 37 |
| Objetivos | 38 |
| Objetivo general | 38 |
| Objetivos específicos | 38 |
| Materiales y Métodos | 39 - 74 |
| 1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados | 39 |
| 2. Medios y condiciones de cultivo bacterianos | 41 |
| 2.1. Medios de cultivo | 41 |
| 2.2. Antibióticos | 41 |
| 2.3. Conservación de cepas | 41 |
| 3. Aislamiento, purificación y manipulación del ADN | 42 - 44 |
| 3.1. Procedimientos generales | 42 |
| 3.2. Preparación de ADN cromosómico de <i>Brucella</i> | 42 |
| 3.3. Preparación de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> | 43 |
| 3.4. Secuenciación de ADN | 44 |
| 3.5. Geles de Agarosa | 44 |

| | |
|--|----------------|
| 4. Transformación genética bacteriana | 44 - 46 |
| 4.1. Preparación de <i>E. coli</i> competentes por <i>heat shock</i> y transformación | 44 |
| 4.2. Preparación de <i>E. coli</i> electrocompetentes de alta eficiencia y transformación | 45 |
| 4.3. Preparación de <i>B. suis</i> electrocompetentes y transformación | 45 |
| 4.4. Conjugación biparental en placa | 46 |
| 5. Análisis de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas | 46 |
| 6. Amplificación de secuencias mediante PCR | 47 - 49 |
| 6.1. Oligonucleótidos | 47 |
| 6.2. PCR desde ADN genómico de <i>B. suis</i> | 48 |
| 6.3. <i>Colony</i> -PCR | 49 |
| 7. Aislamiento de ARN de <i>Brucella</i>, síntesis de ADNc y RT-PCR | 49 - 51 |
| 7.1. Aislamiento de ARN de <i>Brucella</i> | 49 |
| 7.2. Degradación de ADN genómico | 50 |
| 7.3. Síntesis de ADNc | 50 |
| 7.4. RT-PCR | 51 |
| 8. Obtención de fracciones subcelulares | 51 - 53 |
| 8.1. Obtención de membranas totales de <i>Brucella</i> seguida de un fuerte proceso de desnaturalización | 51 |
| 8.2. Obtención de fracciones subcelulares de <i>E. coli</i> | 52 |
| 9. Electroforesis de proteínas | 53 - 54 |
| 9.1. Geles desnaturalizantes tradicionales | 53 |
| 9.2. Geles desnaturalizantes con Tricina | 53 |
| 9.3. Geles semi-nativos | 54 |
| 10. Obtención de anticuerpos policlonales | 55 - 57 |
| 10.1. Obtención de los péptidos inyectados | 55 |
| 10.2. Esquema de inmunización (por ratón) | 57 |
| 10.3. Obtención de suero a partir de sangre | 57 |
| 11. Western blot | 58 |
| 12. Obtención de mutantes en <i>B.suis</i> y sus respectivas cepas complementadas | 58 - 61 |
| 12.1. Obtención de las cepas mutantes | 58 |
| 12.2. Obtención de las cepas complementadas | 60 |
| 13. Expresión heteróloga en <i>E. coli</i> | 61 |
| 14. Análisis de la envoltura de <i>Brucella</i> | 61 - 63 |
| 14.1. Disociación y <i>test</i> de aglutinación en acriflavina | 61 |
| 14.2. Tolerancia a distintos compuestos | 62 |
| 14.3. Hiperpermeabilidad | 62 |
| 15. Adhesión <i>in vitro</i> | 63 - 65 |
| 15.1. Adhesión bacteria-bacteria (autoagregación) | 63 |
| 15.2. Adhesión a superficies abióticas (<i>biofilm</i>) | 63 |
| 15.3. Adhesión a componentes de la matriz extracelular | 64 |

| | |
|--|------------------|
| 16. Líneas celulares | 65 |
| 17. Adhesión a células en cultivo | 65 - 67 |
| 17.1. Infección de células eucariotas | 65 |
| 17.2. Competencia | 67 |
| 17.3. Efecto del AH en la adhesión a HeLa | 67 |
| 18. Replicación intracelular | 67 |
| 19. Microscopía confocal | 68 - 70 |
| 19.1. Localización de las adhesinas sobre la superficie bacteriana | 68 |
| 19.2. Determinación del polo de <i>Brucella</i> en el cual se encuentran las adhesinas | 69 |
| 19.3. Microscopía confocal de infecciones | 69 |
| 20. Microscopía de barrido electrónico | 70 |
| 21. Resistencia al complemento | 70 |
| 22. Antigenicidad de las proteínas | 71 |
| 23. Infección de ratones BALB/c | 73 |
| 24. Análisis estadístico | 73 |
| Resultados | 75 - 143 |
| Capítulo I: Caracterización de BR_0072 | 75 - 104 |
| I.1. Identificación de posibles adhesinas y estrategias utilizadas | 75 |
| I.2. Análisis bioinformático de BR_0072 | 78 |
| I.3. Obtención de la cepa de <i>B. suis</i> mutante en <i>btaE</i> y su complementada | 81 |
| I.4. Obtención de anticuerpos policlonales anti-BtaE | 84 |
| I.5. Expresión heteróloga en <i>E. coli</i> | 86 |
| I.6. Análisis de fenotipos asociados a la envoltura celular | 87 |
| I.7. Autoagregación y formación de <i>biofilm</i> | 89 |
| I.8. Adhesión a componentes de la matriz extracelular | 91 |
| I.9. Función de BtaE en la adhesión e invasión a células del hospedador | 92 |
| I.10. Replicación intracelular | 96 |
| I.11. Localización de BtaE | 96 |
| I.12. Resistencia a suero de BtaE | 100 |
| I.13. Expresión <i>in vivo</i> de BtaE | 102 |
| I.14. Virulencia en ratones | 103 |
| Capítulo II: Caracterización de BR_1846 | 105 - 129 |
| II.1. Análisis bioinformático de BR_1846 | 105 |
| II.2. Obtención de la cepa de <i>B. suis</i> mutante en <i>btaF</i> y su complementada | 108 |
| II.3. Obtención de la cepa de <i>B. suis</i> mutante en <i>btaE</i> y <i>btaF</i> | 110 |
| II.4. Obtención de anticuerpos policlonales anti-BtaF | 110 |
| II.5. Expresión heteróloga en <i>E. coli</i> | 112 |
| II.6. Análisis de fenotipos asociados a la envoltura celular | 113 |
| II.7. Autoagregación y formación de <i>biofilms</i> | 115 |
| II.8. Adhesión a componentes de la matriz extracelular | 118 |

| | |
|---|------------------|
| II.9. Función de BtaF en la adhesión e invasión a células del hospedador | 119 |
| II.10. Replicación intracelular | 123 |
| II.11. Localización de BtaF sobre la superficie | 123 |
| II.12. Resistencia a suero | 125 |
| II.13. Expresión <i>in vivo</i> de BtaF | 127 |
| II.14. Virulencia en ratones | 127 |
| Capítulo III: Caracterización de BR_0049 | 130 - 143 |
| III.1. Análisis bioinformático de BR_0049 | 130 |
| III.2. Obtención de la cepa de <i>B. suis</i> mutante <i>map A</i> y su complementada | 133 |
| III.3. Obtención de anticuerpos policlonales anti-MapA | 135 |
| III.4. Análisis de fenotipos asociados a la envoltura celular | 138 |
| III.5. Autoagregación y formación de <i>biofilms</i> | 140 |
| III.6. Adhesión e invasión a células epiteliales | 141 |
| III.7. Replicación intracelular | 142 |
| Discusión | 144 - 159 |
| Funciones de BtaE y BtaF | 145 |
| Ubicación polar | 151 |
| Adhesinas y especiación | 153 |
| MapA | 154 |
| Perspectivas | 158 |
| Conclusiones | 160 |
| Bibliografía | 161 |
| Índice de Figuras y tablas | 181 |
| Listado de Abreviaturas | 184 |

Introducción

1. *Brucella* spp. y brucelosis

1.1. Generalidades

El género *Brucella* pertenece a la familia *Brucellaceae*, la cual se encuentra dentro del orden Rhizobiales de la clase α -Proteobacteria (1-3). La clase α -Proteobacteria está compuesta por familias de organismos que son patógenos de animales (por ej. *Brucella* spp., *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp) o de plantas (por ej. *Agrobacterium* spp.), simbioses (por ej. *Rhizobium* spp., *Sinorhizobium* spp. y *Bradyrhizobium* spp.), u organismos habitantes del suelo como por ej. *Ochrobactrum* spp., que es considerado un patógeno oportunista. En la figura 1 se muestra un árbol filogenético construido con algunas especies correspondientes a estos géneros, en base a la secuencia del RNA ribosomal 16S, del *Ribosomal Database Project* (4). El género filogenéticamente más cercano a *Brucella* es *Ochrobactrum*. Todos los patógenos o simbioses mencionados comparten la característica de establecer relaciones de cronicidad con el hospedador, como parte fundamental de su ciclo de vida (5). Una característica genética diferencial de los patógenos intracelulares obligados es la disminución del tamaño de sus genomas, una baja cantidad de regiones codificantes y una alta pseudogenización; ejemplos son los genomas de las especies de *Rickettsia*, con genomas de 1.1 Mb (6). En cambio, los simbioses de plantas han sufrido una expansión genómica con tamaños de hasta 9 Mb debido a la adquisición de uno o más plásmidos simbióticos de más de 100 kb, que albergan genes necesarios y esenciales para la simbiosis (7). Dentro de las α -Proteobacterias, las especies de *Brucella* presentan genomas de tamaño intermedio (aproximadamente 3.2 Mb), entre los genomas pequeños como por ejemplo el de *Rickettsia* y los simbioses de plantas. Salvo para el biovar 3 de *Brucella suis*, el material genético de las especies de *Brucella* se encuentra organizado en dos cromosomas circulares, sin presencia de plásmidos. En dicha biovariedad de *B. suis* todo el material genético se encuentra en un único cromosoma (8).

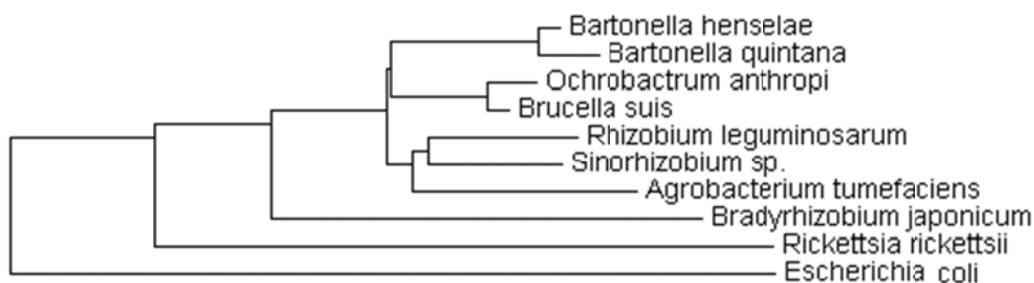


Figura 1. Árbol filogenético.

Árbol filogenético construido en base a la secuencia del ARN 16S, con algunas especies pertenecientes a las α -Proteobacterias mencionadas en el texto; se incluye a modo de *outgroup* a *E. coli* (γ Proteobacteria). Este árbol se construyó utilizando el RDP (4) en base al método *Neighbor Joining*.

En particular, las especies pertenecientes al género *Brucella* son coco bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos que pueden infectar múltiples especies de mamíferos causando una zoonosis llamada brucelosis. Dado que en algunos casos puede ser transmitida a humanos, se la puede catalogar como una antropozoonosis. El Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Argentina ha incluido recientemente a la brucelosis como una de las enfermedades de especial relevancia en nuestro país (9).

En la actualidad se reconocen diez especies dentro del género *Brucella*, algunas de las cuales pueden ser subdivididas en biovariedades. Esta clasificación está basada en el hospedador de preferencia, patogenicidad y en características antigénicas y bioquímicas (10) (11). Las seis especies clásicas del género (y sus hospedadores de preferencia) son: *B. melitensis* (caprinos), *B. abortus* (bovinos), *B. suis* (porcinos), *B. canis* (caninos), *B. neotomae* (ratas de desierto) y *B. ovis* (ovinos). Recientemente se identificaron otras cuatro especies: *B. microti* (ratones de campo) (12), *B. pinnipediae* (leones marinos), *B. ceti* (ballenas) (13), y *B. inopinata* (14). Esta última especie fue aislada de un implante mamario humano infectado (cepa BO1), pero aún no es claro cuál sería su hospedador de preferencia (15).

El concepto de especie está constantemente sujeto a debate (16) (17). En particular, en *Brucella*, el concepto de especie es aún más controversial (18) por el alto porcentaje de similitud de sus genomas. Estudios de hibridación DNA-DNA revelaron más de un 90% de homología entre las seis especies clásicas (19-21) y entre éstas y las recientemente identificadas. Durante el año 2002 se secuenciaron los primeros genomas del género, que fueron los de *B. melitensis* 16M y *B. suis* 1330 (22, 23). La comparación de estos genomas confirmó una gran conservación de secuencia y en la sintenia de los genes. Más del 90% del genoma presenta una identidad de secuencia de ADN entre el 98 y 100%. Otros estudios comparativos establecieron que los genomas de las distintas especies del género *Brucella* secuenciados muestran una conservación de más del 98% (11). Por otro lado, los genes que se consideran más variables (identidad menor al 95%)

corresponden principalmente a genes hipotéticos, que en muchos casos codificarían proteínas expuestas sobre la superficie bacteriana. Estas incluyen proteínas de membrana, transportadores de membrana, putativas adhesinas (SdhA-like) e invasinas. Estas diferencias en la superficie podrían contribuir a las preferencias de hospedador, al tropismo a determinados tejidos y a algunas manifestaciones de la enfermedad de las distintas especies, siendo estas características claves en la clasificación de las especies de *Brucella*. Dada la gran cercanía entre los miembros del género y el alto nivel de conservación génica, algunos microbiólogos han propuesto que el género debería considerarse monoespecífico denominándolo *Brucella melitensis*, y proponer a las distintas especies (según la clasificación actual) como biovariedades o cepas de la misma biovariedad (21, 24, 25). Sin embargo, esta teoría entra en conflicto con la hipótesis de la supuesta evolución a partir de los aislamientos obtenidos de acuerdo a las distintas preferencias de hospedador (26).

Previamente se describía para cada una de las especies de *Brucella* una única especie hospedadora. Sin embargo se ha observado que, si bien cada especie tiene un hospedador de preferencia, algunas especies son además capaces de infectar otras especies (siempre perteneciente a los mamíferos) (27). Por ejemplo, el hospedador de preferencia de *B. abortus* es el ganado bovino; sin embargo, esta especie también ha sido aislada, aunque con una frecuencia mucho menor, de caballos, cerdos, ovejas, cabras, camellos, dromedarios, búfalos, alces, perros, ciervos (28-30) y humanos (31, 32). *B. melitensis* infecta principalmente cabras y ovejas, pero también se ha visto que es capaz de infectar camellos, dromedarios y humanos. Otro ejemplo es *B. suis*, cuyo hospedador de preferencia es el cerdo, pero también fue aislada de otros mamíferos como reno, cerdo silvestre (*Sus scrofa*) (33), liebre europea (*Lepus capensis*) (33), varias especies murinas, vacas, lobos zorros, perros (34) y humanos (35, 36). La frecuencia de aislamiento de las distintas especies de *Brucella* en los distintos hospedadores es consistente con el concepto de hospedador de preferencia (37); por lo tanto, el concepto de adaptación hospedador-específica sigue siendo considerado válido (38).

Un estudio publicado en 2004 mostró evidencias que sugieren que las α -Proteobacterias se dividen mediante una división asimétrica. En el caso de *Brucella* se generarían dos células hijas de tamaño ligeramente distinto, que presentarían funciones específicas (39). En la figura 2A se puede observar una microscopía electrónica de *B. abortus* tomada justo antes de la tabicación, en la cual la célula hija larga está indicada con la letra “L” y la corta con “S”. Por otro lado, se ha propuesto que el crecimiento unipolar (implicado en la división asimétrica) sería una característica ancestral conservada dentro del orden Rhizobiales, incluyendo a la bacteria mutualista *S. meliloti*, al patógeno de plantas *A. tumefaciens*, al patógeno de animales *Brucella*, y al patógeno oportunista *O. anthropi* (40). En la figura 2B se puede observar el crecimiento polar en función del tiempo de

una única célula de *A. tumefaciens* y la constricción celular que se produce antes de la división celular asimétrica.

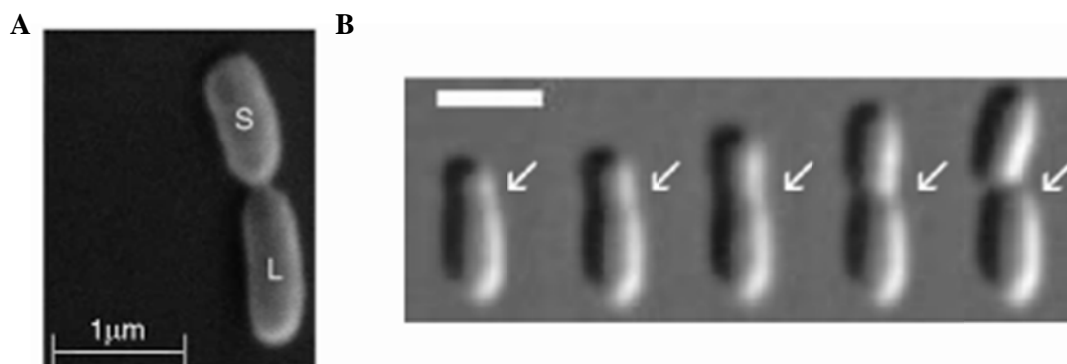


Figura 2. División asimétrica de Rhizobiales

(A) Microscopía electrónica de *B. abortus* obtenida justo antes de la tabicación; con una “L” se indica la célula larga, y con una “S” la corta. Esta microscopía fue tomada del trabajo de Hallez y colaboradores (39).

(B) Microscopía a distintos tiempos. Se muestran fotografías tomadas con intervalos de 30 minutos de una única célula de *A. tumefaciens* en la cual se puede observar el crecimiento unipolar y la división asimétrica. Las flechas blancas indicación el sitio de tabicación, y la barra de en blanco indica la escala de 2 μm . Esta imagen fue obtenida del trabajo de Brown y colaboradores (40).

En otro estudio se caracterizó a PdhS, una histidina quinasa citoplasmática esencial en la viabilidad de *B. abortus* y homóloga a las histidina quinasa PleC y DivJ de *Caulobacter crescentus* que presentan distribución asimétrica. Se determinó que PdhS se localiza específicamente en el polo viejo de la célula más larga de *Brucella* y que luego de la división y crecimiento, la célula chica adquiere PdhS en su polo viejo. Por lo tanto, se propuso a PdhS como un marcador de polo viejo. Además, se propuso que en las α -Proteobacterias que presentan división asimétrica, luego de completarse la citoquinesis, ocurriría un evento de diferenciación (41). Con el fin de profundizar el análisis en los procesos de diferenciación de las células hijas, se han identificado otros marcadores de polo. Recientemente se determinó que la proteína AidB se localiza específicamente en el polo nuevo de *Brucella*, y en el sitio de constricción, tanto en bacterias en cultivo como en bacterias que se encuentran infectando células HeLa o macrófagos. AidB es una acil-CoA-dehidrogenasa que podría estar involucrada en la destrucción de agentes alquilantes (42).

Si bien *Brucella* puede sobrevivir en el ambiente, el nicho preferido es el intracelular. La supervivencia de *Brucella* en el medio ambiente está relacionada con la temperatura, pH y humedad. En agua corriente, a una temperatura de 25°C, las especies de éste género sobreviven diez días, mientras que a 0° C sobreviven dos años y medio. Se calcula que en suelos húmedos a

20° C y 40% de humedad relativa sobreviven hasta cinco meses. La supervivencia de la bacteria en orina es de un mes; sobre fetos abortados puede llegar a sobrevivir dos meses y en exudados uterinos llega a los siete meses (43). Aunque *Brucella* es relativamente resistente y puede sobrevivir por un tiempo considerable en el ambiente, éste no es considerado como una fuente importante de infección. Cabe destacar que al exponer *Brucella* a 56°C las bacterias pierden viabilidad rápidamente (44), con lo cual al pasteurizar un producto (calentándolo hasta los 62°C durante 30 minutos) se eliminan todos las *Brucellas* que lo puedan estar contaminando (ver más adelante sección 1.3. “Brucelosis en humanos”). Es muy importante la pasteurización de productos lácteos ya que de no hacerlo, *Brucella* puede sobrevivir hasta dos meses en productos como por ejemplo quesos.

1.2. Brucelosis en animales

Como se mencionó anteriormente, *Brucella* es el agente causal de la brucelosis, una de las zoonosis más dispersas alrededor del mundo que afecta a una amplia variedad de mamíferos, entre ellos muchos de gran importancia pecuaria como por ejemplo ganado bovino (*B. abortus*), ovino (*B. ovis*), caprino (*B. melitensis*) y porcino (*B. suis*). La brucelosis (también llamada fiebre de Malta, enfermedad de Bang) es endémica en diversas áreas del mundo, aunque en gran parte del norte de Europa, Australia, parte de Estados Unidos y Canadá ha sido erradicada o al menos virtualmente erradicada del ganado gracias a programas de control. En cambio, en la cuenca del Mediterráneo, Medio Oriente, Golfo Árabe, algunas áreas de EE.UU y algunos países de Latinoamérica (incluyendo Argentina), la enfermedad persiste (45-47).

En los animales, *Brucella* causa infecciones generalizadas, seguidas por una localización de la bacteria en órganos reproductivos y el sistema retículo-endotelial. La fuente de infección la constituyen los animales infectados ya que excretan una gran cantidad de bacterias junto con los tejidos y productos de los abortos, en la leche, y en menor medida en las secreciones genitales y orina. De este modo, los animales enfermos contaminan el suelo, los corrales, la paja de las camas, los arroyos, etc (48). Además de las especies de interés económico que son susceptibles a la brucelosis, también existen reservorios en animales salvajes (49). En los últimos años se ha incrementado la aparición de cepas de *B. abortus* y *B. suis* en animales salvajes. Los animales salvajes infectados son un amplio reservorio (50), ya que son una importante fuente de reinfección hacia el ganado (51, 52). La amplia variedad de hospedadores para cada especie del género *Brucella*, la importante diversidad de especies del género *Brucella* y la presencia de reservorios en animales salvajes complica la erradicación de estas bacterias.

La brucelosis provoca en el mundo (incluyendo a la Argentina) pérdidas importantes en la producción pecuaria y restricciones sanitarias en el comercio interno y exportaciones, tanto en la comercialización de los animales como de sus productos derivados (53). Algunos de los problemas de los animales enfermos que impactan en la economía son abortos, reducción en la fertilidad (incluso infertilidad), nacimientos de terneros débiles, pérdida de peso y merma en la producción de leche (47, 54). En particular *B. abortus*, *B. melitensis* (55) y *B. suis* (56), son las especies con mayor impacto económico del grupo. Las estimaciones oficiales sobre las pérdidas anuales únicamente por brucelosis bovina en América Latina (en el año 2001) eran de aproximadamente US\$ 600 millones, de los cuales un 10% corresponde a pérdidas en la Argentina (57). Esta enfermedad junto con la tuberculosis bovina fueron las principales causas de pérdida de dinero en la ganadería del siglo XX. Es por esto que existen regulaciones internacionales que imponen restricciones en el movimiento y comercio de animales infectados con cualquiera de estas especies (58).

La prevalencia en América Latina de la brucelosis bovina varía considerablemente de un país a otro, con rangos que varían entre el 0.5 y 10%. En el caso de la brucelosis porcina, la prevalencia no se conoce con certeza. Respecto a la brucelosis caprina y ovina son pocos los países que reportan datos y son variables entre países (59-65).

Particularmente en Argentina, en la década del '60 el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) realizó estudios en distintas regiones del país y determinó que el porcentaje de granjas o haciendas con animales infectados era del 25% en el caso de establecimientos de ganado lechero, mientras que para las haciendas de ganado para consumo de carne el 20% de las granjas estaban infectadas. Para ambos tipos de granjas, aquellas en las que se encontraron animales infectados, el porcentaje de individuos infectados fue de aproximadamente el 5% (66). Posteriormente, entre los años 1994 y 1998, el INTA realizó otro estudio en la provincia de Buenos Aires, en el cual se incluyeron 53.000 bovinos. En ese relevamiento se determinó que la prevalencia era del 5.6% (Documento del Programa de Salud Animal, Mimeo, 85 pp, INTA). Por otro lado un relevamiento a nivel nacional realizado por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) entre los años 2004 y 2005, indicó que en el 2004 el porcentaje promedio de vacunos infectados era del 2.15% (Tabla 1). En particular las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Entre Ríos, Formosa, La Rioja, Mendoza, Rio Negro, Salta y Tucumán fueron las provincias más afectadas, mientras que en La Pampa, Misiones, San Juan y San Luis no se encontraron casos positivos. El promedio de vacunos infectados en 2005 presentó un leve ascenso, al 3.27% de casos positivos, con un aumento en el promedio de casos positivos en provincias de alta actividad ganadera como Buenos Aires, La Pampa, Santa Fe y Córdoba.

| Provincia | 2004 | | | | | 2005 | | | | | TOTAL | | |
|--------------|-------------------------------|----------------------------|------|------|------|-------------------------------|----------------------------|------|------|------|-------------------------------|----------------------------|------|
| | Cantidad de muestras (sueros) | Número de sueros positivos | IC+ | % | IC- | Cantidad de muestras (sueros) | Número de sueros positivos | IC+ | % | IC- | Cantidad de muestras (sueros) | Número de sueros positivos | % |
| Buenos Aires | 3,543 | 77 | 2.66 | 2.17 | 1.69 | 5006 | 186 | 4.25 | 3.72 | 3.18 | 8,549 | 263 | 3.08 |
| Catamarca | 508 | 6 | 2.13 | 1.18 | 0.24 | 12 | 0 | 0 | 0.00 | 0 | 520 | 6 | 1.15 |
| Córdoba | 935 | 24 | 3.59 | 2.57 | 1.54 | 828 | 36 | 5.77 | 4.35 | 2.93 | 1,763 | 60 | 3.40 |
| Corrientes | 780 | 11 | 2.24 | 1.41 | 0.58 | 612 | 23 | 5.29 | 3.76 | 2.62 | 1,392 | 34 | 2.44 |
| Chaco | 510 | 7 | 2.39 | 1.37 | 0.36 | 320 | 13 | 6.27 | 4.06 | 1.85 | 830 | 20 | 2.41 |
| Entre Ríos | 508 | 16 | 4.69 | 3.15 | 1.61 | 603 | 22 | 5.17 | 3.65 | 2.12 | 1,111 | 38 | 3.42 |
| Formosa | 2,650 | 59 | 2.79 | 2.23 | 1.66 | 2281 | 82 | 4.37 | 3.59 | 2.82 | 4,931 | 141 | 2.86 |
| Jujuy | 377 | 4 | 2.10 | 1.06 | 0.02 | 29 | 0 | 0 | 0.00 | 0 | 406 | 4 | 0.99 |
| La Pampa | 750 | 3 | 0.85 | 0.40 | 0.00 | 808 | 22 | 3.86 | 2.72 | 1.58 | 1,558 | 25 | 1.60 |
| La Rioja | 871 | 29 | 4.54 | 3.33 | 2.12 | 0 | 0 | 0 | 0.00 | 0 | 871 | 29 | 3.33 |
| Mendoza | 1,172 | 33 | 3.78 | 2.82 | 1.86 | 60 | 1 | 4.93 | 1.67 | 0 | 1,232 | 34 | 2.76 |
| Misiones | 360 | 3 | 1.78 | 0.83 | 0.00 | 195 | 0 | 0 | 0.00 | 0 | 555 | 3 | 0.54 |
| Neuquén | 0 | 0 | | | | 352 | 10 | 4.6 | 2.84 | 1.08 | 352 | 10 | 2.84 |
| Río Negro | 2,026 | 53 | 3.32 | 2.62 | 1.91 | 3896 | 106 | 3.24 | 2.72 | 2.20 | 5,922 | 159 | 2.68 |
| Salta | 1,716 | 39 | 2.99 | 2.27 | 1.56 | 375 | 3 | 1.71 | 0.80 | 0 | 2,091 | 42 | 2.01 |
| San Juan | 188 | 0 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0 | 0 | 0 | 0.00 | 0 | 188 | 0 | 0.00 |
| San Luis | 140 | 1 | 2.11 | 0.71 | 0.00 | 165 | 5 | 5.69 | 3.03 | 37 | 305 | 6 | 1.97 |
| Santa Fe | 777 | 12 | 2.42 | 1.54 | 0.67 | 1008 | 32 | 4.27 | 3.17 | 2.07 | 1,785 | 44 | 2.46 |
| Sgo. Estero | 290 | 6 | 3.72 | 2.07 | 0.41 | 60 | 2 | 7.95 | 3.33 | 0 | 350 | 8 | 2.29 |
| Tucumán | 370 | 14 | 5.77 | 3.78 | 1.80 | 0 | 0 | 0 | 0.00 | 0 | 370 | 14 | 3.78 |
| TOTAL | 18,471 | 397 | 2.36 | 2.15 | 1.94 | 16610 | 543 | 3.39 | 3.27 | 2.87 | 35,081 | 940 | 2.68 |

Tabla 1. Resultado del muestreo de brucelosis bovina durante los años 2004 y 2005, en 20 provincias de la República Argentina. Fuente: SENASA

En cuanto a brucelosis ovina en Argentina, algunos estudios indican que en todas las regiones del país en las que se crían ovejas, se detectan ovejas con brucelosis. Por ejemplo, estudios realizados en la provincia de Buenos Aires determinaron que el 28.6% de las ovejas no eran recomendables para la cría, debido a la brucelosis (59, 66). Por otro lado, respecto a las cabras, el primer reporte en Argentina data de la década de 1940, en la cual la prevalencia fue del 20%. Estudios posteriores en el noroeste del país informaron una tasa de infección de entre el 20 y 25% de los animales (66). En 1993 hubo un brote en una granja de 2300 cabras en la provincia de Mendoza (con una tasa de infección superior al 50%), resultando en 26 personas infectadas (67). Por otra parte, relevamientos realizados entre 1999 y 2002 indican una prevalencia entre el 0.5 y 0.8%, en el noroeste del país (66). Esto sugiere que al menos en el noroeste del país la prevalencia en cabras habría bajado.

En nuestro país se ha estudiado la prevalencia de la brucelosis porcina a partir de la década de 1940. Entre 1960 y 1980 se realizaron relevamientos que indicaron una prevalencia de entre el 14.2 y 25%. En la actualidad no existen programas de monitoreo de brucelosis porcina, y según una comunicación personal con personal del área de brucelosis del SENASA, esto se debe

principalmente a la falta de un método de diagnóstico funcional en porcinos. De hecho, la situación epidemiológica de la brucelosis en cerdos es desconocida (66). Los métodos de diagnóstico que se utilizan por ejemplo en vacas, no son útiles en detectar la brucelosis porcina ya que introducen muchos errores. El único método confiable en porcinos es el aislamiento de la bacteria a partir del tejido, lo cual es muy difícil de implementar. Sin embargo, algunos criadores realizan un monitoreo privado con el fin de luchar contra la enfermedad (66). En Febrero de 2013 mediante la resolución 63/2013, el SENASA creó el “Registro Nacional de Establecimientos Oficialmente Libres de Brucelosis Porcina”. La incorporación a dicho Registro es obligatoria solo para los establecimientos que desean comercializar reproductores porcinos y/o material reproductivo porcino (por ejemplo, semen), pero no es obligatoria para establecimientos que crían animales para ser faenados.

En cuanto a la brucelosis canina en Argentina existen estudios de los últimos años que indican que es frecuente el aislamiento de *B. canis* en perros (36, 68) tanto en poblaciones urbanas como suburbanas. Incluso, se han encontrado también casos de perros positivos para *B. abortus* y *B. suis* (66). Finalmente, no se han llevado a cabo estudios significativos en el país respecto a reservorios de vida silvestre. Sin embargo, se sabe que en el país se ha aislado *B. abortus* de lobos, comadrejas y hurones, y *B. suis* de la liebre europea (69).

En cuanto a la prevención, a nivel mundial, existen algunas vacunas aprobadas para uso animal. Sin embargo, cabe destacar que aún no existen vacunas para todos los hospedadores, ni para todas las especies de *Brucella*. En el caso del ganado bovino, existen dos vacunas comercializadas, pero su uso no está aprobado en todo el mundo. Ambas vacunas utilizan cepas atenuadas de *B. abortus*. Una de ellas utiliza la cepa 19 de *B. abortus* (S19), cuyo uso está aprobado solo para la vacunación de terneros de entre 3 y 9 meses, mientras que la vacuna con la cepa RB51 puede aplicarse en animales de cualquier edad. Una ventaja de la cepa RB51 es que no produce anticuerpos contra el antígeno O del lipopolisacárido (LPS) ya que es una mutante rugosa (deficiente en el antígeno O del LPS, ver sección 2.2.a.). Esto permite discriminar entre los animales vacunados con esta cepa, de los enfermos, ya que en animales enfermos hay un título importante de anticuerpos anti-antígeno O. Por otra parte, un gran problema de ambas vacunas, es que estas especies son atenuadas en bovinos pero son capaces de infectar humanos. Otro de los inconvenientes que tienen estas vacunas es que no es claro si protegen al hospedador únicamente de *B. abortus*, o si además son eficientes, por ejemplo, para *B. melitensis* o *B. suis* que también son capaces de infectar bovinos (70).

En Argentina la vacunación del ganado bovino ha sido intensa; en el año 1982 se estableció que la vacunación de terneras de entre 3 y 8 meses con la cepa S19 de *B. abortus* fuese

obligatoria en todo el territorio nacional (SENASA Resolución 73/82 Mimeo, 32 pp). A partir de 1998 se autorizó el uso de la vacuna *B. abortus* RB51 en terneros de sexo femenino de más de 10 meses y no más de tres meses de preñez y además se implementó la vacunación simultánea contra la brucelosis y la fiebre de aftosa. En ese momento la vacunación de terneras con S19 alcanzó un 95% (66). Sin embargo, no se combatió la infección del ganado bovino por otras especies de *Brucella*, así como tampoco se previno la infección de *B. abortus* a otros hospedadores (71).

En cuanto al ganado caprino, existe la vacuna Rev1 que consiste en el uso de una cepa atenuada. Al igual que lo que ocurre con las cepas S19 y RB51 de *B. abortus*, ésta cepa también es virulenta para humanos. A pesar de la alta prevalencia de la brucelosis caprina en el país, el uso de esta vacuna fue autorizado en Argentina recién a fines del año 2006 (Resolución 216/2006, SENASA). Por otro lado, en China se ha utilizado una cepa de *B. suis* (cepa 2) para la vacunación de diferentes especies, entre ellos cerdos (72). Sin embargo, un Comité de evaluación internacional *ad-hoc* designado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha determinado que los resultados obtenidos en ratón y en ovejas son pobres, con lo cual la utilización de esta vacuna no está autorizada en el resto del mundo (73).

La Organización Mundial de la Sanidad Animal recomienda el uso de las vacunas *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 y *B. melitensis* Rev1 para el control de ganado (74, 75). Sin embargo, como se mencionó estas cepas son patogénicas para humanos, con lo cual no solo no sirven para vacunar humanos sino que además al administrar las vacunas las personas pueden contraer la enfermedad (54).

1.3. Brucelosis en humanos

Además de las pérdidas económicas por infección de ganado, la brucelosis tiene un alto impacto en la salud pública ya que también afecta a los humanos. Tradicionalmente se consideró que cuatro de las especies del género *Brucella* pueden causar enfermedad en humanos: *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, y *B. canis* (el orden en que se nombran coincide con la virulencia en humanos, de mayor a menor) (35, 71, 76, 77). Sin embargo, también se ha descrito la aparición de infecciones y complicaciones de pacientes infectados con *B. maris (ceti)* (78).

Las personas pueden infectarse por consumo de alimentos contaminados y crudos (por ejemplo leche y otros lácteos en general, no pasteurizados, carne mal cocida), por exposición a animales infectados, muestras de los mismos (por ejemplo sangre, placenta, fetos, secreciones uterinas, orina), entre otras. Las bacterias pueden ingresar al organismo vía cortes o abrasiones, por vía oral (por ejemplo por ingestión de alimentos contaminados), por contaminación de las conjuntivas con aerosoles o por vía respiratoria (por ejemplo por inhalación de aerosoles) (11, 79).

La brucelosis en humanos es muy común en áreas como la costa del Mediterráneo, Medio Oriente, y Latinoamérica, donde la enfermedad es endémica. En cambio, en áreas del mundo más desarrolladas en las que las medidas de higiene y control de alimentos son más estrictos, la enfermedad se asocia con la actividad laboral, por lo que se considera una enfermedad profesional (de veterinarios, carniceros, personal de frigoríficos, laboratorios, granjeros y ganaderos) (71). La infección lateral y congénita entre humanos es muy poco común, aunque se han reportado casos esporádicos por ejemplo por transfusión sanguínea o trasplante de médula (69, 80-83).

La aparición de esta patología en humanos se asocia a la enfermedad del ganado. En particular, en la Argentina la brucelosis humana está muy relacionada con la infección de cabras en la zona oeste del país y con ganado bovino y porcino en el este, mientras que en centros urbanos las mayores fuentes de infección son los frigoríficos (59).

Para lograr un adecuado control de la enfermedad en el hombre es fundamental el desarrollo de programas de vacunación en el ganado. Así mismo, la vigilancia epidemiológica en la población expuesta es fundamental, ya que un diagnóstico temprano permite una rápida mejoría, lo cual evita las complicaciones secundarias asociadas a la cronicidad de la enfermedad. Además, dado que algunos individuos con brucelosis se muestran asintomáticos, es necesario un diagnóstico preciso, especialmente en áreas endémicas (35). Las medidas de control se basan en la prevención de los factores de riesgo. La vigilancia es entonces un elemento clave para el manejo de los programas de prevención y control (84). Según la OMS desde mediados de la década de los 70, cada año se registran en el mundo medio millón de casos de adquisición de brucelosis en humanos. Debido a que los síntomas clínicos suelen confundirse con otras enfermedades y a que no se suelen realizar los controles de rutina adecuados para su diagnóstico, se cree que dicho número representaría solo el 4% de los casos reales (36, 85).

En los países libres de brucelosis como Francia o Bélgica la incidencia no supera el 1/1.000.000 de casos reportados por año, estando usualmente asociados a infecciones contraídas en zonas turísticas consideradas endémicas. En cambio, en las zonas endémicas (como por ejemplo algunos países de Asia y América Latina), la incidencia alcanza a 30-60 casos nuevos por año cada 1.000.000 de individuos (47, 66, 86). En América Latina los países en los que se registra la mayor cantidad de casos son: Argentina, Perú y México. Según la Organización Panamericana de la salud, durante el año 2000 la cantidad de nuevos casos de brucelosis humana registrados fueron 507 en la Argentina, 2.171 en México y 1.072 en Perú (87). En cambio, según otra fuente, en ese año en Perú se registraron 2.566 nuevos casos (88). Esta alta variabilidad en las cifras de nuevos casos refleja la poca validez de los datos oficiales. Por otro lado, en 2008, Lucero y colaboradores (36) publicaron un informe correspondiente a un seguimiento de aislamientos de *Brucella* en humanos y animales

en América Latina, comprendido entre los años 1968 y 2006. Este seguimiento se llevó a cabo en dos etapas, una primer etapa entre 1968 y 1991 (con cepas aisladas en toda América Latina) y una segunda etapa (entre 1994 y 2006) con aislamientos únicamente obtenidos en Argentina. Durante el primer periodo, la mayor causa de brucelosis en Argentina fue *B. suis*, mientras que en México y Perú hubo más casos de *B. melitensis*. En el segundo período en Argentina, *B. melitensis* y *B. suis* se presentaron con una mayor frecuencia que en el primer periodo, mientras que la frecuencia del aislamiento de *B. abortus* disminuyó. Otro dato interesante de este informe es respecto a la cepa 19 de *B. abortus* que se utiliza como vacuna de ganado bovino, ya que el relevamiento muestra que en el segundo período hubo un incremento en el número de aislamientos de esta cepa en humanos. Esto confirma su potencial patogenicidad para los humanos.

Después de la exposición a *Brucella* spp., los humanos presentan un período de latencia o “incubación” de dos a cuatro semanas, antes de presentar síntomas de brucelosis. Esto sugiere que la penetración inicial de las mucosas por parte de *Brucella* no se manifiesta con una respuesta de inflamación (89). Una vez que se manifiesta la brucelosis se la puede separar desde el punto de vista clínico, en 3 etapas. La primer etapa (de carácter agudo) se caracteriza por presentar un período de incubación de entre dos a cuatro semanas, durante el cual ocurre la diseminación septicémica de la bacteria. Esta etapa se encuentra acompañada por fiebre alta, malestar general, dolor de cabeza, sudoración, artralgias (dolor en articulaciones), dolores musculares y pérdida de peso. Le sigue la etapa de brucelosis subaguda que es la forma típica descrita en áreas endémicas y puede tener una duración que varía entre dos a cuatro meses si no se inicia el tratamiento adecuado. Esta etapa se presenta con fiebre baja intermitente, que da lugar a otro de los nombres de esta enfermedad que es el de fiebre ondulante (45), frecuentemente con compromiso articular, alteraciones hematológicas y daño hepático. El tiempo que transcurre hasta llegar a la última etapa llamada brucelosis crónica, es muy variable; esto puede ocurrir rápidamente o varios meses e inclusive años después de la infección (90). La etapa crónica se suele presentar como un cuadro de fatiga, depresión, mialgia (dolores musculares) entre otros síntomas. En esta etapa es cuando aparecen las complicaciones severas, entre ellas manifestaciones osteoarticulares, como por ejemplo artritis, sacroilitis, espondilitis (91); u otro tipo de manifestaciones como neurobrucelosis, endocarditis o daños en el hígado (71, 79, 92-94). Si bien menos del 2% de los enfermos desarrollan endocarditis, esta complicación constituye la principal causa de muerte de los pacientes (71). *Brucella* puede producir desde manifestaciones clínicas sistémicas relativamente leves, hasta complicaciones severas (94). La variedad de manifestaciones de infecciones agudas y crónicas muchas veces lleva a un diagnóstico erróneo (35). En muchos casos los síntomas de esta

enfermedad hacen que se confunda con gripe, lo que hace que la enfermedad progrese mientras el paciente recibe el tratamiento inadecuado.

Es muy importante tener en cuenta el potencial infeccioso que tienen las bacterias pertenecientes a éste género. Se ha descrito que la dosis mínima infectiva de *Brucella* para humanos es menor si ésta ingresa por la vía respiratoria que por la ruta oral (95). Se ha estimado que para el contagio de humanos vía aerosoles, la dosis mínima infectiva varía entre 10 y 100 bacterias (96). Debido al potencial epidémico, la falta de vacunas para humanos y la posibilidad de infección por aerosoles y alimentos, el género *Brucella* se clasifica como un agente de tipo B por el *Center of Disease Control and Prevention* y por el *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (27, 97, 98). Esta es la segunda categoría en cuanto agentes que podrían ser utilizados para bioterrorismo. Debido a esta clasificación y características de *Brucella*, la agencia de Salud Pública de Canadá, una de las más reconocidas a nivel mundial, indica que las prácticas de laboratorio que impliquen manipulación de cultivos o experimentos con animales; deben realizarse en condiciones de bioseguridad de tipo III (99).

Por otro lado, la cronicidad de la enfermedad se basa en la capacidad de *Brucella* de sobrevivir dentro de las células del hospedador. *Brucella* puede invadir y multiplicarse en una variedad de células, incluyendo células epiteliales, trofoblastos placentarios, células dendríticas y macrófagos (100). Luego de la endocitosis la bacteria se adapta a condiciones intracelulares y supera las defensas del sistema inmune del hospedador (76, 101, 102). Por lo tanto, una vez que se alcanzó la etapa crónica es difícil erradicar la bacteria ya que su estilo de vida intracelular la pone fuera del alcance de la respuesta humoral del sistema inmune, y de varios antibióticos (102, 103). La falta de vacunas seguras y efectivas para humanos así como la falta de un tratamiento específico acentúa la importancia de comprender la biología de la brucelosis para poder desarrollar vacunas para humanos y agentes terapéuticos efectivos.

El tratamiento aplicado en la actualidad para la brucelosis humana involucra una combinación de antibióticos que pueden penetrar en las células (como macrófagos) y actuar en el ambiente intracelular ácido. Estos incluyen doxiciclina, estreptomina, gentamicina, rifampicina, ofloxacina y ciprofloxacina. Los tratamientos pueden extenderse durante largos periodos de tiempo (104, 105), pero no siempre son efectivos (106, 107). El tratamiento recomendado por la OMS establece el uso de doxiciclina en combinación con rifampicina o estreptomina (104), a pesar de que este tratamiento ha presentado una tasa de recaída del 5 al 15% (107).

Distintos grupos de investigación han tratado de mejorar la penetración intracelular de antimicrobianos, uniéndolos a micro o nano-partículas. Por ejemplo un grupo español patentó un método para obtener un complejo iónico de gentamicina y bis-2-etil etil sulfosuccinato de sodio

(108). Estos autores postulan que la unión de los antimicrobianos a las nanopartículas aumentaría el acceso de la gentamicina a la célula del hospedador, permitiendo y mejorando el efecto del antibiótico. Esta alternativa permitiría reducir las dosis de drogas utilizadas en los tratamientos convencionales, lo cual disminuiría la toxicidad del tratamiento.

Dado que una vez que la bacteria se establece en las células del hospedador es muy difícil de erradicar, la prevención de la infección es clave (94). Además de la prevención que involucra evitar el consumo de productos sin pasteurizar y el cuidado al tener contacto con animales enfermos, otra estrategia sería la vacunación de humanos, al menos en los grupos de alto riesgo de infección. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, ninguna de las vacunas aprobadas en la actualidad contra *Brucella* está autorizada para el uso en humanos. Esto se debe principalmente a la virulencia residual en humanos de las cepas vacunales utilizadas en animales y la posibilidad de una reversión de las mutantes a un fenotipo virulento (94). Esta limitación junto con otros inconvenientes de las vacunas que están actualmente en uso para animales, han dado lugar a la investigación de vacunas acelulares (también conocidas como vacunas de componentes). Estas investigaciones se han centralizado en el desarrollo de respuestas citotóxicas que pueden dar lugar al reconocimiento y muerte de las células infectadas y/o a la estimulación de la respuesta de los linfocitos T *helper* (Th1). Esta respuesta induce la secreción de interferón- γ (IFN- γ) que a su vez activa la acción microbicida de los macrófagos. Estudios realizados en el modelo de ratón han confirmado que estas respuestas son eficaces para limitar la infección de *Brucella* (94). Uno de los antígenos que mostró conferir protección es la lumazina sintasa (BLS). Estudios realizados en ratón y ovejas muestran que la vacunación con la proteína quimérica constituida por BLS y un *loop* expuesto de la proteína de membrana externa de *Brucella* Omp31 (Omp por *outer membrane protein*), confiere protección significativa al desafío con *Brucella* viva (109, 110). El uso de BLS como andamio para la presentación de péptidos está protegida bajo patente (111).

Se encontraron otras proteínas de *Brucella* con potencial a ser utilizadas en la vacunación, como por ejemplo algunas proteínas de transportadores de tipo ABC de *B. melitensis* (que son tanto inmunogénicas como protectoras, en modelo de ratón), el polipéptido PotD (codificado por el *locus* BMEII0923 de *B. melitensis*), el cual confirió la misma protección que la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1. El uso de PotD también se encuentra protegido bajo una patente (112).

1.4. Diagnóstico de brucelosis

El único diagnóstico absoluto o definitivo de brucelosis tanto para animales como humanos involucra el aislamiento de *Brucella* a partir de cultivos de sangre, médula ósea u otros tejidos. Sin embargo este método es muy laborioso, se tardan varios días en obtener los resultados e involucra

la amplificación del patógeno. La amplificación del patógeno implica un riesgo de contaminación y además requiere de personal altamente calificado e instalaciones adecuadas, lo cual lo hace inviable como método de diagnóstico de rutina. Existen además pruebas serológicas, que aportan un diagnóstico presuntivo (48). Las pruebas serológicas se pueden dividir en dos categorías: directas, las cuales evidencian la presencia de la bacteria o sus componentes, e indirectas, que detectan la presencia de anticuerpos que se generan en pacientes infectados. Muchas pruebas serológicas muestran la aglutinación de anticuerpos específicos, como por ejemplo: i) el Test de aglutinación sérica (SAT), en el que se detectan anticuerpos de las clases IgG e IgM (la incorporación de 2-mercaptoetanol en el tubo inactiva los anticuerpos de clase IgM, y proporciona así el título específico de los anticuerpos de clase IgG); ii) la prueba de rosa de bengala que detecta anticuerpos IgM e IgG₁ y iii) la prueba de Coombs que detecta tanto anticuerpos completos como incompletos de clase IgG. Otro tipo de prueba serológica es la de Fijación de complemento (CFT), la cual se basa en que la presencia de anticuerpos en el suero fija el complemento, previniendo la lisis de eritrocitos sensibilizados. Se considera que éste método es más sensible que las pruebas de aglutinación porque da menos reacciones inespecíficas, y es la prueba de referencia internacional.

En las distintas etapas de la brucelosis predominan distintos tipos de anticuerpos, los primeros anticuerpos que se generan son de tipo IgM. Luego aparecen de forma progresiva los de clase IgG e IgA. Transcurridos los primeros meses se observa una disminución de los anticuerpos clase IgM aún en los enfermos no tratados (48). Un problema general de las pruebas serológicas es la reactividad cruzada y el tipo de anticuerpo que predomina en cada etapa (tipo IgM o IgG), los cuales pueden ser aglutinantes o no. Por este motivo, no se obtiene un buen diagnóstico con una única prueba (48). En un estudio de diagnóstico de brucelosis humana, se utilizaron 911 sueros de personas infectadas. Del total de sueros, 341 pertenecían a una población asintomática, y al ser evaluados por pruebas serológicas convencionales dieron negativo. Esto evidencia lo difícil que resulta el diagnóstico de brucelosis (113). Para un correcto diagnóstico serológico de brucelosis humana es recomendable efectuar por lo menos una prueba de aglutinación y una prueba de Coombs, o alguna prueba de interacción primaria (por ejemplo ELISA), que permita la detección de los distintos tipos de anticuerpos presentes (114), y así poder además estimar el período de la infección. Al igual que en humanos, para la mayoría de los animales se obtiene un buen diagnóstico combinando dos o más pruebas serológicas. En particular, en porcinos las pruebas serológicas no permiten obtener un buen diagnóstico, aún combinando sus resultados. Es por eso que para cerdos el único diagnóstico implica el aislamiento del patógeno.

2. Patogénesis de *Brucella*

2.1. Etapas iniciales de la infección y tráfico intracelular

En las etapas iniciales de la infección en humanos, *Brucella* se une a las mucosas, como las que están presentes en las vías nasales, respiratorias o digestivas y penetra a través de ellas (66, 71). Luego atraviesa el epitelio y se traslada hacia los linfonódulos locales, en donde invade neutrófilos y macrófagos. Una vez dentro de los fagocitos, las bacterias están protegidas del sistema inmune y proliferan. Cuando el número de bacterias dentro del fagocito es muy elevado (generalmente entre la primer y séptima semana post-exposición), se produce la ruptura de las células eucariotas y las bacterias se liberan a sangre circulante produciéndose una bacteremia. Luego de colonizar macrófagos ubicados en ganglios linfáticos y producirse la bacteremia, *Brucella* se disemina hacia un gran número de órganos y sistemas, tales como hígado, bazo, médula ósea, glándulas mamarias, órganos sexuales y glándulas salivales (115). Esto da lugar a las distintas complicaciones de la etapa crónica de la enfermedad previamente mencionadas (ver secciones 1.2. y 1.3.).

Como se mencionó anteriormente, *Brucella* es un patógeno intracelular facultativo capaz de invadir y replicar en fagocitos profesionales (116), así como también en células no fagocíticas (106, 117). *Brucella* infecta macrófagos, células epiteliales, células dendríticas, fibroblastos, osteoblastos, sinoviocitos, entre otros tipos celulares (118-120). Para poder invadir y sobrevivir dentro de estas células, la bacteria hace uso de una estrategia única en la que modifica el proceso de maduración de los fagosomas en la que inhibe la fusión de lisosomas a la vacuola que la contiene, estableciendo un nicho celular en donde se multiplica (121-123). Las bacterias ingresan a la célula en un macropinosoma (vesícula), proceso que depende de la presencia de *rafts* lipídicos (balsas lipídicas) ricos en GM1 y colesterol de la célula (124, 125) y del lipopolisacárido (LPS) de *Brucella* (126). Una vez dentro de la célula, *Brucella* inhibe la fusión de la vacuola que la contiene con lisosomas (120, 123, 127, 128). Las vacuolas que contienen a *Brucella* (BCV, por *Brucella containing vacuole*) interactúan transitoriamente con endosomas tempranos (120, 128) adquiriendo el marcador lisosomal LAMP-1 pero sin fusionarse a estos (129). Posteriormente, la activación de la bomba de protones V-ATPasa celular disminuye el pH de la BCV, siendo este cambio en el pH una señal esencial para la activación de varios genes de virulencia de *Brucella* spp. (130). Mediante la intervención de la bacteria, la BCV redirecciona la vía fagocítica normal inhibiendo la interacción con lisosomas. El escape a la fusión lisosomal por parte de *Brucella* es dependiente del sistema de secreción de proteínas tipo IV VirB (ver sección 2.2.d.) y de la síntesis de los glucanos cíclicos (ver sección 2.2.c.), entre otros factores (131). Durante la maduración, la BCV interacciona con el retículo endoplásmico, un proceso que también es dependiente de VirB, y así la BCV pasa a

ser una BCV “multimembranosa” con marcadores de retículo endoplásmico. Recién en esta BCV madura la bacteria puede replicar (120, 128, 129, 132, 133). Mediante este mecanismo, *Brucella* evade los mecanismos naturales que tiene la célula para lidiar con los patógenos y logra establecerse en su nicho replicativo. En la figura 3 se muestra un modelo del tráfico intracelular de *Brucella*.

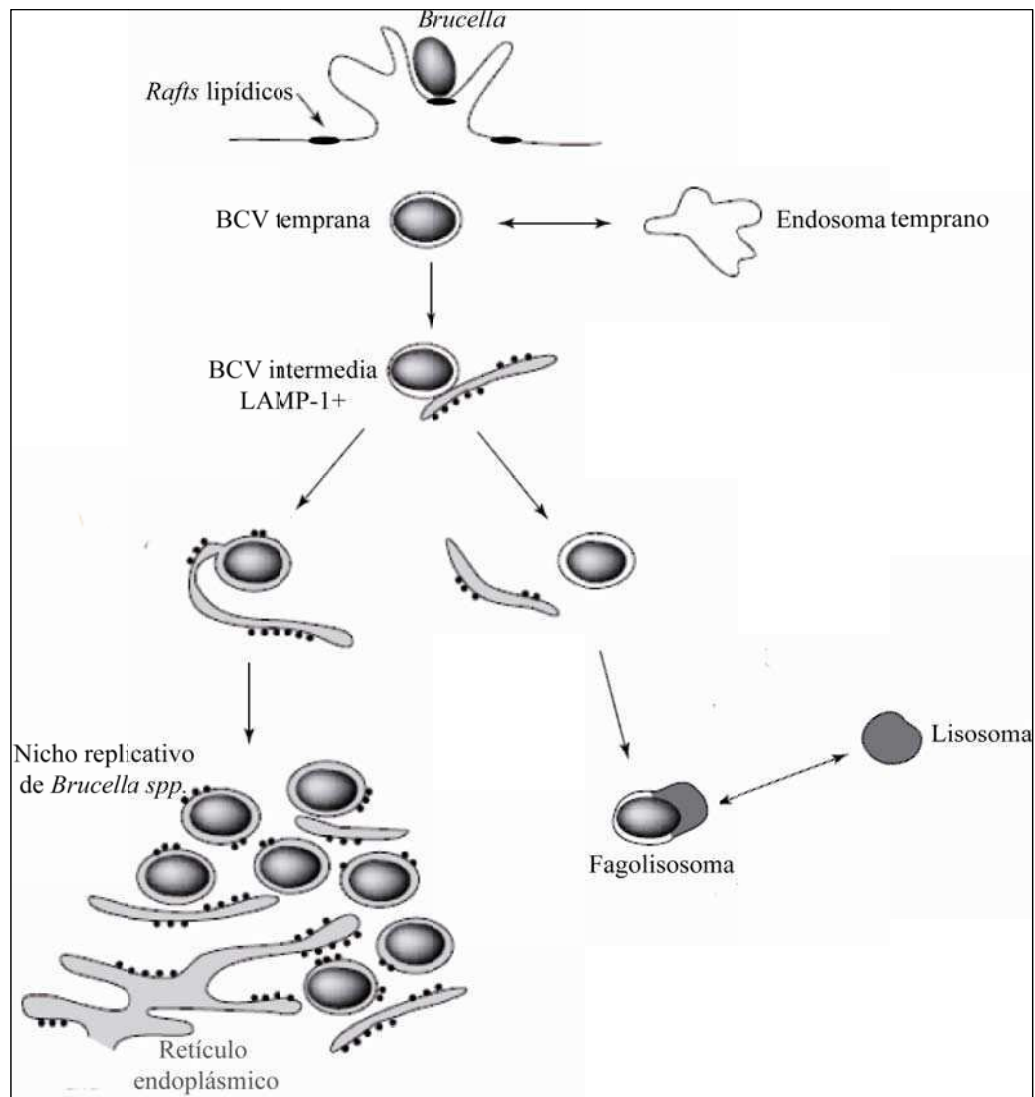


Figura 3. Modelo de replicación intracelular de *Brucella* spp.

Las bacterias ingresan a las células en un proceso dependiente de la interacción con *rafts* lipídicos. *Brucella* se localiza en vacuolas llamadas BCV que interactúan con endosomas tempranos adquiriendo el marcador lisosomal LAMP-1. Estas vacuolas interactúan con el retículo endoplásmico y maduran convirtiéndose en el nicho replicativo de *Brucella* (128). Durante el proceso de maduración, la BCV adquiere marcadores de retículo endoplásmico. En cambio, ciertas mutantes (por ejemplo en *virB*) que no pueden inducir la maduración de la BCV, mueren debido a que las BCV que las contienen son eventualmente fusionadas con lisosomas (128). Modificado de Celli y col (129).

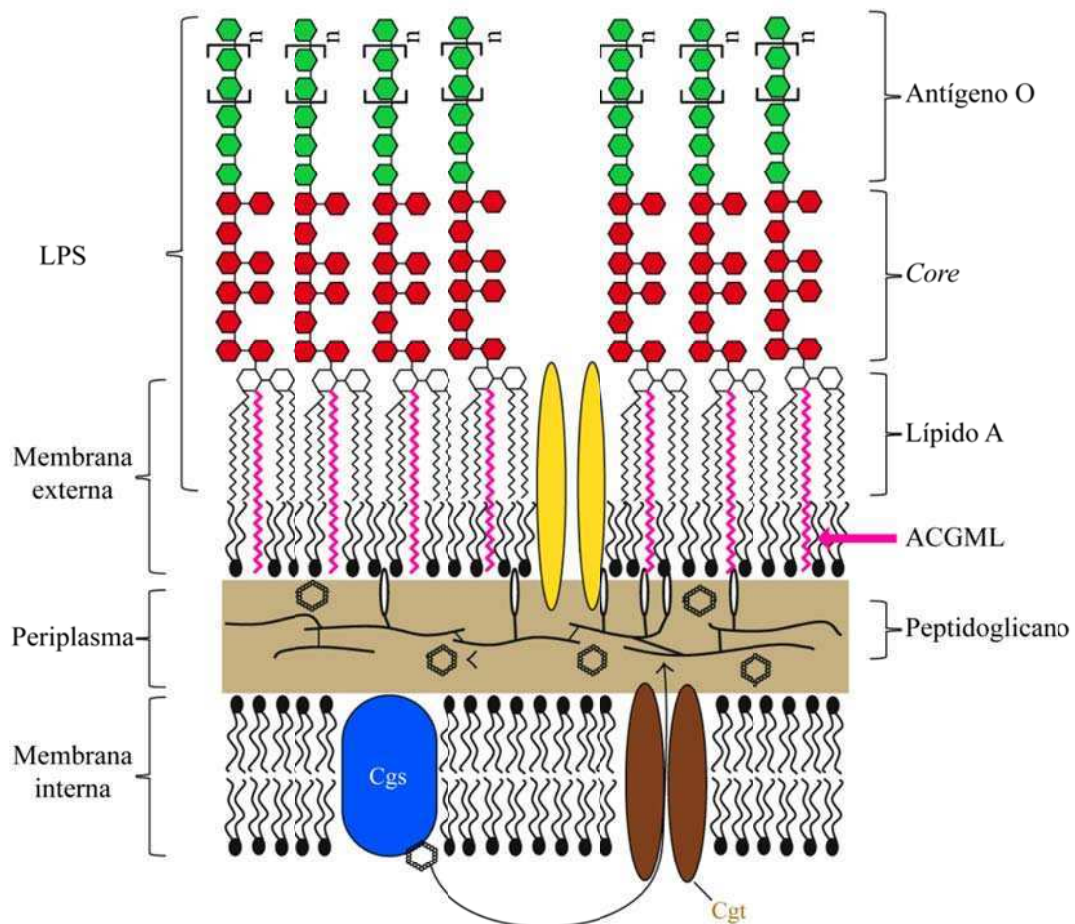
2.2. Factores de virulencia de *Brucella*

Los factores producidos por un microorganismo patógeno que dan lugar a una infección son llamados factores de virulencia. Estos factores le permiten a la bacteria: i) colonizar al hospedador, ii) mediar la adhesión e invasión a las células, iii) evadir las defensas del hospedador e iv) inhibir la respuesta inmune, entre otras funciones (134). Algo que distingue a *Brucella* de otros patógenos es que no se han descrito factores de virulencia clásicos capaces de dañar directamente a las células eucariotas, como son las exotoxinas. Tampoco expresa determinantes patogénicos como cápsula, fimbrias, plásmidos, inductores apoptóticos ni fagos lisogénicos (135, 136). Sin embargo, *Brucella* despliega una serie de mecanismos que le permiten evadir la respuesta tóxica liberada por las células y alcanzar su nicho replicativo. La falta de factores capaces de dañar directamente las células del hospedador, sugiere que la bacteria induce daño tisular de modo indirecto, probablemente a través de la activación de mecanismos de la respuesta inmune del hospedador, después del reconocimiento de antígenos de *Brucella* por receptores del sistema inmune. Examinaciones histológicas de tejidos de humanos y animales infectados revelaron la presencia de infiltrados inflamatorios en las lesiones (94). Estas observaciones parecen contradecir la hipótesis que sostiene que *Brucella* regula negativamente la inflamación. Sin embargo, ambos conceptos no son contradictorios ya que el potencial inflamatorio de *Brucella* es débil comparado con el de otros patógenos. Probablemente, el secreto de la patogénesis de *Brucella* resida en su habilidad de establecer infecciones crónicas en determinados tejidos “blanco”, induciendo una inflamación relativamente pobre pero permanente (94). A continuación se describirán los principales factores bacterianos que influyen sobre la virulencia de *Brucella* spp. en sus hospedadores.

a. Particularidades del LPS y de la membrana externa de *Brucella* y su rol en la patogenicidad

La membrana bacteriana actúa como medio de defensa y control de la interacción con el hospedador. Uno de los principales componentes de la membrana externa (ME) en bacterias Gram negativas es el LPS, el cual se encuentra anclado en la membrana externa a través de su porción lipídica. El LPS está constituido por tres partes: el lípido A (porción del LPS asociado a la bicapa lipídica), el núcleo ó *core* polisacárido y la cadena o antígeno O (Figura 4). *Brucella* expresa un LPS de composición particular. Esta característica se refleja en una superficie con menor carga (negativa) global al de la mayoría de los LPSs y una mayor hidrofobicidad. El lípido A de *Brucella* spp. consiste en un glicolípido que contiene un esqueleto de azúcares (glucosamina y diaminoglucosa) con sustituciones de ácidos grasos de longitud de cadena variable en sus grupos amino e hidroxilos. El lípido A de *Brucella* tiene la característica de estar formado por ácidos

grasos de cadenas mucho más largas (C19-C28) que aquellos presentes en los LPSs de enterobacterias (C12-C16), lo cual lo hace más hidrofóbico (137). Por otro lado, el *core* polisacárido de *Brucella* también es particular ya que contiene glucosa, manosa y ácido 3, deoxi-D-mano-2-octulosónico, pero no contiene heptosas ni fosfatos como muchas otras bacterias. Además, a diferencia de lo que ocurre en otras α -2 Proteobacterias, como *Ochrobactrum*, el *core* del LPS de *Brucella* no posee ácido urónico (azúcar de carga negativa), lo que contribuiría a una baja carga negativa de su LPS (8). El antígeno O del LPS de *Brucella* es un homopolímero lineal de aproximadamente 100 subunidades de azúcares compuesto por residuos de N-formil perosamina (4,6 dideoxi-4-formamido- α -D manopiranosilo) (48, 137-140). El gran tamaño del antígeno O contribuye a enmascarar las escasas cargas provistas por el *core* y el lípido A.



⬡ Glucanos cíclicos

Figura 4. Esquema de la envoltura de *Brucella* spp.

La envoltura de las células comprende la membrana interna que consiste en una bicapa de fosfolípidos; la membrana externa con una cara interna de fosfolípidos y una cara externa en la cual se encuentra anclado el LPS; y entre ambas el periplasma. El LPS de las cepas lisas está constituido por el lípido A, el núcleo polisacárido

(core) y el antígeno O. El LPS de las formas rugosas carece del antígeno O o está reducido a muy pocos residuos. El lípido A contiene un esqueleto de azúcares, el cual se encuentra acetilado con ácidos grasos muy particulares ya que presentan una cadena muy larga (en la figura indicados como AGCML por ácidos grasos de cadena muy larga). El LPS junto con proteínas integrales de membrana y la bicapa lipídica conforman la membrana externa. Los glucanos cíclicos son sintetizados por proteínas de la membrana interna (Cgs), y luego transportados al periplasma por transportadores (Cgt). Modificado de Haag y colaboradores (141)

En muchas bacterias Gram negativas las cargas negativas del LPS son estabilizadas mediante la interacción con cationes bivalentes, lo cual confiere estabilidad a la ME (8). Sin embargo, las características particulares del LPS de *Brucella*, hacen a esta bacteria resistente a quelantes de cationes bivalentes, lo cual indica que estos cationes no serían importantes para la estabilidad de la membrana externa. Se ha postulado que la ausencia de la estabilización dada por estos cationes se compensa por las interacciones hidrofóbicas del LPS y el fuerte anclaje a la membrana debido, en parte, a la mayor hidrofobicidad de la membrana (142, 143).

El LPS es uno de los principales factores de virulencia no clásicos de *Brucella*. Dada su estructura “no canónica”, las actividades biológicas inducidas por su LPS son cuanti- y cualitativamente diferentes a las del LPS “clásico”, como por ejemplo el de las enterobacterias (144, 145). El LPS de *Brucella* presenta una baja toxicidad (146) y es un pobre estimulador de la división celular de linfocitos B (94). En cuanto a la inducción de mediadores pro-inflamatorios, la actividad biológica del LPS de *Brucella* es al menos 3 órdenes de magnitud inferior a la del LPS de las enterobacterias (147, 148). La estructura particular del lípido A del LPS le permite evadir la detección por receptores implicados en la respuesta innata de tipo TLR4 (un tipo de *Toll-like receptor*) (149, 150). Una segunda característica anti-inflamatoria del LPS de *Brucella* es que genera una pobre activación del complemento (145). Por otro lado, el LPS de *Brucella* cumple funciones particulares, interviniendo en el control del tráfico intracelular (ver sección 2.1.), en el control de la respuesta inmune de la célula hospedadora e inhibiendo la presentación antigénica por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad de tipo II (MHCII) con la consiguiente disminución en la activación de linfocitos T (126, 146). En particular, se ha observado que el antígeno-O del LPS inhibe la apoptosis de los macrófagos invadidos, beneficiando a la bacteria (151).

La presencia o ausencia de la cadena O del LPS lleva a la clasificación de cepas de *Brucella* en lisas (LPS con antígeno O) o rugosas (ausencia total o parcial del antígeno O). La mayoría de las especies (incluyendo *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*) son naturalmente lisas, mientras que *B. canis* y *B. ovis* son naturalmente rugosas (8). Una gran cantidad de trabajos publicados indican que las cepas rugosas son incapaces de subsistir en ratones y están afectadas en la replicación en los modelos celulares de macrófagos J774 *in vitro* (152, 153). Sin embargo, *B.*

canis y *B. ovis* son infectivas en sus hospedadores naturales; incluso *B. canis* ha mostrado ser virulenta en humanos (77, 154). El LPS de las cepas lisas es el antígeno más importante de la superficie celular de *Brucella*, en particular el antígeno O es la sección serológica inmunodominante (8).

Se ha demostrado que el LPS de *B. abortus* tiene una menor capacidad de unión al lipopéptido catiónico polimixina B que el de otras especies como *E. coli* y *S. enterica* (142, 155) y que esta reducción estaría causada, al menos en parte, justamente por el bajo número de grupos aniónicos fosfato presentes en el lípido A (155). Por otro lado, la presencia o ausencia del antígeno O modifica profundamente la topología de la superficie de *Brucella*. Su presencia enmascara los grupos iónicos de las proteínas, del lípido A y del *core* polisacárido. Es por este motivo que las mutantes defectivas en el antígeno O (rugosas) tienen una carga superficial negativa (a pH fisiológico), mientras que las cepas lisas tienen muy poca carga (156, 157). Por lo tanto, el acceso a los grupos aniónicos del lípido A se encuentra estéricamente poco accesible en las cepas lisas, lo cual contribuye con la resistencia a péptidos catiónicos en general. Además, se ha observado que *B. ovis* (especie naturalmente rugosa) y mutantes rugosas de *B. abortus* son menos tolerantes a dichos péptidos que las cepas lisas, lo cual apoya la idea que la falta del antígeno O repercute en las diferencias de permeabilidad de la membrana (158).

Se ha observado que los cultivos *in vitro* de *Brucella* pueden sufrir variaciones en su morfología (de lisas a rugosas) que se acompañan por alteraciones en la estructura antigénica, la susceptibilidad a fagos y en su virulencia. A este proceso se lo ha denominado disociación. El efecto de la disociación es la pérdida total o reducción de la porción de antígeno O expuesto en el LPS. A nivel molecular, la disociación se produce por una menor expresión de genes que codifican la glucosilación adicional de las porciones polisacáridicas del LPS, como por ejemplo *wboA* que codifica una glicosil transferasa clave en el ensamblado del antígeno O (151).

La composición lipídica de las membranas de *Brucella* spp. también posee características particulares; el fosfolípido mayoritario es la fosfatidilcolina, un fosfolípido común en eucariotas pero poco frecuente en bacterias (159). Las propiedades estructurales proporcionadas por la fosfatidilcolina son distintas a las de la fosfatidiletanolamina, fosfolípido mayoritario en muchas otras Gram negativas. En ensayos *in vitro*, la fosfatidilcolina forma bicapas más estables (8). Se ha demostrado que su síntesis ocurre a partir de colina suministrada por el hospedador y que su presencia es necesaria para la colonización de ratones BALB/c (160). Las características particulares de los lípidos de membrana de *Brucella* contribuyen a que la bacteria sea considerablemente permeable a compuestos hidrofóbicos pero poco permeable a péptidos catiónicos (142, 143, 155, 161, 162). Otros componentes de la ME de *Brucella* relevantes en la

virulencia son las Omps (163, 164). Mutantes en distintas Omps (por ejemplo Omp10 y Omp19) han mostrado ser atenuadas en ratón (165).

Distintos autores han sugerido que la estrecha relación entre la membrana externa particular de la bacteria, con su estilo de vida, hacen que ésta membrana sea clave para la virulencia de la bacteria (8).

b. Otros factores que confieren resistencia a la respuesta inmune del hospedador

Otros sistemas que confieren a *Brucella* resistencia a la respuesta inmune innata son: la súper óxido dismutasa (166), una catalasa (167), vías metabólicas de desnitrificación (168), la hidrolasa de sales biliares Cgh (169) y la prolina racemasa PrpA (90).

c. Glucanos cíclicos

Brucella produce, como sus parientes cercanos *Agrobacterium*, *Sinorhizobium meliloti* y *Rhizobium*, glucanos cíclicos β 1,2 que se acumulan fundamentalmente en el periplasma de la bacteria (Figura 4). La sintetasa (llamada Cgs en el caso de *Brucella*) es una proteína multifuncional responsable de todas las actividades enzimáticas (iniciación, elongación, ciclización y fosforólisis) necesarias para la síntesis de los glucanos cíclicos (170-172). En *Rhizobium* y *S. meliloti*, la síntesis de estos glucanos son necesarios para la fijación simbiótica de nitrógeno (173). En el caso de *Brucella*, los glucanos son importantes para la virulencia en diferentes modelos (174). Se propuso que los glucanos actúan sobre la membrana de la célula del hospedador a nivel de las balsas lipídicas, ayudando a prevenir la fusión de la BCV con lisosomas y alcanzar así la vacuola derivada del retículo endoplásmico en donde ocurre la replicación masiva (131). Como es esperable, mutantes en la sintetasa muestran una virulencia reducida en varios modelos (174). Curiosamente, evidencias recientes muestran que los glucanos cíclicos son potentes activadores de las células dendríticas, lo que induce una respuesta *in vivo* CD8 \pm T específica de antígeno. Además, los glucanos aumentarían las respuestas de células T, CD4 \pm y CD8 \pm específicas de antígeno (175). Estas observaciones convierten a los glucanos cíclicos en posibles adyuvantes en la formulación de vacunas.

d. Sistema de secreción VirB: un factor de virulencia crucial para la vida intracelular

Una excepción a la “falta de factores de virulencia clásicos” utilizados por *Brucella* spp. es el sistema de secreción tipo IV, VirB (ver sección 2.1.). Este sistema se encuentra codificado en un operón de 12 marcos abiertos de lectura (ORFs, por *open reading frames*) nombrado por

homología al sistema homónimo de *A. tumefaciens* responsable de la translocación del complejo-T a la célula hospedadora (176). Los sistemas de secreción tipo IV han sido descritos en otras bacterias patógenas como *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila* y *Helicobacter pylori* (176, 177). El sistema VirB de *Brucella* spp. es indispensable para el correcto tráfico intracelular de la bacteria ya que está involucrado en la maduración de la vacuola que contiene *Brucella* (BCV) en una organela en la cual *Brucella* puede replicar (Figura 3) (132, 178, 179). Mutantes en el sistema VirB presentan un menor ingreso a la célula hospedadora, no son capaces de sobrevivir ni replicar en el medio intracelular y tampoco son capaces de infectar ratones BALB/c (128, 179, 180). Además, por vías aún no comprendidas VirB provoca una respuesta inflamatoria en células infectadas (181).

En varios patógenos, los sustratos transportados por los respectivos sistemas tipo IV han sido identificados y asociados a los fenómenos de virulencia (182). Sin embargo, hasta hace relativamente poco tiempo se desconocían los sustratos del sistema VirB de *Brucella*. Se han identificado algunas proteínas que serían translocadas a las células eucariotas de modo dependiente de VirB, pero se en general desconocen sus funciones (183, 184). Los primeros sustratos identificados fueron VceA y VceC. Recientemente se determinó que VceC induce inflamación a través de la inducción de estrés del retículo endoplásmico (181). Otro sustrato identificado de VirB es RicA, el cual interactúa con GDP y Rab2 unidos entre sí, evitando el reclutamiento de Rab a la BCV, lo que a su vez afecta el tráfico intracelular (185). Otro sustrato de VirB llamado SepA también estaría involucrado en el tráfico celular. Si bien la cepa mutante presenta una mayor capacidad de invasión que la cepa silvestre; presenta además un defecto en etapas tempranas de la replicación intracelular tanto en fagocitos profesionales como no profesionales (186). Esto se debe a que SepA evitaría la fusión de la BCV con lisosomas (186). Cabe destacar que no se encuentran homólogos de esta proteína fuera del género *Brucella* (186). Por último se ha descrito que un subgrupo de proteínas translocadas por VirB llamadas BspA, BspB y BspF, inhiben la capacidad de secreción de la célula eucariota a la cual han sido translocadas. Mutantes simples o combinadas en *bspA*, *bspB* y *bspF* presentan afectadas la capacidad de replicación en macrófagos y la persistencia en hígado de ratones infectados (187). Estos resultados sugieren que *Brucella* modula la capacidad de secreción de la célula infectada vía efectores translocados por VirB, que actúan de modo coordinado promoviendo la patogénesis de la bacteria (187).

e. Sistema de dos componentes BvrR/BvrS

Otro factor de virulencia de *Brucella* involucrado en la supervivencia intracelular es el sistema de dos componentes BvrR/BvrS. Este sistema está compuesto por una histidina quinasa sensora localizada en la membrana celular (BvrS), y un regulador transcripcional citoplasmático (BvrR). Se ha descrito que el sistema BvrR/BvrS participa en la homeostasis de la ME controlando la estructura del LPS y la expresión de Omps (188-190). Estas observaciones son relevantes ya que la mayoría de los determinantes de patogenicidad de *Brucella* parecen estar concentrados o actuar en la superficie bacteriana (135). Mutantes en BvrR/BvrS presentan una mayor sensibilidad a péptidos bactericidas y al complemento, son deficientes en la invasión celular, tienen un tráfico intracelular alterado y además se ha observado que no son virulentas en ratón (191). Dentro de los genes regulados por éste sistema de dos componentes se encuentran los que corresponden a VirB, con todas las implicancias que éste sistema de secreción implica en la virulencia de *Brucella* (192) (ver sección 2.2.d.).

f. Sistemas de detoxificación

Durante la interacción con los sistemas de defensa del hospedador, *Brucella* se enfrenta con distintas fuentes de estrés ambientales. Los mecanismos por los cuales la bacteria se detoxifica y supera estas fuentes de estrés han sido poco estudiados. En *B. melitensis* se ha caracterizado un transportador de expulsión perteneciente a la superfamilia MATE, llamado NorMI. Este transportador es una proteína integral de membrana interna que funciona como *antiporter* de Na⁺ (193). Por otro lado, nuestro grupo de trabajo describió que *B. suis* alberga sistemas de eflujo de tipo RND, dependientes de la proteína de membrana externa BepC, que también contribuirían a la detoxificación de la bacteria y a su virulencia (194, 195).

3. Adhesión a componentes del hospedador

3.1. Importancia de la adhesión e invasión en patógenos

La capacidad de los microorganismos de colonizar y multiplicarse en un tejido específico del hospedador es un prerrequisito para poder establecer una enfermedad infecciosa. La internalización a células de mamíferos es una estrategia común, utilizada por muchas bacterias patógenas que les permite colonizar al hospedador (196). Los patógenos intracelulares deben primero adherirse a la superficie celular, y mantener esa asociación con el tejido del hospedador (197). Esta etapa es crítica en el proceso de infección ya que evita la eliminación de la bacteria de

los tejidos, sobre todo para patógenos como *Brucella* spp., y *Yersinia* spp. que primero colonizan áreas que están continuamente lavadas por fluidos, movimientos peristálticos o por acción de cilios presentes en las superficies mucosas de las vías digestiva y respiratorias. Por otro lado, el recambio de células epiteliales de estas superficies es bastante rápido; por ejemplo, la monocapa de células epiteliales intestinales se repone continuamente, renovándose aproximadamente cada 48 horas (134). Tal es la importancia de la adhesión, que incluso se ha propuesto que la inhibición de la adhesión bacteriana a distintos componentes del hospedador tendría un potencial terapéutico (198).

Para adherirse a las células del hospedador, las bacterias patógenas expresan moléculas asociadas a la superficie llamadas adhesinas que en muchos casos reconocen directamente proteínas de la superficie celular eucariota u otros componentes de la superficie (por ejemplo carbohidratos), mediando una fuerte asociación con la célula del hospedador. En cambio, otras adhesinas se adhieren de modo indirecto a la célula hospedadora al unirse a productos de secreción de esta u otra célula, como por ejemplo proteínas de la matriz extracelular, que si bien están unidas a la membrana plasmática no son parte integral de la misma (199). En la figura 5 se pueden observar los esquemas representativos de ambos tipos de interacción: en un caso el reconocimiento de la célula A por parte de la célula B sería directo, la adhesina de la célula B reconoce directamente al receptor presente en la superficie de la célula A. En el segundo caso el reconocimiento sería indirecto: la adhesina de la célula D reconoce a la célula C vía una molécula intermediaria (en amarillo).

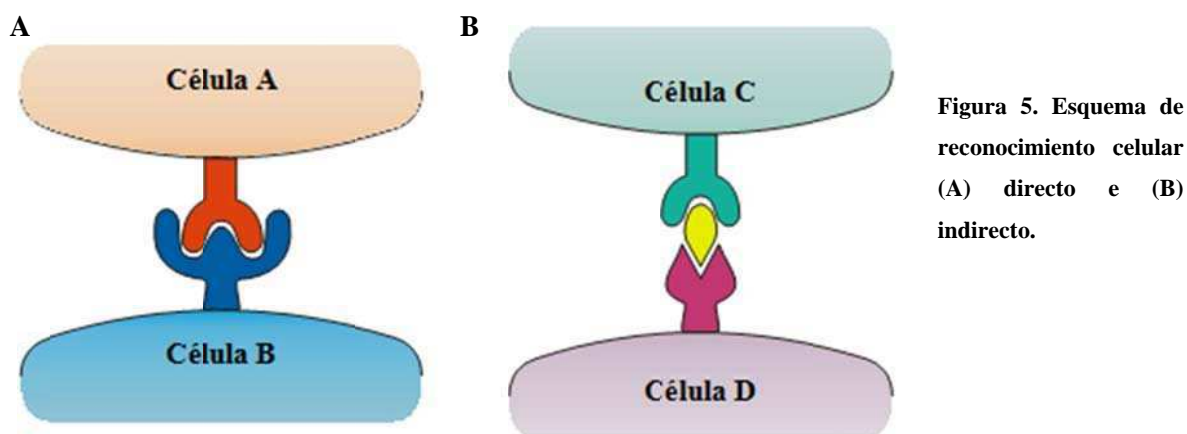


Figura 5. Esquema de reconocimiento celular (A) directo e (B) indirecto.

En muchos casos la adhesión está mediada por una o más adhesinas que pueden actuar simultáneamente o en distintas etapas del proceso de infección (200). Además de estructuras extracelulares como fimbrias o *pili*, se han descrito un considerable número de adhesinas no poliméricas que reconocen distintos elementos sobre la superficie de la célula eucariota, incluyendo componentes de la matriz extracelular como colágeno, proteoglicanos, lamininas, hialuronos y

glicoproteínas adhesivas como fibronectina y vitronectina. Los receptores de la membrana celular como integrinas y cadherinas pueden interactuar con algunas de estas adhesinas mediando la unión o internalización de la bacteria (201).

Muchas bacterias patógenas han adoptado estrategias para adherirse y además invadir eficientemente células no fagocíticas (200, 202, 203). Esta estrategia les permite tanto multiplicarse en un nicho protegido (204), como tener acceso a otros tejidos del hospedador (204, 205). El estilo de vida intracelular confiere ventajas al patógeno ya que no necesita invertir tantos recursos en mecanismos de adhesión que le permitan permanecer en el sitio de infección, y están protegidos del sistema inmune y eventualmente de antibióticos. Incluso, los patógenos intracelulares tienen acceso a una amplia variedad de nutrientes presentes en el citoplasma celular (206). La vida intracelular requiere de determinantes de virulencia apropiados, no solo para ingresar en la célula sino también para tolerar el ambiente intracelular (207).

La invasión de patógenos intracelulares puede ocurrir por contacto directo con receptores celulares (como integrinas) o por translocación directa de efectores bacterianos al citosol de la célula hospedadora, lo cual promueve rearrreglos de la membrana y luego la entrada de la bacteria (201). Dado que la adhesión del microorganismo a la superficie celular y su entrada a la célula están muy ligados, no es sorprendente que muchas adhesinas también actúen como invasinas (199).

Por otro lado, la interacción con las moléculas del hospedador le da a la bacteria tropismo a determinadas células y le permite al patógeno infectar ciertos tejidos y/u órganos específicos. Es decir, en función de las adhesinas presentes en la superficie bacteriana ésta se adherirá a las células del hospedador de modo selectivo, colonizando las que expresen los receptores/ligandos reconocidos por sus adhesinas, lo cual determina los tejidos y órganos infectados por el patógeno (199, 208). Es más, la mayoría de las bacterias patógenas expresan múltiples adhesinas, que pueden actuar sinérgicamente, reforzando su función (200). También pueden expresarse diferencialmente, reguladas por distintas señales ambientales (209). La síntesis de diversos tipos de moléculas de adhesión, cada una de ellas regulada por distintos estímulos y/o en distintas etapas del ciclo de vida bacteriano, podría permitir la modulación del ciclo infeccioso dentro del hospedador. En el caso de *Brucella*, la invasión de tejidos del hospedador es aparentemente un proceso complejo que consiste en muchos pasos entre los que se suceden interacciones específicas e inespecíficas. Como se mencionó anteriormente (sección 1.1.), durante la infección, *Brucella* debe atravesar una capa de células epiteliales y en este proceso necesita invadir estas células. Su entrada a las células epiteliales es un evento transitorio que da lugar a la infección de macrófagos. Se puede predecir que en estadios posteriores de la infección, la bacteria se adherirá e invadirá células de una gran variedad de tejidos y órganos.

3.2. Adhesinas

Antiguamente se creía que la adhesión a las células del hospedador servía únicamente para que la bacteria colonizara el sitio y evitara el *clearance* por secreciones mucosas y movimientos peristálticos. Sin embargo, es claro ahora que las adhesinas bacterianas dependen de interacciones con su ligando para mediar una serie de eventos de señalización que pueden afectar la adhesión y/o invasión bacteriana y/o promover eventos pro o anti-inflamatorios al interactuar con receptores del sistema inmune innato (210). Una gran cantidad de adhesinas interactúan con ligandos solubles presentes en el suero. Si bien estos eventos de adhesión no son estrictamente interacciones del tipo adhesina-ligando, este contacto tiene un rol muy importante durante la invasión bacteriana, por ejemplo evadiendo la deposición del complemento (211), o por unión de componentes del suero implicados en coagulación, liberación de moléculas pro-inflamatorias, y generación de productos que actúan como péptidos antimicrobianos (212).

Dentro de las adhesinas bacterianas las históricamente más estudiadas han sido las adhesinas multiméricas llamadas fimbriales o *pili*. Sin embargo en los últimos años se han identificado una gran cantidad de adhesinas no fimbriales unidas a la superficie. Algunas de éstas, pero no todas, son filamentosas (210). Dentro de las adhesinas fimbriales presentes en bacterias existen distintos tipos de *pili* como los de tipo I (por ejemplo FimH de *E. coli* (213)) y los de tipo IV (como por ejemplo Pil de *N. gonorrhoeae* o Spa de *Clostridium perfringens*), y las llamadas *curli* las cuales no suelen tener un ligando específico (como Csg de *Salmonella enterica*) (210). Dentro de las no fimbriales se encuentra la familia de los Autotransportadores, detallada en la siguiente sección (3.2.a.)

3.2.a. Autotransportadores (Sistema de secreción tipo V)

La secreción de proteínas es esencial para una enorme variedad de funciones. Para translocar proteínas a través de la membrana interna, las bacterias Gram negativas suelen utilizar vías dependientes de la maquinaria Sec (214, 215). Otros sistemas de secreción a través de la membrana interna son dependientes de otras rutas como Tat (por sus sigla en inglés, *Twin-Arginine Translocase*) y la ruta SRP (por sus sigla en inglés, *signal recognition particle*) (216, 217). El destino de la proteína translocada a través de la membrana interna es amplio. Muchas proteínas tendrán como destino final el espacio periplásmico, otras utilizarán este espacio como “de paso”. Las proteínas cuyo destino final es la superficie celular o el medio extracelular deben, además, atravesar la ME. Para ello, las bacterias han desarrollado varios sistemas de secreción, algunos de los cuales prescinden de las maquinarias que median el transporte a través de la membrana interna, ya que integran el transporte tanto a través de la membrana interna como de la externa (218).

La secreción de proteínas de superficie o extracelulares en Gram negativas tiene al menos cinco vías principales enumeradas del I al V, las cuales están muy conservadas. Los sistemas de secreción de tipo I son independientes de la maquinaria Sec y la translocación a través de ambas membranas de la proteína a translocar (proteína efectora) ocurre en un único paso. Estos sistemas consisten en tres proteínas: una proteína de membrana externa que forma un poro, una proteína de fusión de membranas (MFP) y una proteína de membrana interna que une ATP (ABC) (218). Los sistemas de secreción tipo II secretan sus sustratos en dos pasos, utilizando en el primero la maquinaria Sec. El transporte a través de la membrana externa requiere más de 10 proteínas accesorias. Los sistemas de secreción tipo III al igual que los de tipo I, translocan la molécula efectora a través de ambas membranas en un único paso, independientemente de la maquinaria Sec. Una de las características más llamativas de estos sistemas de secreción es la capacidad de dirigir las moléculas efectoras directamente al interior de células eucariotas. Estos sistemas están compuestos por múltiples proteínas, llegando a un número de 25. En referencia a los sistemas de secreción tipo IV aún no hay un consenso en cuanto a cómo atraviesa la molécula efectora la membrana interna. Al igual que los sistemas de tipo III, los sistemas tipo IV son capaces de dirigir la molécula efectora al medio intracelular de la célula hospedadora y también comprenden un alto número de proteínas (218). Un ejemplo de este tipo de sistemas es el previamente descrito, VirB (sección 2.2.d.). Estos sistemas de secreción (del I al IV) implican el gasto de energía por parte de la bacteria (218).

Los sistemas de secreción de tipo V corresponden a los autotransportadores (ATs) (218). Éstos se caracterizan porque las propias proteínas median su transporte al medio extracelular, es decir que un único gen puede codificar todos los componentes requeridos para su propia secreción. La secreción al medio extracelular consta básicamente de dos pasos; las proteínas contienen un péptido señal reconocido por la maquinaria Sec, el cual les permite atravesar la membrana interna (219). Una vez en el periplasma, son translocados a través de la membrana externa por un mecanismo mediado por el dominio C-terminal. Esta translocación parece ser independiente de fuentes externas de energía, tales como adenosina trifosfato (ATP), gradiente de iones u otras proteínas (218). La hipótesis más aceptada propone que la fuente de energía para la translocación a través de la membrana externa deriva del correcto plegamiento del dominio pasajero sobre la superficie bacteriana (220), de ahí también su denominación “autotransportador”.

Quizás la vía de transporte de los ATs sea para las Gram negativas el mecanismo más simple para la secreción de proteínas al medio extracelular (221) y por eso, sea uno de los mecanismos de secreción más adoptado por numerosos patógenos. Los ATs sólo están presentes en el reino *Bacteria* y son más prevalentes en el *phylum* Proteobacteria, incluyendo las clases α -, β -, γ -

, y ϵ - Proteobacteria (222). Cabe destacar que todos los ATs caracterizados a la fecha han sido catalogados como factores de virulencia. Los ATs pueden tener una amplia variedad de funciones, incluyendo adhesión, invasión, proteólisis, citotoxicidad, resistencia al complemento, hemaglutinación, entre otras (223, 224). Incluso un único AT puede cumplir más de una función. En forma general, además del dominio que contiene el péptido señal en el N-terminal (que media el transporte a través de la membrana interna) los ATs poseen un dominio pasajero (que presenta la actividad biológica) y un dominio C-terminal translocador (223, 225). Se han descrito dos tipos de ATs: los de tipo I o monoméricos, y los de tipo II o triméricos. Los AT I están compuestos por una única cadena polipeptídica que contiene las tres regiones características, o sea, un péptido señal ubicado en el extremo N-terminal, un dominio translocador en el C-terminal y entre ellos el dominio pasajero (221). Se propone que luego de la translocación a través de la membrana interna por la maquinaria Sec, el péptido señal es clivado, y la proteína se libera al periplasma. A continuación, el dominio C-terminal se inserta en la membrana externa formando una estructura de barril β formado por 12 láminas β (197, 219). El dominio pasajero es entonces translocado a través del poro del barril al espacio extracelular. En la mayoría de los AT I, el dominio pasajero es clivado, resultando una proteína o bien soluble o una proteína que queda en contacto con la superficie bacteriana mediante interacciones no covalentes con el barril β (218, 224). En la figura 6A se muestra una representación esquemática de la secreción de un AT I.

Aparentemente, el plegado del dominio extracelular a su conformación nativa sería simultáneo a la translocación. Se sabe que algunos AT I como por ejemplo BrkA de *Bordetella pertussis* presentan un dominio chaperona intramolecular que es muy importante para el correcto plegado del dominio pasajero en el espacio extracelular. Este dominio chaperona es una región conservada, que está presente en varios AT I (226).

La región más variable de los AT I es la que corresponde al dominio pasajero, que es la que alberga la actividad biológica. En cambio, el dominio C-terminal identificado se encuentra altamente conservado (dominio PFAM03797) y suele estar formado por aproximadamente 250-300 aminoácidos (224). El dominio translocador del autotransportador NalP de *Neisseria meningitidis* (En PDB: 1UYO) fue cristalizado confirmándose la presencia de un barril β , compuesto por 12 láminas β transmembrana y un poro central de aproximadamente 10 Å de diámetro, con un segmento α helicoidal pasando por el poro (227). En la figura 6B se puede observar la estructura obtenida por cristalografía, coloreada en función de la estructura secundaria. Las dimensiones del poro formado por el barril sugieren que el dominio translocado atraviesa la membrana en estado desplegado (227).

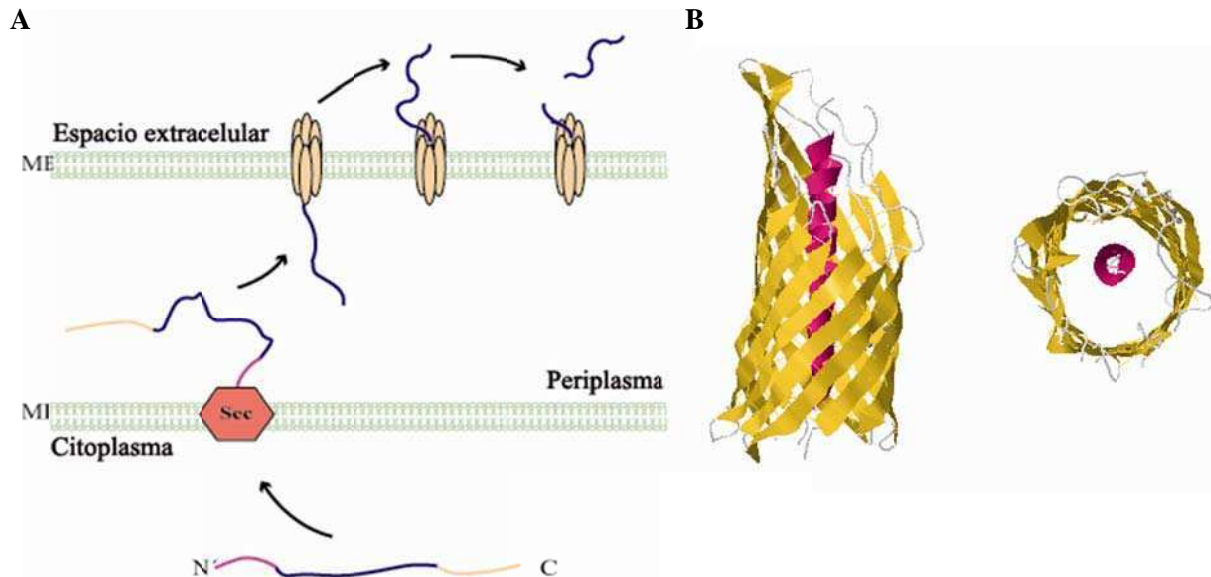


Figura 6. Secreción y estructura de ATs I

(A) Esquema de translocación de los ATs tipo I o monoméricos. El dominio rosado corresponde al péptido señal para el transporte vía maquinaria Sec, el dominio pasajero está representado en azul y el dominio translocador se encuentra anaranjado. La translocación a través de la membrana interna (MI) está dirigida por el péptido N-terminal, vía maquinaria Sec. Una vez en el periplasma, el dominio C-terminal dirige la proteína a la membrana externa (ME), donde forma un barril β , por cuyo poro o canal central se transloca el dominio pasajero hacia el espacio extracelular. Luego el dominio pasajero suele ser clivado, pudiendo liberarse al medio extracelular o quedar retenido a la superficie bacteriana mediante uniones no covalentes. Adaptado de Cotter y colaboradores (224). (B) Estructura cristalográfica del dominio translocador de NalP con vistas lateral y superior. Se puede observar el barril formado por 12 láminas β (en marrón), atravesado por un segmento α -helicoidal (en rosado). Estructura IUYO depositada en el banco de datos de proteínas PDB ([Protein Data Bank](https://www.rcsb.org/entry/IUYO)) (227).

Otro ejemplo que merece ser mencionado de ATs tipo I es TibA de *E. coli* enterotóxica. TibA cumple varias funciones: media la autoagregación de las bacterias, participa en la formación de *biofilm* sobre superficies abióticas, media la adhesión de la bacteria a una serie de tipos celulares humanos (228, 229) y también funciona como invasina ya que fue necesaria para una invasión eficiente a varios tipos celulares humanos (230). La capacidad de formar autoagregados es un mecanismo de defensa común en varias bacterias patógenas ya que les permite resistir mecanismos de defensa del hospedador, como el ataque por complemento, fagocitosis; y condiciones ambientales desfavorables (231, 232).

Por otro lado, los AT I de una gran variedad de bacilos patógenos, incluyendo IcsA y SepA de *Shigella flexneri*, AIDA-I de *E. coli*, NalP, y BrkA de *Bordetella pertusis*, están localizados en uno de los polos de la bacteria (219, 233). Curiosamente, estos AT han mostrado una ubicación polar en el citoplasma previa su secreción (233). Experimentos realizados con

porciones de distintos AT I sugieren que los componentes celulares que los posicionan polarmente, estarían conservados en varios organismos (234, 235). Por ejemplo, NalP de *N. meningitidis* (bacteria con forma esférica) contiene la información molecular para localizarse en el polo de *E. coli* mientras que en *N. meningitidis*, NalP es secretada en sitios distintivos alrededor de la célula (233).

Se identificó una subfamilia de ATs, los AT de tipo II (AT II) o triméricos (224). Los AT II tienen la misma organización modular que los de tipo I; un péptido señal en el N terminal que media el transporte a través de la maquinaria Sec, un dominio pasajero y un dominio C-terminal translocador. El dominio C-terminal está altamente conservado entre los AT II y difiere al de los AT I en que presentan un menor tamaño (aproximadamente 70 aminoácidos, mientras que los monoméricos tienen alrededor de 250-300) (219, 224). La conservación del dominio translocador (PFAM03895) en los AT II permite una identificación eficiente de estos AT en bases de datos (197, 219). Los ATs triméricos tal como indica su nombre, son homotrímeros obligados, ya que se necesita de la trimerización de tres polipéptidos idénticos para la formación de la proteína funcional y así lograr la translocación del dominio pasajero (219, 236). Como se puede observar en la figura 7A, el péptido señal de cada molécula media el transporte de cada polipéptido a través de la membrana interna vía maquinaria Sec. Luego mediante la trimerización de los dominios translocadores de moléculas idénticas, se forma un barril β en la membrana externa. A través del poro central del barril, se translocan los tres dominios pasajeros al espacio extracelular. A diferencia de los ATs I, todos los dominios pasajeros de los AT II estudiados hasta la fecha permanecen unidos covalentemente al barril β del dominio pasajero, es decir, no son clivados luego de su secreción (237). Dado que el dominio pasajero queda expuesto al medio extracelular, éste puede interactuar con otras moléculas bacterianas expuestas, así como también con moléculas de las células del hospedador o de su entorno.

Análisis bioquímicos del dominio C-terminal de distintos AT II revelaron que este dominio forma trímeros en la membrana externa que son resistentes a tratamiento con calor y dodecil sulfato de sodio (SDS) (226, 238). Por otro lado, las predicciones de la estructura secundaria indican que cada monómero contiene cuatro láminas β ; por lo tanto, en caso que ocurriera la trimerización, el dominio translocador de los AT II (trimérico) estaría compuesto por 12 láminas β , de manera similar a lo que ocurre en los AT I (224). La trimerización de estos ATs fue confirmada por cristalografía. Por ejemplo, las estructuras obtenidas por cristalografía de la región 107-126 residuos C-terminales del AT II Hia de *Haemophilus influenzae* (PDB: 2GR8 y 3EMO) revelan la presencia de un barril β compuesto por 12 láminas β (239) (240). Además, los datos estructurales sugieren que el canal formado por el barril es atravesado por 3 hélices,

conectando al dominio translocador con el dominio pasajero. En la figura 7B se puede observar la estructura desde una vista lateral y superior del dominio translocador junto con una pequeña región del dominio pasajero, en la cual cada subunidad se encuentra de un color diferente. En la figura 7C se muestra la misma estructura, pero en este caso, el color se corresponde con la estructura secundaria.

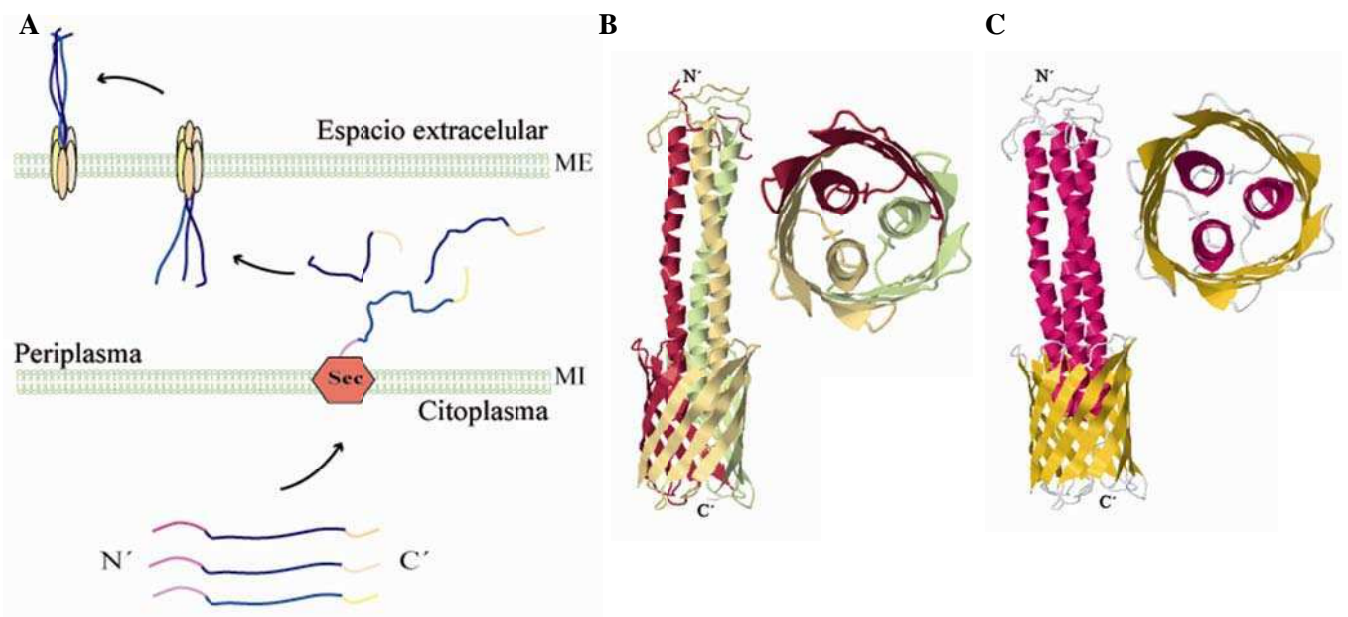


Figura 7. Secreción y estructura de ATs II

(A) Esquema de translocación de los ATs tipo II o triméricos. Los dominios de los distintos polipéptidos (idénticos entre sí) se muestran con colores similares. En todos los casos los dominios rosados corresponden a la secuencia señal para el transporte a través de la membrana interna; los dominios pasajeros están representados en azul y los dominios translocadores se encuentran en tonalidades anaranjadas. Se pueden observar 3 monómeros, que corresponden a tres polipéptidos codificados por el mismo gen. Al igual que ocurre con los AT I, la translocación a través de la membrana interna (MI) ocurre mediante la maquinaria Sec; luego el C-terminal de los tres monómeros se trimeriza y forma un barril β en la membrana externa (ME), a través de cuyo poro se translocan los tres dominios pasajeros. Los AT II no serían clivados en la superficie de la bacteria. Adaptado del trabajo de Cotter y colaboradores (224).

Estructura cristalográfica de los dominios translocadores de Hia desde una vista lateral y vista superior, en la cual los distintos colores representan (B) cada una de las subunidades, o (C) la estructura secundaria (en marrón se muestran las láminas β , y en rosado las hélices α). Adaptado de las estructuras 3EMO y 2GR8 depositadas en el banco de datos de proteínas PDB (239) (240).

La resolución de estructuras cristalográficas de varios AT tipo I y II dio lugar al reconocimiento de notables similitudes estructurales entre los miembros de las familias de AT I y tipo II. Las comparaciones entre la estructura del barril β de Hia y la del AT I NalP indican que éstas prácticamente se pueden superponer (239), con la excepción de que el barril β de los ATs I es

atravesado por un único segmento helicoidal α , y el de Hia por tres. Incluso, el diámetro del poro de Hia es similar al de NalP. Hoy en día, se puede afirmar que los barriles β de todos los AT comparten una arquitectura común (219).

Cabe destacar que las estructuras obtenidas por cristalografía de dominios funcionales presentes en el dominio pasajero de ATs II; como por ejemplo el dominio llamado “de unión primario” de Hia y el dominio de unión a colágeno de YadA (el ejemplo clásico de AT II), indican que éstos también forman trímeros (241, 242), sugiriendo que los dominios pasajeros también presentarían una arquitectura trimérica. En base a restricciones físicas, se supone que la trimerización del dominio pasajero no podría ocurrir en el periplasma; en particular, porque el trímero plegado no podría pasar por el poro formado por el barril. En consecuencia, los dominios pasajeros deben ser translocados por el poro como polipéptidos individuales, probablemente en estado desplegado o parcialmente desplegado. Una vez translocados los tres polipéptidos, es posible que la energía libre asociada con la formación del trímero provea las bases del plegamiento y la adquisición de la conformación nativa. Esto podría explicar porque los ATs triméricos no presentan dominios intramoleculares *BrkA-like* con actividad de chaperona que participen en el plegado del dominio pasajero en el espacio extracelular (242).

Todos los AT II descritos hasta la fecha mostraron cumplir función de adhesina, entre otras funciones (197, 224, 237). Miembros de esta familia se unen a diversas moléculas, como por ejemplo receptores de la superficie celular de la célula hospedadora, componentes de la ECM (como por ejemplo colágeno y laminina) o entre sí (actuando como autoaglutininas). Además, a menudo protegen a la bacteria de respuestas del sistema inmune del hospedador, uniendo moduladores de vías mediadas por anticuerpos o por la vía innata del complemento (243). Los miembros clásicos de los AT II son YadA de *Yersinia enterocolitica* (244, 245) e Hia de *H. influenzae* (246). El autotransportador YadA promueve la adhesión a células epiteliales y a proteínas de la ECM, y está involucrado en la resistencia al complemento presente en el suero (247-249).

Desde el punto de vista estructural, los AT II tienen una organización de tipo cabeza-conector-tallo-anclaje (Figura 8). El módulo de anclaje coincide con el barril β , mientras que los demás corresponden al dominio pasajero. Por microscopía electrónica de YadA de *Y. enterocolitica* y UspA1 de *Moraxella catarrhalis* se observó que la fracción extracelular de estos ATs protruye sobre la superficie celular en forma de tallo mostrando una estructura tipo cabeza en el extremo del tallo (250). Lupas y colaboradores desarrollaron el server *Domain Annotation in Trimeric Autotransporter Adhesins* (daTAA, <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/dataa>), que permite predecir la estructura modular de los AT II (251).

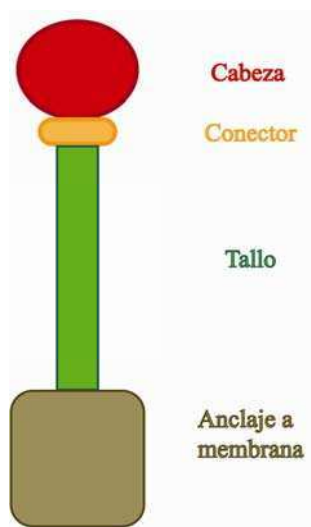


Figura 8. Estructura modular de los AT triméricos.

Consiste en una cabeza, un conector, un tallo y un módulo de anclaje a membrana. Esta figura ha sido adaptada del esquema general de daTAA, <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/dataaa>.

Por otro lado, en función de la estructura predicha para dominios pasajeros de ATs II, se determinó que éstos dominios tienen triple simetría, es decir, tres caras idénticas (224). La presencia de tres caras idénticas puede proveer el potencial de tres *pockets* de unión y una interacción multivalente con la superficie de la célula hospedadora. Esto resultaría en un aumento en la avidéz por el ligando y una interacción más estable, con una consecuente mayor afinidad comparada con la que generaría una interacción monovalente. La disociación de una adhesina monomérica unida a una célula epitelial requiere un único evento de disociación; mientras que la disociación de una adhesina trimérica requiere la disociación de los 3 *pockets* de unión (Figura 9). Se ha propuesto que este aumento en la avidéz podría ser importante para superar fuerzas mecánicas del hospedador, por ejemplo, movimientos mucociliares, movimientos peristálticos, etc. (224). Curiosamente, la arquitectura trimérica y la capacidad de unión multivalente de alta afinidad también se ha observado en adhesinas proteicas tanto de virus como de células eucariotas. Por ejemplo, la fibra 2 (con función de adhesina) de adenovirus es un homotrímero que contiene tres sitios de unión idénticos que interactúan con tres moléculas distintas del mismo tipo de receptor. Estudios realizados con esta fibra, muestran que la interacción trivalente da lugar a un aumento de 25 veces en la afinidad relativa, respecto a la interacción monovalente entre ésta fibra y su receptor (252). Por otra parte, la presencia de 3 *pockets* de unión en los AT II podría permitir el agrupamiento de receptores moleculares, facilitando eventos de señalización en la célula del hospedador (224).

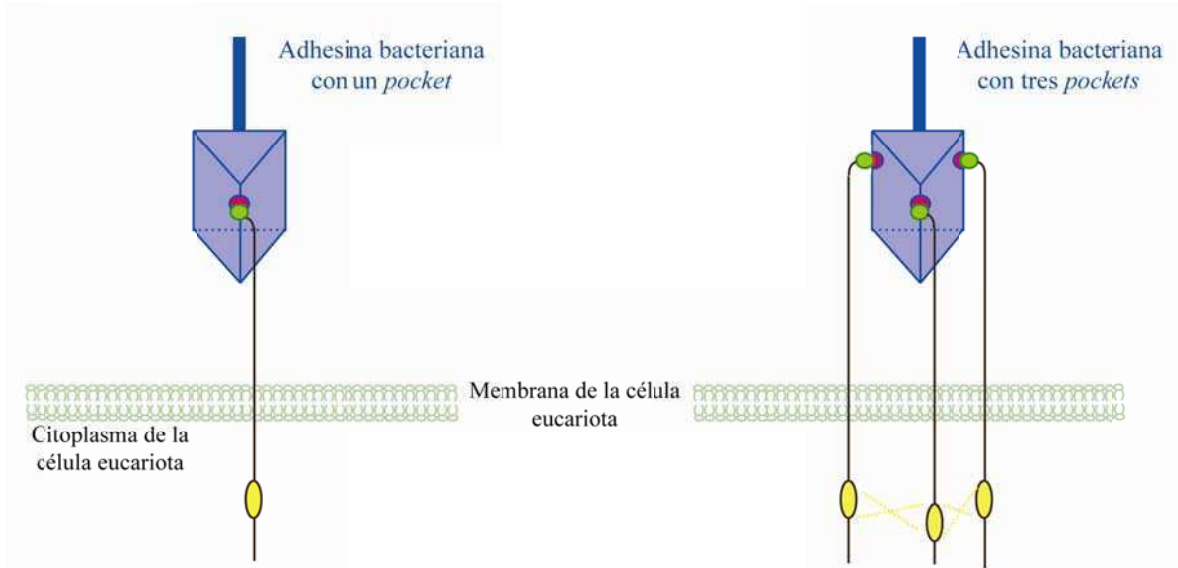


Figura 9. Múltiples *pockets* de unión aumentan la avides de la interacción bacteria-patógeno.

A la izquierda se muestra esquemáticamente una adhesina (en azul) conteniendo un único *pocket* de unión (en rosa); mientras que a la derecha se muestra una adhesina con tres *pockets* de unión independientes. Los receptores de células eucariotas se muestran en verde. La disociación de una adhesina monomérica de la célula eucariota requiere un único evento de disociación, mientras la disociación de adhesinas triméricas requiere la disociación de los tres *pockets*. Además la presencia de los tres *pockets* puede agrupar receptores moleculares, gatillando eventos de señalización en la célula eucariota. Modificado de Cotter y col (224).

3.2.b. Adhesinas en *Brucella*

A lo largo de los años se han acumulado evidencias que sugieren que la adhesión a componentes de la ECM y/o a las células del hospedador es un paso importante en la infección de *Brucella* (253-257). A pesar de su importancia, no se conoce mucho acerca de los procesos involucrados en la adhesión e invasión de *Brucella* spp. a células del hospedador. Debido al amplio espectro patogénico de *Brucella* y su capacidad de invadir distintos tipos celulares y tejidos (258), se ha sugerido que la bacteria es capaz de expresar moléculas de superficie (adhesinas) capaces de reconocer receptores generales así como también receptores específicos de determinados tejidos (253). En el año 2004, Castañeda-Roldan y colaboradores publicaron un trabajo en el cual investigaron las propiedades de adherencia de *Brucella* spp. a células epiteliales y macrófagos. Estos autores demostraron que *B. abortus* y *B. melitensis* son capaces de unirse a estas células con una cinética característica (253). Se estudió la naturaleza de los receptores de las células hospedadoras responsables de la interacción de la bacteria a éstas células mediante ensayos de adhesión y analizando el efecto sobre la adhesión de posibles compuestos inhibitorios y de tratamientos químicos y enzimáticos. A través de estos enfoques se propuso que la adhesión sería dependiente de receptores con residuos ricos en ácido siálico y/o residuos sulfatados, tanto en macrófagos, células epiteliales como en eritrocitos humanos (253, 259). También se propuso que algunas proteínas de la matriz extracelular (ECM, del inglés *extracellular matrix*) como

fibronectina, colágeno y vitronectina podrían actuar como puente en las etapas de adhesión (253). Estudios anteriores habían demostrado que *Brucella* se adhiere a ácido siálico presente en glóbulos rojos humanos y de otros animales (259). Por otro lado, mediante microscopía de barrido electrónico se demostró que una vez que *Brucella* entra en contacto con la membrana de células epiteliales, ocurre una acumulación de bacterias adheridas con la consiguiente formación de microcolonias (253).

En un trabajo posterior cuyo fin era identificar proteínas de superficie de *Brucella* involucradas en la adhesión a células de mamíferos, se marcaron con biotina proteínas extraídas con calor de la superficie bacteriana. Luego se determinó cuáles de esas proteínas eran capaces de adherirse a una monocapa de células HeLa, identificando así a SP41, una proteína con alta similitud a un transportador de glicerol-3-fosfato de tipo ABC. Es interesante destacar que la capacidad de adhesión de SP41 se pierde al utilizar células HeLa previamente tratadas con neuramidasa, lo cual sugiere que alguna molécula de la célula rica en ácido siálico estaría involucrada en la interacción. Por otra parte, se observó que el agregado de anticuerpos anti-SP41, inhibe en forma dosis dependiente la adhesión e invasión bacteriana a células HeLa. La cepa mutante en SP41 presentó una menor capacidad de adhesión e invasión a células epiteliales humanas. Dado que SP41 parece ser ubicua en el género, se propuso que las interacciones promovidas por SP41 serían de tipo inespecíficas (o primarias) y no responderían a interacciones de alta afinidad que medien el anclaje irreversible de la bacteria a la célula (208).

Bandara y colaboradores caracterizaron una proteína de *B. suis* que pertenecería a la familia de los autotransportadores monoméricos, a la que denominaron OmaA. En función de su similitud con proteínas con función de adhesina los autores propusieron que podría tratarse de una adhesina; sin embargo esta posibilidad no fue explorada. La mutante *omaA* no presentó diferencias con la cepa silvestre en la replicación intracelular en macrófagos (a 24 ni 48 horas) y tampoco en la carga en bazo de ratones una semana después de haber sido inoculados intraperitonealmente. En cambio, entre la tercer y novena semana siguiente a la inoculación, la mutante fue eliminada más eficientemente que la cepa silvestre, indicando que OmaA sería importante en la fase crónica de la infección (261).

En nuestro laboratorio, con el fin de identificar adhesinas de *B. suis*, se construyó una biblioteca de fagos que exponen en su cápside péptidos de *B. suis* 1330 (*phage display*). Enfrentando esta biblioteca a fibronectina inmovilizada se aislaron fagos que expresaban fragmentos de proteínas candidatas a ser adhesinas con capacidad de unión a fibronectina, uno de los compuestos de la ECM a los que *Brucella* se adhiere. Entre los candidatos, se identificó un autotransportador monomérico, al que se llamó BmaC (por *Brucella monomeric autransporter*). El

fago que expresaba el péptido de BmaC fue capaz de inhibir la adhesión de *B. suis* tanto a una monocapa de HeLa como a fibronectina inmovilizada. A su vez, la cepa de *B. suis* mutante en *bmaC* mostró una menor capacidad de adhesión a fibronectina inmovilizada y a las líneas celulares epiteliales HeLa y A549 (línea epitelial pulmonar humana). Al realizar infecciones a células HeLa co-inoculando las cepas mutante y silvestre, la mutante fue desplazada por la silvestre. Se determinó que anticuerpos anti-BmaC así como anti-fibronectina son capaces de inhibir la adhesión de *Brucella* a células HeLa. Por inmunofluorescencia se pudo determinar que la proteína se localiza unipolarmente. Se propuso que BmaC mediaría la adhesión de *B. suis* a la fibronectina, tanto para adherirse a la matriz extracelular como a fagocitos no profesionales (262).

Varios análisis han revelado una importante similitud entre los genomas de las distintas especies de *Brucella* (11, 263). Se ha propuesto que las diferencias en la patogenicidad, tropismo de tejido y preferencias de hospedador podrían ser la consecuencia de inactivación en ciertas especies de algunos genes codificantes de componentes de la superficie bacteriana, como resultado del proceso de adaptación a una determinada especie animal como hospedador (38). Estos mecanismos de adaptación especie específica han sido propuestos para otros patógenos, como *Yersinia* (264) y *Bordetella* (265). Es importante mencionar que tanto BmaC como OmaA poseen ortólogos en varias especies de *Brucella*, pero no en todas. En el caso de OmaA existen ortólogos con una alta identidad (mayor al 95%) en *B. canis*, *B. microti* y en algunas cepas de *B. abortus* (S19) y *B. melitensis* (16M). En cambio, los ortólogos de otras cepas de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. ovis* presentan una identidad mucho menor (alrededor del 41-42%), incluso algunos de estos genes podrían codificar proteínas no funcionales. En cuanto a BmaC, pueden identificarse ortólogos funcionales en *B. microti*, *B. ovis*, *B. abortus*, *B. pinnipedalis* y *B. microti*. En cambio, los ortólogos en *B. canis* y *B. melitensis* serían inactivos.

Con el objetivo de identificar nuevos factores involucrados en la interacción inicial de *Brucella suis* con el hospedador se realizó una búsqueda bioinformática en el genoma de la cepa 1330 de todas las posibles proteínas que expresen algún dominio asociado a adhesinas. Se obtuvieron 11 candidatas, incluido el autotransportador monomérico BmaC. De las 10 proteínas restantes, otras dos pertenecían a los AT I (monoméricos), uno de los cuales corresponde a OmaA. Por otro lado, diversos estudios informáticos (ver secciones I.2. y II.1. de Resultados) demostraron que dos de las posibles adhesinas pertenecerían a la familia de los autotransportadores triméricos. En el marco de esta tesis se han caracterizado con enfoques genéticos y moleculares los dos AT II y un tercer candidato cercano filogenéticamente.

Hipótesis

Las especies comprendidas dentro del género *Brucella* son patógenos intracelulares facultativos. Además de invadir fagocitos profesionales como macrófagos, *Brucella* es capaz de persistir en otros tipos celulares como células epiteliales, fibroblastos, osteoblastos, sinoviocitos, entre otros tipos celulares (118-120, 266, 267). Para la invasión y proliferación intracelular, es crucial la adhesión inicial de la bacteria a la superficie de la célula. Trabajos previos demostraron que *Brucella* es capaz de unirse a células de origen epitelial y a componentes de la ECM, particularmente a fibronectina, aunque también a colágeno y vitronectina (253). Al momento de iniciar este trabajo de tesis, con excepción de SP41 (208), se desconocían los factores bacterianos involucrados en la adhesión de *Brucella* a componentes de la ECM o células del hospedador. Nuestro grupo de trabajo se propuso identificar y caracterizar estos factores.

La hipótesis general del proyecto es que las bacterias pertenecientes a especies del género *Brucella* expresarían múltiples moléculas involucradas en la adhesión a las células del hospedador y/o a su matriz extracelular. Algunas de las adhesinas podrían tener roles aditivos e incluso sinérgicos, mientras que otras podrían tener roles complementarios. La capacidad de *Brucella* de adherirse e invadir estas células podría ser clave en el tropismo a ciertos tejidos y contribuir con la preferencia de hospedador de las distintas especies del género.

Mediante *phage display* identificamos a BmaC, un autotransportador monomérico de gran tamaño que participa en la adhesión a células epiteliales y a la ECM a través de su interacción con fibronectina (262). Por otra parte, en función de dominios proteicos asociados a adhesinas, se realizó una búsqueda en el genoma de *B. suis* 1330 de genes que codifiquen posibles adhesinas. Tres de las proteínas candidatas (BR_0072, BR_1846 y BR_0049) se agruparon juntas en un árbol filogenético. Comprobamos que BR_0072 y BR_1846 codificarían miembros de la familia de los autotransportadores triméricos (secciones I.2. y II.1. de Resultados). Para nuestra sorpresa, la tercer proteína (codificada por BR_0049) no sería una adhesina, sino más bien una proteína con una función en la biogénesis de la membrana externa. Nos propusimos analizar el rol de estas proteínas en la fisiología de la bacteria y en la interacción con el hospedador.

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo fue identificar y caracterizar factores de *Brucella suis* involucrados en la adhesión y/o invasión de las células del hospedador.

Objetivos específicos

- Evaluar el rol de BR_0072 y BR_1846 en la adhesión y/o invasión a células del hospedador a través de enfoques genéticos (mutacionales y heterólogos)
- Determinar el rol de BR_0072 y BR_1846 en la adhesión a componentes de la ECM
- Caracterizar otras posibles funciones de BR_0072 y BR_1846 en la interacción de *B. suis* con el hospedador
- Evaluar la posibilidad de un efecto aditivo, sinérgico o complementario en determinada(s) función(es) de BR_0072 y BR_1846
- Analizar la expresión *in vivo* de BR_0072 y BR_1846
- Estudiar la importancia de BR_0072 y BR_1846 en la virulencia de *Brucella* spp.
- Analizar la localización celular de las proteínas codificadas por BR_0072 y BR_1846.
- Evaluar el rol de BR_0049 en la adhesión y/o invasión a células del hospedador
- Caracterizar los fenotipos asociados a las características de la envoltura bacteriana de la mutante defectiva en BR_0049

Materiales y Métodos:

1. Cepas bacterianas y plásmidos.

Las cepas de *Escherichia coli* y *Brucella* utilizadas en este trabajo, se detallan en la tabla 2. En el caso de las cepas del género *Brucella*, a menos que se indique lo contrario se trata de cepas de *B. suis*. Debido al potencial patógeno de las especies pertenecientes al género *Brucella*, el trabajo realizado con estas cepas fue realizado en condiciones de bioseguridad.

| Cepa | Características relevantes | Origen o referencia |
|--------------------------------|--|---------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | | |
| DH5 α | F- ϕ 80dlacZ Δ M15 ?(lacZYA-argF)U169 deoR, recA1, endA1 hsdR17(r _k ⁻ m _k ⁺ phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1. | Invitrogen LT. |
| BL21 | B F- dcm ompT hsdS(rB- mB-) gal [malB+]K-12(λ S) | Invitrogen LT. |
| S17 | Cepa para conjugación biparental en <i>B. suis</i> | Dr. Luis Ielpi |
| K12 (CC118) | Cepa no adherente ni invasiva de <i>E. coli</i> | Dr. Luis Ielpi |
| pBBR | Cepa <i>per se</i> no adherente ni invasiva transformada con el plásmido pBBR1MCS vacío. | Esta tesis |
| pBBR $mapA$ | Cepa <i>per se</i> no adherente ni invasiva que expresa el gen $mapA$ de <i>B. suis</i> clonado en el plásmido pBBR1MCS. | Esta tesis |
| pBBR $btaE$ | Cepa <i>per se</i> no adherente ni invasiva que expresa el gen $btaE$ de <i>B. suis</i> clonado en el plásmido pBBR1MCS. | Esta tesis |
| pBBR $btaF$ | Cepa <i>per se</i> no adherente ni invasiva que expresa el gen $btaF$ de <i>B. suis</i> clonado en el plásmido pBBR1MCS. | Esta tesis |
| pBBR GFP | Cepa K12 transformada con el plásmido pBBR1MCS y el plásmido pHC60 el cual codifica para gfp expresada constitutivamente (+ pHC60) | Esta tesis |
| pBBR $btaE$ GFP | Cepa K12 $btaE$ que expresa la proteína GFP (+ pHC60) | Esta tesis |
| pBBR $btaF$ GFP | Cepa K12 $btaF$ que expresa la proteína GFP (+ pHC60) | Esta tesis |
| BL21 pAcMapA | Cepa BL21 + pAcMapA | Esta tesis |
| BL21 pAcBtaE | Cepa BL21 + pAcBtaE | Esta tesis |
| BL21 pAcBtaF | Cepa BL21 + pAcBtaF | Esta tesis |
| <i>Brucella</i> | | |
| M1330 | Cepa silvestre | ATCC |
| $\Delta mapA$ | Mutante por delección del gen $mapA$ por doble recombinación cromosómica | Esta tesis |
| $\Delta mapA$ comp | Mutante por delección del gen $mapA$ complementada (pBBR $mapA$) | Esta tesis |
| $\Delta btaE$ | Mutante por delección del gen $btaE$ por doble recombinación cromosómica | Esta tesis |
| $\Delta btaE$ comp | Mutante por delección del gen $btaE$ complementada (pBBR $btaE$) | Esta tesis |
| $\Delta btaF$ | Mutante por delección del gen $btaF$ por doble recombinación cromosómica | Esta tesis |
| $\Delta btaF$ comp | Mutante por delección del gen $btaF$ complementada (pBBR $btaF$) | Esta tesis |
| $\Delta btaE \Delta btaF$ | Doble mutante por delecciones de los genes $btaE$ y $btaF$ | Esta tesis |

| | | |
|-------------------------|---|------------|
| <i>B. suis</i> GFP | M1330 que expresa la proteína GFP (+ pGFP) | Esta tesis |
| $\Delta btaE$ GFP | Cepa $\Delta btaE$ que expresa la proteína GFP (+ pGFP) | Esta tesis |
| $\Delta btaF$ GFP | Cepa $\Delta btaF$ que expresa la proteína GFP (+ pGFP) | Esta tesis |
| <i>B. suis</i> pPdhS | Cepa silvestre que además porta la fusión de la proteína fluorescente eGFP al marcador de polo viejo, PdhS | Esta tesis |
| <i>B. suis</i> pAidB | Cepa silvestre que además porta la fusión de la proteína fluorescente YFP al marcador de polo nuevo, AidB | Esta tesis |
| $\Delta btaE$ pPdhS | Mutante en el gen <i>btaE</i> que además porta la fusión de la proteína fluorescente eGFP al marcador de polo viejo, PdhS | Esta tesis |
| $\Delta btaE$ pAidB | Mutante en el gen <i>btaE</i> que además porta la fusión de la proteína fluorescente eGFP al marcador de polo nuevo, AidB | Esta tesis |
| $\Delta btaF$ pPdhS | Mutante en el gen <i>btaF</i> que además porta la fusión de la proteína fluorescente eGFP al marcador de polo viejo, PdhS | Esta tesis |
| $\Delta btaF$ pAidB | Mutante en el gen <i>btaF</i> que además porta la fusión de la proteína fluorescente eGFP al marcador de polo nuevo, AidB | Esta tesis |
| <i>B. abortus</i> pPdhS | Cepa silvestre que además porta la fusión de la proteína fluorescente eGFP al marcador de polo viejo, PdhS | (41) |
| <i>B. abortus</i> pAidB | Cepa silvestre que además porta la fusión de la proteína fluorescente YFP al marcador de polo nuevo, AidB | (42) |

Tabla 2: Cepas bacterianas utilizadas

A continuación se detallan todos los plásmidos utilizados en el transcurso de esta tesis (Tabla 3):

| Plásmido | Características relevantes | Origen o referencia |
|------------------|---|---------------------|
| pGEM-T Easy® | Amp ^R . Vector de clonado | Promega Inc. |
| pK18mobsacB | Kan ^R , Sac ^S . Plásmido para obtención de mutantes en <i>Brucella</i> por delección por doble recombinación cromosómica. | (268) |
| p $\Delta mapA$ | Kan ^R Construcción para la delección de <i>mapA</i> en pK18mobsacB | Esta tesis |
| p $\Delta btaE$ | Kan ^R Construcción para la delección de <i>btaE</i> en pK18mobsacB | Esta tesis |
| p $\Delta btaF$ | Kan ^R Construcción para la delección de <i>btaF</i> en pK18mobsacB | Esta tesis |
| pHC60 | Tet ^R . Porta el gen <i>gfp</i> bajo expresión constitutiva | (269) |
| pGFP | Kan ^R . Porta el gen <i>gfp</i> clonado en pBBR4 bajo el promotor <i>tac</i> . | Lic. L. Bukata |
| pBBR1MCS | Cam ^R . Vector de clonado de número medio de copias, de amplio rango de hospedador | (270) |
| pBBR <i>mapA</i> | Cam ^R . Gen completo <i>mapA</i> de <i>B. suis</i> clonado en pBBR1MCS | Esta tesis |
| pBBR <i>btaE</i> | Cam ^R . Gen completo <i>btaE</i> de <i>B. suis</i> clonado en pBBR1MCS | Esta tesis |
| pBBR <i>btaF</i> | Cam ^R . Gen completo <i>btaF</i> de <i>B. suis</i> clonado en pBBR1MCS | Esta tesis |
| pET-22b(+) | Amp ^R Vector de clonado de proteínas bajo promotor inducible por IPTG, con fusión a HisTag en el C-terminal. | Novagen |
| pAcMapA | Amp ^R Porción de MapA clonada en pET-22b(+) | Esta tesis |
| pET-28a(+) | Kan ^R . Vector de clonado de proteínas bajo promotor inducible por IPTG, con fusión a HisTag en el N-terminal. | Novagen |
| pAcBtaE | Kan ^R . Porción del dominio pasajero de BtaE clonada en pET-28a(+) | Esta tesis |
| pAcBtaF | Kan ^R . Porción del dominio pasajero de BtaF clonada en pET-28a(+) | Esta tesis |
| pPdhS-eGFP | Kan ^R Cam ^R . Porta el marcador de polo viejo PdhS fusionado a la proteína fluorescente eGFP | (41) |
| pAidB-YFP | Kan ^R Cam ^R . Porta el marcador de polo nuevo AidB fusionado a la proteína fluorescente YFP. | (42) |

Tabla 3: Plásmidos utilizados

2. Medios y condiciones de cultivo bacterianos

2.1 Medios de cultivo

E. coli fue cultivada en medio Luria-Bertani (LB), salvo en el caso de la preparación de electrocompetentes para lo cual se la cultivó en 2xYT; *B. suis* se cultivó en medio *Tryptic Soy Broth*® (TSB, DIFCO). Para ambas especies las incubaciones duraron entre 12 a 24 horas, salvo cuando indicado de otro modo y se realizaron a 37°C con una agitación de 200 revoluciones por minuto (rpm). En el caso de medios sólidos se adicionó 1,7% (p/v) de agar (Britania).

A continuación se describe la composición de los medios de cultivo LB y 2xYT, indicada como gramos por litro de cada componente (Tabla 4):

| Gr. por lt de medio | LB | 2xYT |
|----------------------|----|------|
| Triptona | 10 | 10 |
| Extracto de Levadura | 5 | 10 |
| NaCl | 5 | 5 |
| Agar * | 17 | - |

Tabla 4. Composición de los medios de cultivo LB y 2xYT.

Para cada compuesto se indican los gramos por litro.

*, Únicamente para medios sólidos

2.2 Antibióticos

En caso de ser necesario se adicionaron distintos antibióticos a los medios de cultivo. En la tabla 5 se encuentra el listado de antibióticos utilizados junto con las concentraciones empleadas para cada especie.

| Antibiótico | Stock | | Concentración final (µg/ml) | |
|------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------------|----------------|
| | Concentración (mg/ml) | Solvente | <i>E. coli</i> | <i>B. suis</i> |
| Ácido Nalidixico | 20 | Agua | - | 10 |
| Ampicilina | 200 | Agua | 400 | 10 |
| Cloranfenicol | 25 | Etanol, metanol | 50 | 6 |
| Kanamicina | 50 | Agua | 50 | 25 |
| Tetraciclina | 5 | Etanol | 10 | - |

Tabla 5: Concentraciones de los antibióticos utilizados.

2.3 Conservación de las cepas

La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas fue realizada por congelamiento rápido de una suspensión de bacterias cultivadas en medio sólido (bajo presión de selección cuando corresponda) en glicerol estéril a una concentración final de 20% (v/v) en criotubos conservados a -20° y -80°C.

3. Aislamiento, purificación y manipulación de ADN

3.1 Procedimientos generales.

Los protocolos utilizados para las digestiones con enzimas de restricción, desfosforilaciones del ADN, rellenado de los extremos 5', electroforesis en gel de agarosa y ligaciones se realizaron según la metodologías descritas en el manual “*Molecular Cloning*” (271).

Para la recuperación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa y PCR se emplearon los sistemas *Wizard SV Gel* y *PCR Cleanup System* (Promega Inc. Cat N° #A9282). Tanto las enzimas de restricción, polimerización, lisozima, ADNasa, ARNasa y algunos de los marcadores de peso molecular fueron provistos por New England Biolabs (Beverly, MA, USA), Promega Inc o Invitrogen Life Technologies (La Jolla, CA, USA). En algunos casos el marcador de peso molecular, Taq ADN polimerasa y Pfu polimerasa fueron provistos por el servicio de Biología Molecular de la Fundación Instituto Leloir (FIL)

3.2 Preparación de ADN cromosómico de *Brucella*

Para purificar el ADN cromosómico de *Brucella* se empleó el siguiente protocolo:

- 1) Se cultivaron las bacterias por 3 días con los antibióticos adecuados.
- 2) 25 ml de TSB se inocularon con 0.25 ml del pre-cultivo estacionario.
- 3) Cuando se alcanzó una $DO_{600}=0.6$ las bacterias fueron cosechadas por centrifugación (8.000 rpm 5 min a 4°C)
- 4) Las bacterias se lavaron 2 veces con 5ml de TE20 0.1% sarcosil y luego dos veces con 5 ml TE20. En cada paso de lavado las células se centrifugaron por 5 min a 8.000 rpm.
- 5) El sobrenadante (SN) se descartó y las células se resuspendieron en 1 ml TE sacarosa 25%
- 6) Se agregaron 30 μ l de lisozima (50 mg/ml) y 400 μ l de EDTA (0.25 M) y se mezcló por inversión. Esta preparación se incubó por 10 min a 37°C.
- 7) Luego se agregaron 2 ml de H₂O milliQ, 200 μ l de SDS 10%.
- 8) Se agregaron 50 μ l de RNasa (10 mg/ml), se mezcló e incubó por 15 min a 37°C.
- 9) Luego de agregar 50 μ l de proteinasa K (10 mg/ml) la mezcla se incubó por 5 min a 37°C.
- 10) La preparación fue sometida a una extracción con un volumen de fenol: cloroformo (aprox. 4 ml) y centrifugada a 5.000 rpm por 15 min a 4°C. La fase superior (acuosa) se transferiría a un tubo limpio. Este procedimiento se repitió hasta obtener una interfase limpia.
- 11) Se realizó una extracción con igual volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)
- 12) Se agregó acetato de potasio pH 4.8 (0.3 M final) y 2 volúmenes de etanol absoluto y se mezcló por inversión.
- 13) Se centrifugó a máxima velocidad 10 min y el *pellet* se lavó con 500 μ l de etanol 70%.

- 14) El etanol se descartó y se dejó secar al aire.
- 15) El ADN se resuspendió en buffer TE.

Buffers:

TE20: 50 mM Tris pH 8, 20 mM EDTA, 1M NaCl

TE: 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA

3.3 Preparación de ADN plasmídico de *E. coli*.

Las preparaciones de ADN plasmídico a partir de *E. coli* se realizaron siguiendo las recomendaciones del libro “*Molecular Cloning*” (271). El protocolo se describe brevemente a continuación:

- 1) Se cultivaron las bacterias en medio LB con los antibióticos adecuados, hasta obtener un cultivo en fase estacionaria (ON a 37°C).
- 2) Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación (5.000 rpm, 5 min).
- 3) Las células fueron resuspendidas en solución P1.
- 4) Luego de agregar solución P2 y RNasa, la mezcla se incubó por 15 min a la temperatura adecuada para la RNasa utilizada.
- 5) Se agregó la solución P3 y luego se centrifugó (15 min a 14.000 rpm).
- 6) La preparación fue sometida a una extracción de ADN con un volumen de cloroformo y centrifugada a 5.000 rpm 15 min a 4°C. La fase superior (acuosa) fue transferida a un tubo limpio.
- 7) Se agregó etanol absoluto y se incubó el tubo 25 min a -20°C.
- 8) Se centrifugó la muestra (30 min a 14.000 rpm), y luego de descartar el SN se lavó el *pellet* con 500 µl de etanol 70%.
- 9) Se resuspendió el ADN en 20 o en 50 µl de agua milliQ, según correspondiera a plásmidos de bajo o alto número de copias.

Soluciones empleadas:

P1: Tris-HCl 50 mM; EDTA 10 mM pH=8,0

P2: NaOH 200 mM; SDS 1%

P3: Acetato de sodio 2,55 M, pH=4,8

En los casos en que se requirió de plásmidos de alta calidad por ejemplo para secuenciación, se utilizó el kit *Wizard® SV Gel and PCR Cleanup system* (Promega, Cat #A9282).

3.4 Secuenciación del ADN

Las muestras se secuenciaron utilizando el kit *BigDye* (Applied Biosystems) en un secuenciador ABI 377, por el servicio de secuenciación de la FIL. Para el análisis de las secuencias se utilizó el programa Chromas Lite versión 2.01.

3.5 Geles de agarosa

La separación de plásmidos o fragmentos obtenidos por extracción de ADN plasmídico, restricción, PCR, *colony*-PCR y RT-PCR fue realizada mediante electroforesis en geles de agarosa, generalmente entre 0.8 y 1.2% (p/v); conteniendo 1-2 µg/ml de Bromuro de Etidio. El perfil de bandas fue fotografiado en un sistema digital de adquisición de imágenes Bio-Rad.

4. Transformación genética bacteriana

4.1 Preparación de *E. coli* competentes por *shock* térmico y transformación

Para la obtención de células de *E. coli* competentes por *shock* térmico se utilizó el siguiente protocolo:

- 1) Se cultivaron las bacterias en 5 ml de LB ON con agitación, a 37°C.
- 2) 50 ml de LB fueron inoculados con el pre-cultivo y cultivados con agitación a 37°C.
- 3) Cuando se alcanzó una $DO_{600}=0.5-0.6$ las bacterias fueron transvasadas a mamaderas de centrifuga (estériles). A partir de este paso fue crítico mantener las células en hielo todo el tiempo.
- 4) Las células se centrifugaron a 5.000 rpm durante 5 min a 4°C en un rotor previamente enfriado.
- 5) Luego de descartar el SN, se resuspendió el *pellet* en 25 ml de $CaCl_2$ 0.1M estéril frío, y la suspensión fue incubada 20 min en hielo.
- 6) Las células fueron centrifugadas a 5.000 rpm durante 5 min a 4°C sin freno.
- 7) Luego de descartar el SN se resuspendieron suavemente las células en 2 ml de $CaCl_2$ 0.1M estéril frío.
- 8) Se agregaron 2 ml de glicerol 30% estéril a las células y se alicuotaron de a 200 µl. Las alicuotas se conservaron a -80°C.

El protocolo utilizado para la transformación por *shock* térmico fue el siguiente:

- 1) Los tubos de competentes guardados a -80°C se incubaron en hielo 10 a 15 min.
- 2) Luego se añadió el ADN y se incubó la mezcla 1 h en hielo.
- 3) La mezcla fue incubada durante 90 seg. en baño a 42°C.
- 4) Luego se agregó 1 ml de LB estéril y se agitó vigorosamente.
- 5) La mezcla fue incubada 1 h a 37°C con agitación.

- 6) Se centrifugaron las células 2-3 min y luego se descartó la mayor parte del SN (se dejaron aproximadamente 100 µl para resuspender el *pellet*)
- 7) El *pellet* fue resuspendido en el resto del SN y luego fue plaqueado en medio selectivo.

4.2 Preparación de *E. coli* electrocompetentes de alta eficiencia y transformación

Para obtener células electrocompetentes, se utilizó un protocolo previamente puesto a punto con el fin de obtener electrocompetentes de alta eficiencia (272). Este se describe brevemente, a continuación:

- 1) Se inocularon 25 ml de LB con bacterias provenientes de cultivos en medios semi-sólidos y se cultivaron ON a 37°C con agitación.
- 2) 500 ml de 2xYT se inocularon con 5 ml del cultivo ON.
- 3) Cuando se alcanzó una $DO_{600}=0.5-0.6$ se transvaó el cultivo a mamaderas de centrifuga (estériles) previamente enfriadas, y se incubaron en hielo durante 30 minutos. A partir de este paso fue crítico mantener las células todo el tiempo en hielo.
- 4) Las células fueron centrifugadas a 4.000g durante 20 min a 4°C utilizando un rotor previamente enfriado.
- 5) Luego de descartar el SN, las células fueron suavemente resuspendidas en 500 ml de glicerol 10% frío e incubadas por 30 min en hielo.
- 6) Se repitieron los pasos 4 y 5, 2 veces (en total se realizaron tres lavados en glicerol 10%).
- 7) Se estimó el volumen del *pellet* y se lo resuspendió en un volumen de glicerol 10% frío.
- 8) Las células fueron inmediatamente fraccionadas de a 50 µl en tubos previamente enfriados.
- 9) Rápidamente se congelaron los tubos y se los conservó a -80°C.

Para la electroporación se empleó para cada tubo de 50 µl de células electrocompetentes, 1-2 µl de ADN (entre 1 y 10 µg, disuelto en agua milliQ) y se utilizaron cubetas de 2 mm (Bio-Rad). El electroporador utilizado fue *Gene Pulser Transfection System* (Bio Rad). Las condiciones de electroporación para *E. coli* fueron las siguientes:

| | |
|--------------|-------|
| Capacitancia | 25 µF |
| Voltaje | 2.5kV |
| Resistencia | 200 Ω |

Luego de la electroporación, se incubaron las células por 1 hora a 37°C en medio rico con agitación y finalmente se plaquearon en medio selectivo.

4.3 Preparación de *B. suis* electrocompetentes y transformación

Las cepas electrocompetentes de *B. suis* se prepararon a partir de placas crecidas por 24 h, del modo que se describe a continuación:

- 1) Las bacterias fueron cultivadas en medio sólido ON a 37°C.
- 2) Las células fueron tomadas con un ansa y luego fueron resuspendidas en agua milliQ estéril fría.
A partir de este paso fue crítico mantener las células en frío.
- 3) Se lavaron las células 5 veces con agua estéril fría.
- 4) Las células fueron resuspendidas en 300 µl de H₂O milliQ estéril fría.

No es conveniente conservar estas competentes, ya que se obtienen mayores eficiencias si se utilizan en el momento. Para la transformación se tomaron 150 µl de la suspensión y se mezclaron con 2-5 µl (10-50 µg) de ADN. Luego se realizó la electroporación utilizando cubetas BioRad de 2 mm de espesor y el mismo electroporador que en el caso de *E. coli*. Las condiciones de electroporación para *B. suis* fueron las siguientes:

| | |
|--------------|-------|
| Capacitancia | 25 µF |
| Voltaje | 2.5kV |
| Resistencia | 400 Ω |

Luego de la electroporación, se incubaron las células por 1 hora a 37°C en medio rico con agitación, y finalmente se plaquearon en medio selectivo.

4.4 Conjugación biparental en placa

Se utilizó la conjugación biparental para transferir plásmidos conjugables desde cepas dadoras (movilizadoras) de *E. coli* S17 a cepas receptoras (*B. suis*). Para ello:

- 1) Las cepas dadora y receptora fueron cultivadas ON a 37°C con agitación (cada una por separado, con los antibióticos necesarios para cada cepa).
- 2) Se lavaron las células 3 veces (para lavar posibles restos de antibióticos) con PBS estéril.
- 3) Cada *pellet* fue resuspendido en 40-80 µl de PBS estéril.
- 4) Sobre una placa TSB (sin antibióticos) se sembró a modo de control una pequeña estría de cada cepa.
- 5) Se mezcló el resto de las células de ambas cepas y se sembró la mezcla en una placa de TSB sin antibióticos.
- 6) Se cultivaron las bacterias ON a 37°C.
- 7) Se realizó una replica a una placa con los antibióticos necesarios para seleccionar las bacterias transconjugantes.

5. Análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas

Las secuencias de *B. suis* se obtuvieron del sitio web de TIGR (*The Institute for Genomic Research*: <http://www.tigr.org>). Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas fueron almacenadas

y analizadas utilizando el programa Vector NTI (Invitrogen Life Technologies). La comparación de las secuencias publicadas de *B. suis* 1330 con las secuenciadas obtenidas se realizó utilizando BLAST. Los alineamientos de secuencias fueron realizados utilizando los programas ClustalW (273) y EMBOSS Needle (274). Este último programa fue utilizado para el alineamiento de secuencias de a pares para los cuales se calcularon los porcentajes de similitud y de identidad (entre las mismas).

La búsqueda de dominios de los genes a estudiar se realizó utilizando Pfam (275), BLAST (276) y daTAA (251). Este último es específico para autotransportadores triméricos. La búsqueda de genes homólogos se realizó utilizando BLAST y KEGG (277).

La identificación de secuencia señal para la secreción de las proteínas vía maquinaria Sec fue realizada con SignalP 3.0 (278). Las predicciones de secuencia señal por la vía TAT fueron realizadas con la aplicación PRED-TAT (279).

Las predicciones de localización sub-celular de una determinada proteína se realizaron utilizando diferentes aplicaciones: Gneg-PLoc (*Predicting Gram-negative bacteria protein subcellular location* (280)), MetaLocGramN (*Method for subcellular localization prediction of Gram-negative proteins* (281)), SOSUI-GramN (*High performance prediction for sub-cellular localization of proteins in Gram-negative bacteria* (282)), CELLO v.2.5 (*subCELLular LOcalization predictor* (283)) y PSORTb (*Subcellular Localization Prediction Tool* (284)).

Las búsquedas de segmentos transmembrana en secuencias proteicas se realizaron con las siguientes aplicaciones: TMHMM Server v. 2.0 (*Prediction of transmembrane helices in proteins*(285)), TMPred (*Prediction of Transmembrane Regions and Orientation* (286)), DAS (Transmembrane prediction server (287)) y SACS MEMSAT (*Transmembrane Prediction Page* (288)).

6. Amplificación de secuencias mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Todas las amplificaciones fueron realizadas en microtubos de pared delgada de 0.2 ml.

6.1 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados tanto para PCR como *colony*-PCR se encuentran detallados en la tabla 6. Estos fueron provistos por Invitrogen Life Technologies y por Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA).

| Oligonucleótido | Secuencia (de 5' a 3')* | E.R. |
|-----------------|---------------------------------------|-------|
| KoMapA_F1 | GCGAAT <u>TCTCTCCGAGCAGATGCGCGTCG</u> | EcoRI |
| KoMapA_R1 | CGGGATCCGCCTGCGGGCTGGTCATCAGC | BamHI |
| KoMapA_F2 | CGGGATCC <u>TATGAGCGGCCATTACGGC</u> | BamHI |
| KoMapA_R2 | CGTCTAGATGATCCTTCAGGCTGACGACA | XbaI |
| KoBtaE_F1 | CGGGATCCATCGAGTGAGGCAAGAGTC | BamHI |
| KoBtaE_R1 | GGCTGCAGCATGAGATATAATCTCTTAT | PstI |
| KoBtaE_F2 | CGCTGCAGTGGAGCATAATCCGACCGCAGC | PstI |
| KoBtaE_R2 | GCGCATGCGTCACACACCAATGTCCAGT | SphI |
| KoBtaF_R1 | CGCTGCAGCTCCGCCTTCGCAGCGTCG | PstI |
| KoBtaF_F1 | GGGCATGCTGTCTGGACAGGCGTAGCTG | SphI |
| KoBtaF_R2 | CGGGATCCACCCAGACATCGCCGCCGC | BamHI |
| KoBtaF_F2 | GCCTGCAGCATGGCATAATATGCACCCG | PstI |
| RtMapA_F | ATGAAGGGCGATGAAATCAC | |
| RtMapA_R | GGCTTGAACGTATTGGCAAG | |
| RtBtaF_L | TGCAAGGTCAGATCAACAGC | |
| RtBtaF_R | ACCTTTAAAGCCGCCAACAC | |
| MapA_F | AGCTCGAGGCAATATCCAGCCCTTCTATGAAT | XhoI |
| MapA_R | CTACTAGTAATTAAGGAATCGGGCCAAAGCAGGC | SpeI |
| BtaE_F | AGCTCGAGATGCCTGTTACCATGCGCCGCAGCG | XhoI |
| BtaE_R | CTACTAGTGTCCGATTATGCTCCAAGACTGATCT | SpeI |
| BtaF_F | CTGGTACCAGCGCTGGTGCAGAAGGTGATAGAC | KpnI |
| BtaF_R | CTGAGCTCCAATGCCCGCATGTGACGTTGCAAT | SacI |
| MapA_Int | TCGGCGGTCAGCGACTGGACG | |
| BtaE_Int | ATCGAACCTTGCTCCTTGCT | |
| BtaF_Int | TTGCAAGGTCAGATCAACAGCG | |
| AcF_MapA | TTCATATGTTGGCATCCGACAAG | NdeI |
| AcR_MapA | TTGTTCGACATCGGTCTTCGATCC | Sall |
| AcF_BtaE | ATCATATGCTGCATGATATTGAAAGTGGC | NdeI |
| AcR_BtaE | CTGTTCGACTCACGCTTCACCAAGCG | Sall |
| AcF_BtaF | CCCATATGCTAATTAGTGAAAAATAGGCAAG | NdeI |
| AcR_BtaF | CAGTCGACTCCGGCACGTGCCTC | Sall |

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados.

* Se subraya la porción de los oligonucleótidos que corresponden a secuencias reconocidas por enzimas de restricción. En los casos en que se incluyó un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, en la tercer columna se indica el nombre de la misma.

6.2 PCR desde ADN genómico de *B. suis*

En las reacciones de PCR en las que se empleó como molde ADN genómico de *B. suis*, la composición de la mezcla de reacción, por tubo, fue la siguiente:

| | |
|--|--|
| Buffer Taq 10X libre de Mg ⁺⁺ | 5 µl |
| MgCl ₂ (50mM) | * |
| dNTPs (40mM) | 1 µl |
| Primer Forward* (10 µM) | 2,5 µl |
| Primer Reverse* (10 µM) | 2,5 µl |
| Taq/KOD polimerasa | 0,5 µl |
| ADN molde | 1-5 µl |
| H ₂ O (milliQ) | Cant. suf. <u>para llevar a volumen</u> 50 µl |

*Variaron de acuerdo a la reacción.

6.3 Colony-PCR

Tanto en el caso de *colony*-PCR a partir de ADN de *E. coli* o *Brucella*, se empleó como molde ADN total proveniente de colonias bacterianas lisadas (sin purificar). Para obtener estos lisados los pasos fueron los siguientes:

- 1) Se picó la colonia de interés con un escarbadientes estéril
- 2) Las bacterias de la punta del escarbadientes fueron resuspendidas en 50 µl de H₂O milliQ estéril.
- 3) Se incubaron las bacterias durante 5 min a 98°C. En el caso de *Brucella*, las bacterias fueron congeladas para favorecer la ruptura celular.
- 4) Se centrifugaron las células a máxima velocidad 20 min.

Se utilizaron 2 a 5 µl del sobrenadante como molde para reacciones de PCR realizadas con las mismas proporciones descritas en el punto anterior (6.2) pero con un volumen final de reacción de 25 µl.

7. Aislamiento de ARN de *Brucella*, síntesis de ADNc y RT-PCR

7.1 Aislamiento de ARN de *Brucella*

Para el aislamiento de ARN de *Brucella* se utilizó el kit de Illustra *RNAspin* mini (GE, Cat.N 25-0050-70). Sin embargo no se siguió el protocolo exacto del kit, sino que se realizaron algunas modificaciones que mejoran la extracción en este género bacteriano que se detallan a continuación:

- Homogenización de la muestra y lisis celular:
 - 1) 1 ml del cultivo de bacterias fue centrifugado a 5.000 rpm durante 5 min.
 - 2) El *pellet* fue resuspendido en una solución compuesta por 85 µl de buffer TE, 15 µl de SDS10% y 1 µl de proteinasa K (10 µg/ml) e incubado por 1 h a 37°C.
 - 3) Se agregaron 250 µl de buffer RA1 (provisto en el kit) y 3.5 µl de β-mercaptoetanol. La mezcla fue luego vortexeada vigorosamente.

- Limpieza del lisado y retención en columna:
 - 4) El lisado fue transvasado a un tubo *RNAspin mini filter* y centrifugado a 11.000 x g, 1 min.
 - 5) Luego de descartar el filtro se transfirió el filtrado a un tubo nuevo al cual se le adicionaron 350 μ l de etanol 70%.
 - 6) Se dispuso el lisado en una *RNAspin mini column* y se lo centrifugó a 8.000 x g, por 30 seg. Luego se descartó el eluido.
- Lavados:
 - 7) Se agregaron a la columna 350 μ l de MDB y se la centrifugó a 11.000 x g durante 1 min. Luego se descartó el eluido.
- Elución:
 - 8) Se agregaron 40 μ l de agua DEPC y se centrifugó la columna a 11.000 x g 1 min. El eluido contuvo el ARN.

Luego, se corrió una alícuota en gel 0.8% agarosa para visualizar la muestra (previamente calentada a 60°C durante 5 minutos).

7.2 Degradación de ADN genómico

Para la degradación de ADN genómico se utilizó el kit RQ1 RNase-Free DNase de Promega. El protocolo se describe brevemente a continuación:

- 1) A 1 μ g de RNA se le agregaron 1 μ l de RNasa-free DNasa RQ1, 1 μ l de RNasa-free DNasa 10X Reaction Buffer, 0.5 μ l de inhibidor de RNasa y agua DEPC hasta llegar a 10 μ l finales.
- 2) Se incubó la mezcla durante 3 hs a 37°C.
- 3) Luego se agregó 1 μ l de RQ1 DNase stop solution y se incubó la mezcla a 65°C durante 10 min para terminar de inactivar la DNasa.

7.3 Síntesis de ADNc

Para la síntesis de ADNc a partir del ARN previamente obtenido, se utilizó la retrotranscriptasa viral M-MLV RT de Promega. Para ello:

- 1) 1 μ g de ARN fue tratado con ADNasa. Se agregaron 0.5 μ g de *random hexamers* (*random primers*).
- 2) Se incubó a 70°C durante 5 min y luego se llevó inmediatamente a hielo.
- 3) Se realizó un *spin* para que el líquido baje al fondo del tubo.
- 4) Se agregaron 5 μ l de M-MLV 5x buffer, 10 mM dNTPs, 25 unidades de RNaseOUT, 200 unidades de M-MLV RT y se agregó agua libre de ARNasas hasta 25 μ l finales.

5) Se incubó a 42°C durante 1h.

Controles: ídem pero sin M-MLV RT; y también ídem pero sin ARN como molde.

7.4 RT-PCR

Para la RT-PCR se utilizó 0.5-1 µl de ADNc como molde y se siguió un protocolo de PCR utilizando los oligonucleótidos correspondientes. Los oligonucleótidos se encuentran detallados en la tabla 13. La composición de la mezcla de cada tubo fue la siguiente:

| | |
|---------------------------|----------------------------------|
| cDNA | 0.5-1 µl |
| oligo Fwd 10 µM | 1 µl |
| oligo Rev 10 µM | 1 µl |
| Buffer 10X | 0.25 µl |
| MgCl ₂ 50 mM | 0.5 µl |
| dNTPs 10mM | 0.5 µl |
| H ₂ O (milliQ) | Cant. suf. para llevar a volumen |
| | 25 µl |

Ciclo:

- 1) 94°C 4 min
 - 2) 94°C 30 seg
 - 3) 57°C 30 seg
 - 4) 72°C 20 seg
- Repetir pasos 2 a 4 un total de 33 veces
- 5) 72°C 7 min

Visualización: 4 µl en gel agarosa 1.5%

8. Obtención de fracciones subcelulares

8.1 Obtención de membranas totales de *Brucella* seguida de un fuerte proceso de desnaturalización

Los protocolos que se utilizan en otras especies bacterianas para obtener por separado la membrana externa e interna, no funcionan en *Brucella* (por sus características estructurales). No se conocen protocolos que permitan separar la membrana interna de la externa de *Brucella*. A continuación se detalla la obtención de membranas totales a las que luego se las sometió a un fuerte proceso de desnaturalización y posterior análisis por SDS-PAGE y *Western blot*. Estos protocolos son una adaptación de otros previamente descritos (289):

- 1) Se cultivaron las bacterias hasta alcanzar la DO₆₀₀ deseada.
- 2) Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación (7.000 rpm 10 min).
- 3) Las bacterias fueron resuspendidas en 1 ml de Tris HCl 20 mM pH8, PMSF 1 mM.

- 4) Se rompieron las células utilizando un PreCellys (Bertin Technologies), para lo cual se realizaron tres sesiones a máxima potencia, de 30 seg cada una. Entre cada ronda se incubaron las bacterias en hielo. A partir de paso fue crítico mantener las muestras en frío.
- 5) Las células se centrifugaron a 7.000 rpm durante 10 min a 4°C.
- 6) Luego de pasar el SN a un tubo nuevo, se agregó 1 ml de Tris HCl 20 mM, PMSF 1 mM.
- 7) La mezcla se ultracentrifugó a 45.000 rpm durante una hora y media, a 4°C, en un rotor previamente enfriado. El SN correspondió a las proteínas citoplasmáticas solubles, y el *pellet* a las membranas totales.

A continuación se detalla el fuerte proceso de desnaturalización, durante el cual ya no fue necesario mantener las muestras en frío.

- 8) Se resuspendió el *pellet* en 1.2 ml de Hepes 20mM, 1% sarcosil y se incubó por 30 min a temp amb.
- 9) La mezcla se ultracentrifugó a 45.000 rpm durante 1 ½ hs a 4°C. Luego se descartó el SN.
- 10) El *pellet* fue resuspendido en 600 µl de Hepes 20 mM.
- 11) Luego de agregar 1.4 ml de ácido fórmico se incubó la mezcla ON a temperatura ambiente (protegida de la luz).
- 12) Se agregaron 1-9 ml de H₂O y se transvasó la mezcla a un tubo corex de vidrio.
- 13) La muestra fue liofilizada.
- 14) El liofilizado fue resuspendido en *cracking buffer*.

Las muestras resuspendidas en *cracking buffer* se conservaron a -20°C. Antes de realizar la electroforesis, se calentó la muestra a 99°C 5 min.

En los casos en que se obtuvieron las proteínas totales, se siguió el mismo protocolo hasta el punto 5, en el cual se tomó al producto de la centrifugación como proteínas totales.

8.2 Obtención de fracciones sub-celulares de *E. coli*

Con el fin de separar las fracciones subcelulares de *E. coli* el protocolo utilizado fue el siguiente:

- 1) Las bacterias fueron cultivadas hasta alcanzar la DO₆₀₀ deseada.
- 2) Las células fueron cosechadas por centrifugación (12.000 rpm 15 min, a temperatura ambiente).
- 3) Se resuspendieron las células en 4 ml de Tris HCl 20 mM pH8, PMSF 1 mM.
- 4) Se rompieron las bacterias utilizando un PreCellys (Bertin Technologies). Para ello se realizaron tres sesiones de ruptura a máxima potencia, de 30 seg cada una. Entre cada ronda se incubaron las bacterias en hielo. A partir de este paso fue crítico mantener las muestras en frío.
- 5) Se centrifugó la mezcla (5.000 rpm 15 min, a 4°C).

- 6) Se transfirió el SN a un tubo nuevo y se lo centrifugó (12.000 rpm 15 min, a 4°C). El *pellet* corresponde a los cuerpos de inclusión. Se lo resuspendió con Tris HCl 20 mM pH8.
- 7) Se transfirió el SN a un tubo nuevo y se lo ultracentrifugó (45.000 rpm durante una hora, a 4°C). El SN corresponde a las proteínas citoplasmáticas solubles; y el *pellet* a membranas totales, las cuales se resuspendieron en Tris HCl 20 mM.

Todas las fracciones se conservaron a -20°C.

9. Electroforesis de proteínas

9.1 Geles desnaturalizantes tradicionales

Las muestras fueron resuspendidas en *buffer* de siembra (290) y calentadas a 99° C por 5 min. Luego fueron sometidas a electroforesis en gel discontinuo (290) de poliacrilamida 12% con SDS (desnaturalizante), cuya composición se describe a continuación (Tabla 7):

| Solución Stock | Gel corrida 12% | Stacking gel |
|--------------------------------|-----------------|--------------|
| H ₂ O _{dd} | 1.65 ml | 0.78 ml |
| Tris HCl 1.5M pH 8.8 | 1.25 ml | - |
| Tris HCl 0.25M pH 6.8 | - | 1.25 ml |
| Acrilamida:bisacrilamida* | 2 ml | 0.425 ml |
| SDS 20% | 25 µl | 12,5 µl |
| TEMED | 3.5 µl | 3 µl |
| APS 10% | 50 µl | 30 µl |
| Volumen final | 5 ml | 2,5 ml |

Tabla 7. Composición de geles discontinuos desnaturalizantes de poliacrilamida.

* Acrilamida: bisacrilamida 30% (p/v) (29.2:0.8)

Buffer de corrida 10X: 30.3 gr de Tris; 144 gr de glicina, 10 gr SDS. Llevar a 1 litro con agua

9.2 Geles desnaturalizantes con Tricina

Con el fin de resolver bien proteínas de pequeño tamaño se realizaron electroforesis en gel discontinuo con tricina y SDS (desnaturalizante) (291). Estos geles permiten obtener una mejor resolución de proteínas con peso molecular menor a 100 kDa. El *buffer* de siembra utilizado fue el mismo que con los geles desnaturalizantes tradicionales. En la tabla 8 se encuentra la composición de este tipo de geles.

| Solución Stock | Gel corrida 10% | Stacking gel |
|---------------------------|-----------------|--------------|
| H ₂ O milliQ | 1.115 ml | 1.9 ml |
| Tris HCl 3 M pH 8.5 | 1.66 ml | - |
| Tris HCl 0.4 M pH 7.5 | - | 0.775 ml |
| Acrilamida:bisacrilamida* | 1 ml | 0.25 ml |
| Glicerol | 0.66 ml | - |
| SDS 10% | 50 µl | 30 µl |
| TEMED | 2.5 µl | 2 µl |
| APS 10% | 25 µl | 40 µl |
| Volumen final | 5 ml | 2,5 ml |

Tabla 8. Composición de geles discontinuos desnaturizantes de poliacrilamida con Tricina.

* Acrilamida: bisacrilamida 30% (p/v) (29.2:0.8)

Buffer de corrida anódico 1 X: Tris-HCl 0.2 M pH 8.9

Buffer de corrida catódico 1 X: Tris 0.1 M; Tricina 0.1M; SDS 0.1%. No es necesario ajustar el pH

9.3 Geles semi-nativos

La separación de proteínas en geles semi-nativos fue realizada basándose en protocolos preexistentes (290). Brevemente a las muestras se les adicionó un volumen de *buffer* de siembra apropiado (*buffer* 2X: Tris 20 mM pH8.0; EDTA 2 mM pH 8.0; sacarosa 40%; azul de bromofenol 0.02%). En el caso de muestras de *E. coli* se agregó 0.05% de SDS, y para *Brucella* 0.1%; luego se las incubó durante unos minutos en hielo y se las sometió a electroforesis en gel discontinuo semi-nativo, cuya composición se describe en la tabla 9. Cabe destacar que ni el *buffer* de corrida ni el gel contienen SDS. La electroforesis se llevó a cabo con la cuba inmersa en hielo, de modo que ésta se desarrolle a baja temperatura.

| Solución Stock | Gel corrida 10% | Stacking gel |
|--------------------------------|-----------------|--------------|
| H ₂ O _{dd} | 2.42 ml | 2.42 ml |
| Tris HCl 1.5M pH 8.8 | 1.5 ml | - |
| Tris HCl 0.5M pH 6.8 | - | 1 ml |
| Acrilamida:bisacrilamida* | 2 ml | 0.5 ml |
| TEMED | 3 µl | 3 µl |
| APS 10% | 75 µl | 75 µl |
| Volumen final aprox. | 6 ml | 4 ml |

Tabla 9. Composición de geles discontinuos semi-nativos de poliacrilamida.

* Acrilamida: bisacrilamida (29:1)

Buffer de corrida 1X: 3 gr de Tris, 14.4 gr de glicina. Llevar a 1 litro con agua. No hace falta ajustar el pH; se recomienda preparar en el momento.

10. Obtención de anticuerpos policlonales

10.1 Obtención de los péptidos inyectados.

Se generaron anticuerpos policlonales anti-BtaE, anti-BtaF y anti-MapA. En cada caso se clonó y purificó una porción de la proteína de interés con la cual se inmunizaron ratones. En el caso de los autotransportadores, se clonaron porciones del dominio pasajero. En la tabla 10 se detallan los oligonucleótidos utilizados para cada gen, la longitud del segmento clonado y el vector utilizado. En el extremo 5' de cada uno de los oligos *forward* se agregó la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción NdeI (y dos bases extra al azar, en el 5'), mientras que al 5' de los oligos *reverse* se les adicionó la secuencia de reconocimiento de la enzima Sall (y otras dos bases al azar, en el extremo 5'). Esto permitió el clonado de los fragmentos amplificados en plásmidos de la familia pET utilizando los sitios de restricción para las enzimas NdeI y Sall, respetando el marco de lectura original de los insertos. De este modo se obtuvieron los plásmidos pAcMapA, pAcBtaE y pAcBtaF. Las construcciones se confirmaron por *miniprep* seguida de digestión y análisis del patrón obtenido y por PCR. Además por secuenciación de cada construcción se confirmó que las secuencias clonadas no tuvieran errores.

| Gen | Oligonucleótidos | | Región amplificada (pb) | Vector | Plásmido obtenido |
|-------------|------------------|----------|-------------------------|---------|-------------------|
| <i>mapA</i> | AcF_MapA | AcR_MapA | 720 | pET22 b | pAcMapA |
| <i>btaE</i> | AcF_BtaE | AcR_BtaE | 654 | pET28 a | pAcBtaE |
| <i>btaF</i> | AcF_BtaF | AcR_BtaF | 456 | pET28 a | pAcBtaF |

Tabla 10. Construcciones utilizadas para generar péptidos utilizados en la obtención de anticuerpos.

Se detalla para cada gen, los oligonucleótidos utilizados para amplificar el fragmento de interés, el tamaño del mismo, el vector en el que se lo clonó; y finalmente el plásmido obtenido.

Con cada uno de los plásmidos obtenidos (pAcXXX) se transformó *E. coli* BL21, se puso a punto la concentración de IPTG en la que el péptido de interés se sobreexpresó y se determinó la localización sub-celular de cada uno de los péptidos. En cada caso se confirmó la identidad del péptido mediante *Western blot* utilizando anticuerpos anti-HisTag ya que los péptidos tienen fusionados dicho *tag*. Luego se procedió a la purificación de cada péptido y a la inoculación de ratones. La purificación de los péptidos fue compleja ya que éstos formaron grandes agregados, lo cual dificultó su separación por tamaño. En el caso del péptido derivado de BtaE, la purificación se realizó a partir de la fracción correspondiente a proteínas citoplasmáticas solubles y se realizó mediante HPLC (Cromatografía líquida a alta presión). El primer lugar se utilizó una columna de Níquel (IMAC) y luego dos columnas que resuelven en función del tamaño: S-75 y S-200. En la primera inoculación de ratones se adicionó a la muestra adyuvante completo, mientras que en las demás se utilizó adyuvante incompleto.

En el caso de BtaF se trató de purificar el péptido utilizando HPLC con columna de níquel; sin embargo la unión del péptido a la columna no fue eficiente a pesar de tener en su extremo N-terminal el HisTag. Es por eso que se utilizó un método alternativo, que consistió en lavar los cuerpos de inclusión y luego separar las proteínas mediante SDS-PAGE. Para el lavado de los cuerpos de inclusión el protocolo utilizado fue el siguiente:

- 1) Se resuspendió el *pellet* correspondiente a la fracción que contiene los cuerpos de inclusión en *buffer* con Tritón X-100 0.5%, EDTA 10mM, 1 mM PMSF.
- 2) La muestra fue incubada durante 10 min a temperatura ambiente con agitación.
- 3) La preparación fue centrifugada (12.000 rpm durante 10 min).
- 4) El *pellet* fue resuspendido en agua centrifugado nuevamente (12.000 rpm durante 20 min).
- 5) El lavado con agua se repitió otras 2 veces (en total fueron 3 lavados).

De este modo se obtuvieron el *pellet* correspondiente a los cuerpos de inclusión más limpios y fracciones correspondientes a los lavados (SN corresponde al sobrenadante del punto 3, mientras que los sobrenadantes obtenidos en los 3 lavados con agua se denominaron Snp1 al Snp3). Se tomaron las fracciones que contenían mayoritariamente al péptido de interés que fueron los sobrenadantes de los pasos de lavado (SN y Snp1-3). Salvo la fracción SN que contenía una alta concentración de Tritón X-100, se concentraron los demás sobrenadantes. Las fracciones fueron sometidas a una separación en SDS-PAGE en gel 10% de calles anchas. Luego el gel fue sometido a un proceso de *crosslinking* incubándolo 40 minutos en glutaraldehído 2%, se lo lavó con abundante agua y se lo enjuagó ON. Al otro día se tiñó el gel y se lo volvió a enjuagar con abundante H₂O, de modo de poder visualizar las bandas de las proteínas y lavar posibles residuos de ácido acético utilizado para desteñir el gel. Finalmente, se cortó en cada gel la banda de interés, la cual fue liofilizada y conservada a -20°C. Por otro lado se estimó la concentración del péptido en la fracción sometida a SDS-PAGE, corriendo una alícuota en un gel en el que se corrieron también distintas concentraciones conocidas de BSA. Luego, utilizando el programa ImageJ y comparando las intensidades de las bandas se estimó la concentración del péptido en la alícuota. Teniendo en cuenta la concentración y el volumen sembrado en el gel, se estimó la masa del péptido recuperada en las bandas cortadas. Al momento de cada inoculación, la cantidad adecuada de liofilizado fue resuspendida en PBS estéril, agregando en la primer inoculación adyuvante incompleto; dado el carácter inmunogénico de la poliacrilamida de la propia muestra no fue necesario utilizar adyuvante completo. En las demás inoculaciones no se agregó ningún adyuvante. El uso de proteínas obtenidas como bandas a partir de geles SDS-PAGE es muy útil cuando, como ocurrió en este caso, la purificación de la proteína es compleja mediante otros métodos (292). Además, esta

técnica aumenta la respuesta inmune, ya que la poliacrilamida ayuda a retener el antígeno en el animal, actuando como adyuvante (293).

Por último, en el caso de MapA, el péptido se purificó por HPLC a partir de proteínas citoplasmáticas solubles, utilizando una columna de níquel y luego una columna S-75. Dado que la separación por tamaño no fue eficiente, se utilizó un método similar al utilizado para purificar el péptido derivado de BtaF. La fracción obtenida luego de la separación en la columna S-75 que contenía mayoritariamente al péptido, fue sometida a SDS-PAGE en gel de calles anchas. De este modo se separaron las proteínas, se cortó la banda del gel que correspondía al péptido derivado de MapA. Esta banda de gel fue liofilizada y utilizada del mismo modo que la banda que contenía al péptido derivado de BtaF, para la inoculación de ratones.

En todas las inoculaciones, los ratones utilizados fueron machos C57 de 6 semanas; en cada inoculación, se inyectaron 25 µg de antígeno. Para BtaE se utilizaron 10 ratones, mientras que para las otras dos proteínas se utilizaron 5 ratones. El esquema de inmunización y la manipulación de los animales fueron llevados a cabo por personal entrenado del bioterio de la FIL. Los procedimientos realizados con animales fueron llevados a cabo de acuerdo a las regulaciones del Instituto así también como a las regulaciones gubernamentales, de modo de provocarles el menor sufrimiento posible.

10.2 Esquema de inmunización (por ratón).

Se realizaron tres inmunizaciones de 0.2 ml cada una (con un intervalo de nueve a doce días entre una y otra), la primera intraperitoneal; y las siguientes subcutáneas. Quince días después de la tercer inoculación se realizó el sangrado total de los ratones. Todas las extracciones de sangre incluyendo una previa a la primer inoculación para obtener suero pre-inmune, se efectuaron con los ratones anestesiados con ketamina y xilacina (80 mg/kg y 5-10 mg/kg respectivamente).

10.3 Obtención del suero a partir de la sangre.

La sangre extraída de los ratones se incubó 1 h a 37°C y luego ON a 4°C para permitir la formación de coágulos. Luego se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 min para separar los glóbulos rojos que no fueron incluidos en los coágulos y se transfirió el SN (que corresponde al suero) a varios tubos limpios y estériles. La especificidad del antisuero fue evaluada mediante *Western blot*. Las alícuotas se conservaron a -20°C.

11. Western blot

A continuación se describe brevemente el protocolo utilizado para los *Western blot*:

- 1) Se transfirieron las proteínas previamente separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida a una membrana PDVF (*Hydrophobic polyvinylidene difluoride*, GE Healthcare).
- 2) Se bloqueó la membrana incubándola en TBS 5% leche descremada (p/v), ON a 4°C con agitación.
- 3) Se incubó la membrana con el anticuerpo primario (dilución adecuada, en TBS- leche 5%) durante 2 hs, a temp ambiente con agitación suave.
- 4) La membrana fue lavada 3 veces con TBS 0.05% Tween (cada lavado tuvo una duración de 5-10 min).
- 5) La membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a peroxidasa de rabanito (1:30.000 en TBS- leche 5%; de Santa Cruz) durante 1 h, a temp ambiente con agitación suave.
- 6) La membrana fue lavada 2 veces con TBS 0.05% Tween (cada lavado tuvo una duración de 5-10 min)
- 7) La membrana fue lavada una vez con TBS (el lavado tuvo una duración de 5-10 min).
- 8) La membrana fue revelada con ECL Plus (Amersham).

Los antisueros fueron preadsorbidos. Para ello en el caso de muestras de *E. coli* se utilizaron extractos de *E. coli* portando los vectores pET28 o pET22 vacíos y en el caso de *Brucella* se utilizaron extractos totales de la doble mutante *B. suis* $\Delta btaE\Delta btaF$ o de la mutante *mapA*. En el caso de los anticuerpos anti-MapA, éstos fueron preadsorbidos utilizando al mismo tiempo extractos totales de la mutante *mapA* y de *E. coli* transformada con pET22 vacío.

12. Obtención de mutantes en *B. suis* y sus respectivas cepas complementadas

12.1 Obtención de las cepas mutantes

Con el fin de obtener mutantes por delección de cada uno de los distintos genes, en cada caso se amplificaron las regiones río arriba y abajo de los genes, utilizando oligonucleótidos específicos. En la figura 11A se puede observar un esquema representativo (sección I.1. de Resultados). Para amplificar dichas regiones, se utilizaron oligos que tienen adicionado en su 5' secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción. La secuencia de restricción del oligo *reverse* de la región río arriba (representado en el esquema como KoGenX_R1) y la del *forward* de la región río abajo (KoGenX_F2) es la misma, comparten la enzima de restricción que los reconoce (BamHI en el caso de *mapA*, y PstI en los casos de *btaE* y *btaF*). Esto permitió ligar los dos

fragmentos amplificados entre sí, obteniendo un nuevo fragmento compuesto por las regiones río abajo y arriba de cada gen. Este fragmento fue clonado en el vector pK18mobsacB (268), utilizando las enzimas de restricción adicionales por los oligos de los extremos (en el esquema: KoGenX_F1 y KoGenX_R2), obteniéndose los plásmidos p Δ mapA, p Δ btaE y p Δ btaF. En todos los casos se confirmó que la secuencia del inserto no presentara errores mediante secuenciación. Es importante destacar que el origen de replicación de estos plásmidos no es funcional en *Brucella*. En la Tabla 11 se encuentra el detalle de los oligonucleótidos utilizados en cada caso para amplificar las regiones río arriba y abajo de cada gen, los tamaños de los productos amplificados y los plásmidos obtenidos, con los cuales se generaron cada una de las mutantes.

| Gen | Región río abajo | | | Región río arriba | | | Plásmido obtenido |
|-------------|------------------|-----------|-----------------|-------------------|-----------|-----------------|-------------------|
| | Oligonucleótidos | | pb amplificadas | Oligonucleótidos | | pb amplificadas | |
| <i>mapA</i> | KoMapA_F1 | KoMapA_R1 | 306 | KoMapA_F2 | KoMapA_R2 | 391 | p Δ mapA |
| <i>btaE</i> | KoBtaE_F1 | KoBtaE_R1 | 463 | KoBtaE_F2 | KoBtaE_R2 | 332 | p Δ btaE |
| <i>btaF</i> | KoBtaF_F1 | KoBtaF_R1 | 371 | KoBtaF_F2 | KoBtaF_R2 | 379 | p Δ btaF |

Tabla 11. Detalles de la construcción de los plásmidos utilizados para la obtención de mutantes por delección.

Para obtener las cepas mutantes, los plásmidos fueron introducidos en *B. suis* por electroporación o conjugación biparental (empleando al cepa S17 de *E. coli* como dadora) y luego se seleccionaron los eventos de simple recombinación al cromosoma, plaqueando las bacterias en TA kanamicina (resistencia provista por el plásmido). Los eventos de recombinación fueron confirmados por *colony*-PCR. Luego, una colonia simple recombinante fue inoculada en medio TSB (sin antibiótico) y cultivada 16 horas a 37°C. Se seleccionaron colonias dobles recombinantes plaqueando en TSA sacarosa 10%. Se confirmó que los clones resistentes a sacarosa fuesen sensibles a kanamicina. Los clones dobles recombinantes se confirmaron por *colony*-PCR. Para esto se utilizaron dos pares de oligos:

- Uno de los oligos utilizados en la obtención de la mutante junto con un oligo interno del gen. En este caso se espera que ocurra amplificación únicamente en presencia del gen silvestre ya que el oligo interno no puede aparearse en presencia de una copia del gen delecionada.
- Los oligos F1 y R2 utilizados en la obtención de la mutante. Con esta combinación de oligos la presencia del gen silvestre da lugar a la amplificación de un producto de mayor longitud que en el caso de la versión delecionada.

El detalle de los oligonucleótidos utilizados para discernir si las colonias dobles recombinantes eran cepas con el gen delecionado, o si tenían el genotipo silvestre se encuentra en la Tabla 12.

| Gen | Oligonucleótidos | | pb amplificadas | | Oligonucleótidos | | pb amplificadas | |
|-------------|------------------|----------|-----------------|---------|------------------|-----------|-----------------|---------|
| | | | Silvestre | Mutante | | | Silvestre | Mutante |
| <i>mapA</i> | KoMapA_F1 | MapA_Int | 537 | - | KoMapA_F1 | KoMapA_R2 | 5370 | 697 |
| <i>btaE</i> | KoBtaE_F1 | BtaE_Int | 780 | - | KoBtaE_F1 | KoBtaE_R2 | 3066 | 795 |
| <i>btaF</i> | KoBtaF_R2 | BtaF_Int | 656 | - | KoBtaF_F1 | KoBtaF_R2 | 1618 | 750 |

Tabla 12. Oligonucleótidos utilizados para discernir entre dobles recombinantes con el gen deletado o silvestre. Para cada gen se indican los dos pares de oligonucleótidos utilizados, y para cada par se detalla la cantidad de pb amplificadas (pb amplificadas) en presencia de la versión silvestre o deletada (mutante) del gen.

Por otro lado, mediante RT-PCR (ver sección 7.4.) se pudo evaluar la transcripción de cada uno de los gens. En la tabla 13 se indican los oligonucleótidos utilizados, y el tamaño esperado de las regiones amplificadas.

| Gen | Oligonucleótidos | | pb amplificadas |
|-------------|------------------|----------|-----------------|
| <i>mapA</i> | RtMapA_F | RtMapA_R | 146 |
| <i>btaE</i> | AcF_BtaE | BtaE_Int | 224 |
| <i>btaF</i> | RtBtaF_L | RtBtaF_R | 134 |

Tabla 13. Oligonucleótidos utilizados para confirmar las mutaciones mediante RT-PCR.

En cada caso se indica la cantidad de pb amplificadas (pb amplificadas).

En el caso de la obtención de la doble mutante ($\Delta btaE\Delta btaF$) el procedimiento fue el mismo que para las simples mutantes, con la diferencia que en lugar de partir de la cepa silvestre de *B. suis*, la deleción de *btaF* se generó partiendo de la mutante en *btaE*.

12.2 Obtención de las cepas complementadas

Se clonó cada uno de los genes junto con la región flanqueante que se encuentra río arriba del gen en el plásmido pBBR1MCS (270). Este es un plásmido de número medio de copias, con un origen de replicación funcional en *Brucella*. En la tabla 14 se encuentra el detalle de los oligonucleótidos utilizados, el tamaño de la región amplificada, y el plásmido obtenido en cada caso. Así, se obtuvieron los plásmidos pBBR*mapA*, pBBR*btaE* y pBBR*btaF*. En todos los casos se secuenció el inserto de modo de corroborar que la secuencia fuese exactamente la misma que la secuencia genómica.

| Gen | Oligonucleótidos | | pb amplificadas | Plásmido |
|-------------|------------------|--------|-----------------|------------------|
| <i>mapA</i> | MapA_F | MapA_R | 5284 | pBBR <i>mapA</i> |
| <i>btaE</i> | BtaE_F | BtaE_R | 2839 | pBBR <i>btaE</i> |
| <i>btaF</i> | BtaF_F | BtaF_R | 1645 | pBBR <i>btaF</i> |

Tabla 14. Construcción de los plásmidos utilizados para obtener las cepas complementadas.

En cada caso se indican los oligonucleótidos utilizados, la cantidad de pb amplificadas (pb amplificadas) y el plásmido obtenido.

Los plásmidos fueron introducidos en las distintas cepas de *B. suis* mutantes, por conjugación biparental (empleando la cepa S17 de *E. coli* como dadora). Se seleccionaron los clones de *Brucella* transformadas plaqueando en medio TSA con ácido nalidíxico (selección de *B.*

suis) y cloranfenicol (resistencia provista por el plásmido). Lo esperado es que estos clones porten tanto la versión delecionada del gen (en el cromosoma) como el gen silvestre (en el plásmido). Para confirmar esto, se realizó *colony*-PCR utilizando los mismos 2 pares de oligos utilizados para confirmar las mutantes (Tabla 12).

13. Expresión heteróloga en *E. coli*

Se realizaron ensayos de expresión heteróloga similares a estudios realizados previamente por otros autores en otras especies bacterianas (209). Esta estrategia se basa en la expresión de cada uno de los genes de forma heteróloga en una cepa de *E. coli* que no es adherente ni invasiva (CC118, derivada de la cepa K12). Para ello se transformó esta cepa con los plásmidos pBBR*btaE* y pBBR*btaF*. La primer estrategia para llevar a cabo esta transformación fue la electroporación. Sin embargo por algún motivo que se desconoce, al preparar células electrocompetentes de esta cepa, éstas mostraron un cambio en la capacidad de *swimming* y *swarming* que no se revertía luego de la electroporación. Entonces para transformar esta cepa se decidió hacerlo por *shock* térmico. De este modo se obtuvieron las cepas *E. coli* pBBR*btaE* y *E. coli* pBBR*btaF*.

14. Análisis de la envoltura celular de *Brucella*

14.1 Disociación y *test* de aglutinación en acriflavina

Los cultivos de *B. suis* cultivados *in vitro* pueden sufrir espontáneamente variaciones en su morfología en el antígeno O de su LPS mediante un proceso denominado disociación (ver sección 2.2.a. de la Introducción) (294). Para detectar si un cultivo sufrió disociación existen distintos protocolos, el utilizado en esta tesis es el que se describe a continuación (294):

- 1) Se dispuso en un tubo transparente, 1 ml de solución de acriflavina 0.1% p/v.
- 2) Se picó una colonia y se emulsionó en la solución de acriflavina.
- 3) Luego se observó el comportamiento de la suspensión. Se ha descrito que las cepas lisas se emulsionan fácilmente y producen una suspensión homogénea de células que se encuentran bajo movimiento browniano. En cambio las cepas rugosas son difíciles de emulsionar y/o se aglutinan inmediatamente.

En los análisis se incluyeron las cepas silvestre de *B. suis* y de *B. ovis* a modo de controles de cepas lisa y rugosa, respectivamente.

14.2 Tolerancia a distintos compuestos

Se evaluó la supervivencia de *Brucella* al incubarla con distintos compuestos. Los compuestos analizados y las concentraciones finales utilizadas fueron: Tritón X-100 0.1%, SDS 0.1%, EDTA 200 µg/ml, DOC 0.1% y polimixina B. En el caso de la polimixina B se utilizaron distintas concentraciones de modo de poder construir una curva; estas concentraciones fueron: 0, 10, 50, 100 y 500 unidades/ml. El protocolo utilizado para evaluar las tolerancias fue el siguiente:

- 1) Se cultivaron las bacterias ON a 37°C, con agitación.
- 2) Las células se cosecharon por centrifugación (5.000 rpm 5 min) y se lavaron con *buffer* fosfato.
- 3) Se realizó una dilución de las bacterias en el mismo *buffer* de modo de obtener 4×10^5 u.f.c/ml.
- 4) Se agregaron a pocillos de una placa de 96 *wells* (CELLSTAR®, Greiner Bio-one; Cat no 655 180) 100 µl de la suspensión bacteriana y 100 µl de cada uno de los compuestos ó *buffer* (control).
- 5) Se incubó la placa sin agitación a 37°C (durante 20 min en los casos del Triton X-100 y DOC, 1 h para EDTA y polimixina B y 3 hs en el caso de EDTA).
- 6) Se realizaron diluciones seriadas en PBS estéril. Se realizó un recuento en placa de la cantidad de bacterias viables.

En el caso de la evaluación de la tolerancia a polimixina B, se incluyeron en el análisis a *E.coli* y *B. abortus* como controles adicionales de cepas sensible y resistente, respectivamente. Cada cepa se evaluó con cada compuesto por duplicado o triplicado. Los resultados se expresaron como porcentaje de u.f.c sobrevivientes.

14.3. Hiperpermeabilidad

Para evaluar la posibilidad de que por alguna alteración en la superficie bacteriana, alguna cepa se haya tornado hiperpermeable, se realizó un ensayo de tolerancia a lisozima (295). Para ello:

- 1) Se cultivaron las bacterias hasta llegar a la OD deseada.
- 2) Se tomaron 700 µl - 1 ml de cultivo, y se cosecharon las células por centrifugación (5 min a 5.000 rpm).
- 3) Las células fueron resuspendidas en una solución de lisozima 2 µg/ml en 0.05M de Tris Clorhídrico (pH 8.0 a 22°C).
- 4) Rápidamente se dispuso la suspensión en una cubeta y se midió la absorbancia cada 5 ó 10 segundos, a lo largo de algunos minutos.

15. Adhesión *in vitro*

15.1 Adhesión bacteria-bacteria (autoagregación)

Al estudiar la autoagregación en *E. coli* se utilizó un protocolo clásico el cual se describe a continuación, o el protocolo desarrollado para *Brucella* que se describe luego:

- 1) Se cultivaron las bacterias en medio adecuado, ON a 37°C.
- 2) Se realizó una dilución en medio fresco (1:100) en tubos idénticos entre sí, y se cultivaron ON a 37°C, con agitación.
- 3) Luego los cultivos se agitaron vigorosamente y se los dejó en reposo sobre una superficie plana. Se marcó un punto del tubo (por ejemplo 4 cm por encima del fondo), y se lo mantuvo durante varias horas en el mismo lugar, sin agitación, a temperatura ambiente. Con cuidado y utilizando una micropipeta, a distintos tiempos se tomaron 100 µl del cultivo a la altura de la marca del tubo. Luego se realizó una dilución en H₂O y se midió la DO₆₀₀.
- 4) Se graficó la DO_{600nm} en función del tiempo.

Para *B. suis* se utilizó el siguiente protocolo:

- 1) Se cultivaron las bacterias ON, a 37°C.
- 2) Se realizó una dilución de las bacterias en medio fresco (1:100) en tubos idénticos entre sí, y se cultivaron ON a 37°C con agitación.
- 3) Luego se agitaron los cultivos vigorosamente y se los dejó en reposo sobre una superficie plana. Se los mantuvo a temp ambiente, sin agitación, durante varios días. A distintos tiempos se tomaron fotografías y se calculó el porcentaje del medio de cultivo (en altura) que contenía células en suspensión (proporción opaca).
- 4) Se graficó la proporción del tubo opaca en función del tiempo.

15.2 Adhesión a superficies abióticas (*biofilm*)

La adhesión bacteriana a distintas superficies abióticas (placas de poliestireno como modelo de soporte hidrofóbico, y cubreobjetos de vidrio como modelo hidrofílico) se midió por el método de Cristal violeta. Brevemente el protocolo utilizado, en el caso de las placas de poliestireno fue el siguiente:

- 1) Se cultivaron las bacterias ON a 37°C, con agitación.
- 2) Se realizó una dilución 1:1000 del cultivo, de la cual se dispusieron 150 µl en cada pocillo de una placa de poliestireno *multiwell* de 96 pocillos (Cellstar, Greiner Bio One). Se selló la placa por fuera con *parafilm* de modo de desfavorecer la evaporación del medio de cultivo.
- 3) Se cultivaron las bacterias a 37°C ON, con agitación
- 4) Los pocillos fueron lavados 3 veces cuidadosamente, con NaCl 0.9%.

- 5) En cada pocillo se agregaron 150 μ l de Cristal violeta 0.1% (Acros Organics, Geel, Belgium; disuelto en H₂O) y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, protegidos de la luz.
- 6) Los pocillos fueron lavados 3 veces con NaCl 0.9%.
- 7) Se agregaron 150 μ l de etanol absoluto por pocillo.
- 8) El líquido de cada pocillo fue mezclado con una micropipeta, y se lo transvasó a uno de una placa nueva.
- 9) Se midió la absorbancia a $\lambda = 595$ o 570 nm. Para ello se utilizó un lector de microplaca DTX 880 *multimode* detector, Beckman Coulter. Para cada cepa el ensayo se realizó por octuplicado.

En caso de la adhesión a vidrio, el protocolo fue similar; con la diferencia de que la dilución 1:1000 se cultivó en tubos de ensayo limpios y estériles que tenían en su interior un trozo de cubreobjetos. Mediante tinción con Cristal violeta se evaluó la biomasa bacteriana adherida a esos trozos de vidrio, adaptando a tal fin el protocolo anterior.

15.3 Adhesión a componentes de la matriz extracelular

Se evaluó la adhesión bacteriana a componentes de la matriz extracelular y a fetuína en base al protocolo descrito previamente (296) que fue adaptado a las necesidades de este trabajo. Los componentes evaluados fueron: colágeno tipo I, fetuina, fibronectina y ácido hialurónico. Para ello:

- 1) Se realizaron diluciones de los distintos compuestos (0.1 mg/ml), en PBS.
- 2) Se dispusieron 50 μ l por pocillo de cada sustrato (por triplicado) en una placa *muliwell*, y se la incubó ON a 4°C sin agitación.
- 3) Las bacterias previamente cultivadas ON fueron lavadas con PBS estéril.
- 4) Las bacterias se resuspendieron en PBS estéril de modo de obtener 1×10^9 u.f.c/ml ($DO_{600}=0.2$ en el caso de *Brucella* y $DO_{600}=1$ en el caso de *E. coli*).
- 5) La placa fue lavada 3 veces con PBS estéril.
- 6) Se agregaron 50 μ l de la suspensión bacteriana, por pocillo.
- 7) La placa fue incubada 3 hs a 37°C, sin agitación.
- 8) Se lavaron 3 veces los pocillos con PBS estéril.
- 9) Para despegar las bacterias adheridas se agregaron 50 μ l de Tripsina-EDTA (Tripsina 0.05% (Gibco), EDTA 0.5% (USB)) por pocillo, y se incubó la placa 10 min a 37°C.
- 10) Se plaquearon diluciones en medios semi-sólidos con los antibióticos adecuados de modo de determinar el número de u.f.c recuperadas.

Los datos se expresaron como el porcentaje de bacterias incubadas que permanecieron adheridas a cada compuesto, referidos a la cepa control (*E. coli* pBBR1MCS o *B. suis* wt, según corresponda).

16. Líneas celulares

Para los ensayos de infección se utilizaron células HeLa (ATCC[®] ccl-2), A549 (ATCC CCL185, obtenida a partir de epitelio pulmonar humano) y la línea derivada de macrófagos murinos J774.A1 (ATCC[®] tib-67). Las células HeLa y A549 se cultivaron en medio DMEM (Gibco Invitrogen Cell Culture) suplementado con 2 mM glutamina (Sigma-Aldrich), 10% de suero fetal bovino (SFB, Natocor Argentina) en presencia de 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 0.025 µg/ml de Fungizone[®] (GIBCO Antibiótico - antimicótico, Cat N 15240-096). Los macrófagos J774 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco Invitrogen Cell Culture) suplementado con 2mM glutamina, 10% de SFB, en presencia de la misma combinación de antibióticos y antimicóticos que en el caso anterior. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera controlada con 5% de CO₂. Para el mantenimiento las células se utilizaron botellas de 25 o 75 cm² (Cellstar[®] greiner bio-one Cat N°658 175). Todos los ensayos de infección con las diferentes cepas de *B. suis* se realizaron con células entre el pasaje 4 y 12, contados a partir del descongelado de un *stock* mantenido en nitrógeno líquido.

17. Adhesión a células en cultivo

17.1 Infección de células eucariotas

Con el fin de determinar la cantidad de bacterias adheridas y cantidad de bacterias invasoras, se realizaron ensayos de infección a células eucariotas. En estos ensayos se utilizó una multiplicidad de infección (MOI, por *multiplicity of infection*) de 100:1. El protocolo utilizado fue el siguiente:

- 1) Se sembraron en placas de 24 *wells* (Cellstar[®] Greiner Bio-one Cat N°662 160) 5x10⁴ células por pocillo (en 1 ml de medio). Se las incubaron ON a 37°C en atmosfera con 5% CO₂ en el medio adecuado.
- 2) Las células fueron lavadas 2 veces con 1 ml de PBS estéril.
- 3) Por otro lado, el volumen necesario de un cultivo ON de bacterias, se diluyó en el medio adecuado (RPMI o DMEM) sin antibióticos de modo de obtener una suspensión de 1 x 10⁷ u.f.c/ml.

- 4) Se reemplazó el PBS del lavado de las células por 0.5 ml de la suspensión bacteriana. Se inocularon 6 *wells* por cepa; tres fueron utilizados para determinar la cantidad de bacterias totales asociadas, y las otras tres para determinar las invasoras (tratadas con gentamicina).
 - 5) Las placas fueron centrifugadas (1.000 rpm 10 min).
 - 6) Luego las placas fueron incubadas a 37°C 5% CO₂ durante 1 h en el caso de las líneas HeLa y A549, y 45 minutos en el caso de la línea J774.
- Para el recuento de bacterias totales asociadas:
 - 7a) Se lavaron 3 veces los pocillos con 500 µl de PBS estéril.
 - 8a) A cada pocillo se le agregaron 100 µl de Tritón X-100 0.1% (en H₂O).
 - 9a) La placa se incubó 10 min a 37°C.
 - 10a) Luego se realizaron diluciones seriadas del contenido de cada pocillo.
 - 11a) Se plaquearon las diluciones en placas con el antibiótico adecuado y se realizó el recuento en placa (5 gotas de 10 µl para cada dilución de cada pocillo).
 - Para el recuento de bacterias invasoras:
 - 7b) Se cambió el medio de cultivo de las células por medio fresco suplementado con gentamicina (20 µg/ml), de modo de matar las bacterias que no lograron invadir las células.
 - 8b) La placa se incubó 1 h a 37°C 5%CO₂.
 - 9b) Los pocillos se lavaron 3 veces con 500 µl de PBS estéril.
 - 10b) A cada pocillo se le agregaron 100 µl de Tritón X-100 0.1% (en H₂O).
 - 11b) Se incubó la placa 10 min a 37°C.
 - 12b) Luego se realizaron diluciones seriadas del contenido de cada pocillo.
 - 13b) Se plaquearon las diluciones en placas con el antibiótico adecuado, y se realizó el recuento en placa (5 gotas de 10 µl para cada dilución de cada pocillo).

Por medio de la diferencia entre bacterias totales asociadas e invasoras, se obtuvo el número de bacterias adheridas. De todas formas, a tiempos cortos como los utilizados en estos ensayos, la cantidad de bacterias invasoras es mínima, con lo cual se podrían despreciar en el recuento total. Además se calculó la eficiencia en la invasión como el porcentaje de bacterias invasoras, respecto a las adheridas.

En el caso de la mutante defectiva en MapA, se utilizó una variante a este protocolo; la lisis de las células eucariotas en lugar de realizarse con Tritón X-100 se realizó utilizando DOC 0.1%.

17.2 Competencia

Se evaluó la infección de células HeLa coinoculando las células con dos cepas bacterianas. A modo de control se infectaron células con la cepa silvestre de *Brucella* y otros pocillos con la cepa mutante. En otra serie de pocillos se coinocularon la cepa silvestre y mutante al mismo tiempo, con cantidades equivalentes de bacterias respetando la MOI final (MOI de 50:1 cada cepa, MOI final 100:1). El protocolo utilizado fue básicamente el mismo que el descrito en el punto anterior, pero las distintas cepas fueron marcadas con distintas resistencias a antibiótico de modo de poder determinar para cada una el número de bacterias adheridas e invasoras. La cepa silvestre fue transformada con un plásmido derivado de pBBR1MCS-2 que confiere resistencia a kanamicina (270) mientras que la mutante se transformó con un plásmido que confiere resistencia a cloranfenicol, ambos con el mismo origen de replicación. Al plaquear los lisados celulares que contenían las bacterias se utilizaron placas TSA con Kan y también placas con Cam, para así determinar las u.f.c/ml de cada cepa.

17.3 Efecto del AH en la adhesión a HeLa

El protocolo utilizado es el mismo que el descrito en el punto 17.1. con un único paso extra: luego de realizar la suspensión bacteriana de cada cepa en el medio de cultivo de las células eucariotas (paso 3), la suspensión bacteriana se alícuotó. A cada una de las distintas alícuotas se le agregó AH de modo que las concentraciones finales de AH fuesen: 0, 25, 50 y 100 µg/ml y se incubaron durante 30 min a 37°C. Luego, se continuó con el protocolo tal cual está indicado en el paso 4 del punto 17.1. Así se determinó para cada cepa y con cada concentración de AH, la cantidad de bacterias adheridas e invasoras.

18. Replicación intracelular

Se realizaron ensayos para evaluar la replicación intracelular de distintas cepas de *Brucella* tanto en células HeLa como macrófagos. Para ello se realizaron infecciones en las cuales, en el caso de HeLa la MOI utilizada fue 1:50, mientras que para macrófagos fue 1:20. A distintos tiempos se determinó la cantidad de u.f.c intracelulares. El protocolo fue similar al utilizado previamente (262) y similar al utilizado para determinar las bacterias intracelulares (ensayo con gentamicina, descrito en el punto 17.1). Hasta el punto 7b; se cambia el medio por uno con gentamicina; el resto del protocolo es idéntico con la salvedad que la cantidad de células eucariotas sembradas por pocillo fue 10^4 . Luego de 30 minutos de incubación con DMEM/RPMI con gentamicina, se vuelve a cambiar el medio por DMEM/RPMI fresco. A partir de ese momento (considerado tiempo 0), a distintos tiempos se determinó la cantidad de bacterias invasoras en

distintos pocillos (mediante lisado con Tritón X-100, y plaqueo de diluciones seriadas). Cada cepa fue analizada por triplicado

Aclaración: en el caso de la mutante *mapA*, el lisado de las células se realizó con DOC 0.1% en lugar de Tritón X-100 0.1%.

19. Microscopia confocal

19.1 Localización de las adhesinas sobre la superficie bacteriana

Para marcar las bacterias con proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *green fluorescent protein*), las cepas de *Brucella* fueron transformadas con el plásmido pGFP, que porta *gfp* bajo un promotor constitutivo (excitación a 488 nm, emisión a 509 nm); mientras que las cepas de *E. coli* fueron transformadas con el plásmido pH60 que también porta *gfp* bajo un promotor constitutivo (269).

Para detectar la presencia de las adhesinas sobre la superficie bacteriana mediante inmunofluorescencia (tanto *Brucella* como *E. coli*), el protocolo utilizado fue el siguiente:

- 1) Las bacterias marcadas con la proteína fluorescente GFP se cultivaron a 37°C con agitación, ON.
- 2) Se realizó una dilución del cultivo en medio fresco y se la cultivó durante 1 h.
- 3) Las células se cosecharon por centrifugación (5 min a 5.000 rpm).
- 4) Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS.
- 5) Las células se fijaron con paraformaldehído 3.7%, durante 15 minutos a 37°C.
- 6) Las células fueron lavadas 2 veces con PBS, y una vez con PBS-1% seroalbúmina bovina (BSA).
- 7) Las bacterias fueron resuspendidas en 40 µl del anticuerpo primario diluido 1:50 en PBS-BSA 0.5% e incubadas durante 40 min a temp ambiente, con agitación suave.
- 8) Se lavaron las bacterias 3 veces con PBS-BSA 1%.
- 9) Las bacterias fueron resuspendidas en 40 µl de anticuerpo anti-ratón conjugado a Cy3 (IgG-Cy3-*conjugated donkey anti-mouse antibody*, Jackson Immuno Research) diluido 1:250 en PBS BSA 0.5%, y se las incubó durante 40 min, a temperatura ambiente.
- 10) Las bacterias fueron lavadas 2 veces con PBS-BSA 1% y una vez con PBS.
- 11) Las bacterias fueron resuspendidas en un volumen de PBS.
- 12) Se montó una alícuota de la suspensión con Mowiol 4-88 (Calbiochem) en un portaobjetos, o sobre un *pad* de agarosa 1%. Se cubrieron las muestras con un cubreobjetos y se las observó con un microscopio confocal (Carl Zeiss LSM 5 Pascal *laser scanning microscope*) utilizando un

objetivo adecuado (Plan Apochromat 100x/1.4 *Oil differential interference contrast objective (DIC)*).

19.2 Determinación del polo de *Brucella* en el cual se encuentran las adhesinas

Se utilizaron cepas de *Brucella* transformadas por conjugación biparental con los marcadores polares fusionados a proteínas fluorescentes: el marcador de polo viejo PdhS, fusionado a eGFP (41); y el marcador de polo nuevo AidB, fusionado a YFP (42). Las construcciones fueron gentilmente cedidas por Xavier De Bolle. Una vez obtenidas las cepas de *Brucella* que portan los marcadores de polo, se realizó una inmunofluorescencia utilizando el protocolo descrito en el punto anterior (19.1), con la salvedad de que la forma de la bacteria se determinó por observación de contraste de fase (y no con GFP). Además en algunos casos junto con el anticuerpo secundario se agregó DAPI (4',6' diamidino-2-phenylindole) a una concentración final de 1 µg/ml, de modo de teñir el ADN lo cual contribuyó en la determinación de la forma de las bacterias. Estas muestras fueron observadas con otro microscopio confocal (Carl Zeiss LSM 510 Meta *laser scanning microscope*) utilizando un objetivo Plan-Apochromat 60x/1.4 oil DIC.

19.3 Microscopia confocal de infecciones

Para poder observar las diferencias en adhesión de otro modo, las células HeLa se cultivaron en las mismas placas de 24 pocillos que en los ensayos tradicionales, pero con cubreobjetos redondos estériles en el fondo. Se realizaron infecciones con las cepas de *Brucella* marcadas con GFP, siguiendo un protocolo muy similar al se indica en el punto 17.1. La diferencia con este protocolo es que en lugar de realizar el lisado de las células eucariotas con Tritón X-100 (punto 8a), luego de los lavados con PBS, las células se fijaron con paraformaldehído 3.7% (incubando a temperatura ambiente durante 20 min.). Luego se lavaron 3 veces nuevamente con PBS y se montaron los cubreobjetos (con las células hacia abajo) sobre un portaobjetos con Mowiol 4-88 20% (Calbiochem) como protector de la fluorescencia (*antifade*) y de la muestra. Las muestras fueron observadas por microscopia confocal (Carl Zeiss LSM 5 Pascal *laser scanning microscope*) utilizando un objetivo adecuado (*Plan Apochromat 100x/1.4 oil differential interference contrast (DIC) objective*).

La observación de la adhesina en bacterias asociadas a HeLa se realizó por inmunofluorescencia; el protocolo utilizado fue similar al previamente descrito. Luego de fijar las muestras con paraformaldehído y lavarlas con PBS, se realizó la inmunofluorescencia adaptando el protocolo descrito. Brevemente:

- 1) Cada cubreobjeto sobre el cual se encontraban adheridas las células infectadas fue lavado con PBS-BSA 1% durante 10 min.
- 2) El cubreobjeto fue incubado con el anticuerpo primario 1:50 en PBS-BSA 0.5% durante 1h, a temperatura amb.
- 3) Luego se los lavó 3 veces con PBS-BSA 1%.
- 4) Cada vidrio fue incubado con el anticuerpo anti-ratón conjugado a Cy3 (IgG-Cy3- *conjugated donkey anti-mouse antibody*, Jackson Immuno Research) diluido 1:250 en PBS BSA 0.5%, durante 1h a temperatura amb.
- 5) Se lavó cada muestra 2 veces con PBS BSA1% y luego una vez con PBS.
- 6) Se colocaron 3-4 µl de Mowiol 4-88 (Calbiochem) sobre un porta objetos, y se montó el vidrio con las células hacia abajo (quedando inmersas en el Mowiol).

Las muestras fueron observadas por microscopía confocal (Carl Zeiss LSM 5 Pascal *laser scanning microscope*) utilizando un objetivo adecuado (Plan Apochromat 100x/1.4 oil *DIC objective*).

20. Microscopía de barrido electrónico

Se utilizó el servicio de Microscopía Electrónica de Barrido del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”, el cual cuenta con un microscopio electrónico de barrido marca Philips modelo XL30 TMP New Look. La potencia del sistema del microscopio incluye magnificaciones entre 10 y 100.000x. Las muestras observadas fueron cultivos de *B. suis* wt y *B. suis* $\Delta mapA$, y para ello la preparación de las muestras fue la siguiente:

- 1) Se tomaron 200 µl de los cultivos bacterianos que se dejaron secar sobre el soporte (se probó utilizando vidrio y papel whatman).
- 2) Se fijaron las muestras incubándolas con paraformaldehído 2.5% durante 15 min, a temp amb.
- 3) Se realizaron dos incubaciones seguidas de 10 minutos cada una, sumergiendo la muestra en etanol 50%, luego otras dos en etanol 70%, y finalmente otras dos en etanol 90%.
- 4) Las muestras fueron conservadas sumergidas en etanol 100% hasta el momento del metalizado.
- 5) Las muestras fueron metalizadas con oro-paladio, en un metalizador Termo VG Scientific SC 7620.

Una vez finalizada la preparación de las muestras, se observaron en condiciones de alto vacío en el microscopio previamente mencionado.

21. Resistencia al complemento

Para evaluar la resistencia al complemento presente en el suero, se utilizó un protocolo adaptado a partir de uno previamente descrito (297). El mismo se detalla a continuación:

- 1) Las bacterias fueron cultivadas hasta una $DO_{600} = 0.3-0.5$.
- 2) A partir de 1-2 ml de cultivo las células fueron cosechadas y lavadas con PBS-MgCl₂ 5mM.
- 3) Las bacterias fueron resuspendidas en 750 μ l de PBS-MgCl₂ 5mM.
- 4) Se realizó una dilución de las bacterias en el mismo *buffer* hasta obtener una $DO_{600} = 0.01$ (equivalente a 1×10^7 u.f.c./ml en *E. coli* y 5×10^7 u.f.c./ml para *Brucella*).
- 5) En cada pocillo de una placa estéril de 96 pocillos, se dispusieron 50 μ l de la suspensión bacteriana y:
para *Brucella*: 50 μ l de suero
para *E. coli*: 10 μ l de suero + 40 μ l PBS-MgCl₂ 5 mM
A modo de control en algunos pocillos se agregó en lugar de suero, 50 μ l del *buffer*
- 6) La placa fue Incubada a 37°C durante 60 min en el caso de *E. coli* y 90 min en el caso de *Brucella*.
- 7) Se realizaron diluciones seriadas al décimo en PBS estéril y se plaquearon. Luego se determinó la cantidad de u.f.c./ml. Para cada cepa se calculó el porcentaje de bacterias sobrevivientes al incubarlas con suero, respecto a las bacterias incubadas en *buffer* (sin suero). Los resultados se expresaron relativizados a la cepa control, a la cual se le asignó el 100% (*E.coli* pBBR1MCS o *B.suis* wt, según corresponda).

A modo de comprobar que la acción bactericida del suero fuera debida al complemento, se realizó un control. Para ello se siguió el mismo protocolo mencionado anteriormente incubando cada cepa con suero, con *buffer* sin suero y además con suero previamente calentado a 56°C durante 30 minutos. Como consecuencia del calentamiento del suero, se inactivó el complemento (298). Estos experimentos fueron realizados por triplicado, tres veces con resultados similares. Se informan las u.f.c./ml luego de las incubaciones.

22. Antigenicidad de las proteínas (ELISA indirecto)

Para detectar si BtaE y BtaF son antigénicas (en chanchos y en humanos), se decidió evaluar la antigenicidad de los péptidos producidos a partir de las adhesinas para generar los anticuerpos en ratón, mediante ELISA indirecto. Cabe destacar que éstos péptidos corresponden a porciones de los dominios pasajeros, los cuales estarían expuestos en la superficie bacteriana. Tanto el péptido derivado de BtaE como de BtaF se encontraron en alta cantidad en la fracción subcelular enriquecida en cuerpos de inclusión de *E. coli* BL21 pAcBtaE y *E. coli* BL21 pAcBtaF, respectivamente.

El protocolo utilizado al evaluar los sueros provenientes de chanchos y humanos fue similar. En el caso de los humanos se contó con una muestra de un único paciente infectado con *B. suis*, y un paciente sano. Estas muestras fueron gentilmente cedidas por la Dra. Nidia Lucero, responsable del Servicio de Brucelosis de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS). El protocolo utilizado para evaluar los sueros humanos fue el siguiente:

- 1) Se recubrió cada pocillos de una placa *multiwell* de 96 pocillos (Greiner bio-one REF655061) con 50 μ l de la fracción sub-celular enriquecida en cuerpos de inclusión de alguna de las siguiente cepas: *E. coli* BL21 pAcBtaE, *E. coli* BL21 pAcBtaF, o la cepa control (*E. coli* BL21 transformada con el plásmido pET28 vacío), diluidas en *buffer* carbonato 0.06M pH 9.6, a una concentración final de 10 μ g/ml.
- 2) Se incubó la placa durante 2 hs a temp ambiente, con agitación muy suave.
- 3) Se retiró suavemente el líquido.
- 4) Cada pocillo se lavó con 100 μ l de PBS.
- 5) Cada pocillo se bloqueó con PBS-BSA 1% durante 1 ½ hs a 28°C.
- 6) Se lavaron los pocillos con PBS-Tween 20 0.05% (PBS-T), 3 veces.
- 7) Se realizó una incubación con suero de los distintos donantes (1:500) ON a 4°C.
- 8) Cada pocillo fue lavado 4 veces con PBS-T.
- 9) Se realizó una incubación con proteína A/G conjugada a fosfatasa alcalina intestinal (Thermo Scientific, 1:5000).
- 10) Se realizaron 2 lavados con PBS-T y luego uno con PBS.
- 11) Se reveló utilizando lector multiplaca a $\lambda=405$ nm (DTX 880 *multimode detector*, Beckman Coulter).

Para cada suero proveniente de individuo sano o enfermo, al valor obtenido en los pocillos en los que se había inmovilizado la fracción enriquecida en alguno de los péptidos, se le restó el valor promedio de los pocillos en los cuales se inmovilizó el control (*E. coli* pET28). Por ejemplo, a los valores de los pocillos en los cuales se inmovilizó la fracción enriquecida con el péptido derivado de BtaE analizados con suero de un determinado paciente, se le restó el valor promedio de los pocillo en los cuales se inmovilizó la fracción del control (plásmido vacío) y se utilizó el suero del mismo paciente. De este modo se pretende restar a la señal medida, la contribución de los demás elementos presentes en la fracción enriquecida en cuerpos de inclusión que no correspondieran al péptido de interés. El experimento se realizó por triplicado, cuatro veces; con resultados similares.

En el caso de los chanchos se contó con sueros de 14 individuos sanos y 14 enfermos gentilmente provistos por Sebastián Elena y Ana Nicola del SENASA. Al utilizar suero porcino el protocolo fue similar al descrito, al cual se le realizaron algunas modificaciones: el bloqueo (punto 5) se realizó con PBS-caseína 0.1% durante dos horas, a 37°C y el suero primario fue utilizado en una dilución 1:1000 en lugar de 1:500 como se utilizó para humanos (punto 7). Es importante destacar que la proteína A/G es capaz de unirse tanto a anticuerpos porcinos como humanos. En este caso los ensayos se realizaron dos veces, por triplicado.

23. Infección de ratones BALB/c.

Ratones hembras BALB/c de 6 a 8 semanas adquiridos en la *facility* de animales de la FIL fueron distribuidos de forma aleatoria en grupos de 10 ratones, al menos una semana antes de ser inoculados. Los animales se mantuvieron en la *facility* de la Facultad de Ciencias Veterinarias (Tandil) en compartimentos con ventilación adecuada (filtros). Estos experimentos fueron llevados a cabo por la Dra. Silvia Estein.

El protocolo utilizado fue similar a otros previamente descritos por distintos autores (169). Brevemente, ratones hembras BALB/c (10 por grupo, un grupo por cepa) fueron inoculados intragástricamente con una suspensión de aproximadamente 1.3×10^8 u.f.c en bicarbonato de sodio 10% mediante una cánula plástica introducida por la boca. Cinco ratones de cada grupo fueron sacrificados a los 7 y 30 días post-infección (p.i.); a los cuales se les extirpó el bazo. Se plaquearon en TSA (por duplicado) diluciones del homogenato de bazo, y se incubaron las placas durante 4 días a 37°C. Luego se contaron las u.f.c y estos datos se normalizaron mediante transformación log, lo cual permitió la evaluación mediante ANOVA, seguido por un *post test* de Dunnett (Prism 5.0; GraphPad Software, Inc.). Los experimentos se realizaron dos veces, con resultados similares.

Todos los protocolos fueron realizados siguiendo la premisa de minimizar el sufrimiento de los animales y utilizando el número mínimo de animales para asegurar la significancia estadística los resultados. Los procedimientos y manejo de animales fueron aprobados por el Comité del Bienestar Animal institucional, de acuerdo a la Política de Bienestar Animal (Act 087/02) de la Facultad de Medicina Veterinaria (Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires [U.N.C.P.B.A], Tandil, Argentina; <http://www.vet.unicen.edu.ar>)

24. Análisis estadístico.

Todos los experimentos fueron analizados utilizando el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc). Al comparar 2 grupos, la diferencia estadística se determinó con el *test* de Student (T test); mientras que al comprar 3 ó más grupos el *test* utilizado fue ANOVA de una

vía, seguido del *test* de Tukey o el de Dunnett. El criterio adoptado para determinar que una diferencia fuera estadísticamente significativa fue que $p < 0.05$.

Resultados

Capítulo I: Caracterización de BR_0072

I.1 Identificación de posibles adhesinas y estrategias utilizadas.

Con el fin de identificar factores de *Brucella suis* involucrados en la adhesión de la bacteria al hospedador, se realizó una búsqueda bioinformática en la secuencia publicada del genoma de *B. suis* 1330 (23) de todos los genes que codificarían posibles factores proteicos de adhesión. Para ello, la Dra. Diana Posadas realizó una búsqueda sistemática de proteínas predichas que pudieran expresar dominios asociados con la adhesión, según bases de datos como PFAM (275). Como resultado de esta búsqueda se obtuvieron 11 proteínas candidatas. En la figura 10 se puede observar un árbol filogenético con dichas proteínas, construido con el fin de estimar sus funciones y proximidad, a partir de posibles relaciones evolutivas (256). Al analizar este árbol se pueden distinguir 4 grupos: los primeros dos agruparían miembros de la familia de los autotransportadores. En particular, el grupo 1 está constituido por proteínas pertenecientes a los ATs de tipo I, mientras que en el segundo se pueden identificar proteínas pertenecientes a los ATs tipo II. En el tercer grupo se ubican proteínas que no pertenecerían a ninguna familia en particular y todas presentarían un único dominio asociado a la adhesión (hemaglutinina, intimina o adhesina). Por último, en el cuarto grupo se encuentran dos proteínas con dominios de invasina.

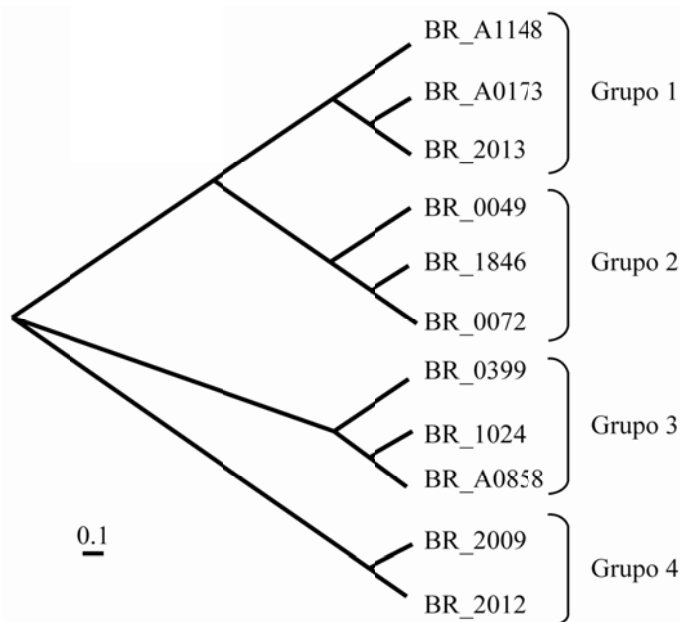


Figura 10. Árbol filogenético de posibles adhesinas codificadas en el genoma de *B. suis* 1330.

Mediante un análisis bioinformático se buscaron en el genoma de *B. suis* 1330, genes que codifiquen proteínas que presenten uno o más dominios asociados a la adhesión. De este modo se identificaron 11 genes candidatos. Las proteínas codificadas por los genes candidatos fueron agrupadas en cuatro grupos en un árbol filogenético construido utilizando el método de distancia *Neighbor Joining*. Adaptado del trabajo de Posadas (256).

La presencia de por lo menos 11 proteínas candidatas a estar involucradas en la adhesión, sugiere que *B. suis* podría expresar múltiples adhesinas. Las bacterias patógenas suelen expresar múltiples adhesinas, que pueden actuar sinérgicamente (reforzando su función) o diferencialmente (por ejemplo expresándose diferencialmente) (209). Además, expresar distintas adhesinas le podría permitir a *Brucella* modular su ciclo infeccioso dentro del hospedador. De hecho, en el año 2006 Castañeda-Roldán y colaboradores (208) postularon que *Brucella* expresaría varias moléculas de adhesión.

Se comenzó con la caracterización de las proteínas del grupo 1. Se confirmó que estas proteínas son miembros de la familia de los ATs tipo I. BR_A1148 había sido aislada también a través de un enfoque de *phage display* por su capacidad de unirse a fibronectina. Se demostró que esta proteína, denominada BmaC, es capaz de mediar la adhesión a fibronectina y a células no fagocíticas a través de su unión a fibronectina. Además, se observó que esta proteína se localiza unipolarmente sobre la superficie bacteriana (262). Durante la caracterización de BR_0173 y BR_2013 se obtuvieron evidencias que indican que las proteínas codificadas por ambos genes estarían implicadas en la adhesión de la bacteria a células del hospedador y en la autoagregación bacteriana (D. Posadas, V. Ruiz-Ranwez, A. Zorreguieta et al, no publicado). Cabe destacar que BR_2013 corresponde al autotransportador OmaA (261).

Por otro lado, dos de las proteínas del grupo 2 (BR_1846 y BR_0072) resultaron pertenecer a la familia de ATs II y por lo tanto se consideraron como candidatas interesantes a participar en adhesión (ver sección 3.2.a. de la Introducción). Llamativamente, si bien BR_0049 se agrupó con BR_1846 y BR_0072, BR_0049 no presentó dominios típicos de ATs tipo II (ver capítulo III de Resultados, sección III.I).

En el marco de esta tesis se exploró la función de las proteínas del grupo 2 en la fisiología de la bacteria y en la interacción con el hospedador.

Con el fin de estudiar la funcionalidad de las proteínas candidatas, se llevaron adelante dos estrategias: la caracterización fenotípica de mutantes obtenidas por delección del gen y un enfoque heterólogo, expresando la proteína en una cepa de *E. coli* no adhesiva ni invasiva. Este último enfoque se basa en la hipótesis que el autotransportador podría mediar su propia secreción aún en un hospedador sustituto. Para generar las mutantes se amplificó una región río arriba del gen (utilizando los oligonucleótidos KoGen_F1 y KoGen_R1), y otra correspondiente a la región río abajo (utilizando los oligonucleótidos KoGen_F2 y KoGen_R2) (Figura 11A). Estos fragmentos se ligaron entre sí y se clonaron en el vector pK18mobsacB (268), el cual contiene un origen de replicación funcional en *E. coli* pero no en *Brucella*. Las mutantes por delección del gen se

generaron por doble recombinación homóloga, luego de transferir el plásmido resultante por conjugación.

Con el fin de complementar las mutantes, los genes completos (incluidas las regiones flanqueantes no codificantes) fueron clonados en el plásmido de amplio rango pBBR1MCS (270). Para esto se utilizaron los oligonucleótidos Gen_F y Gen_R (Figura 11B). Luego, se transformó la cepa de *Brucella* mutante con el plásmido pBBRgen, obteniendo la cepa complementada.

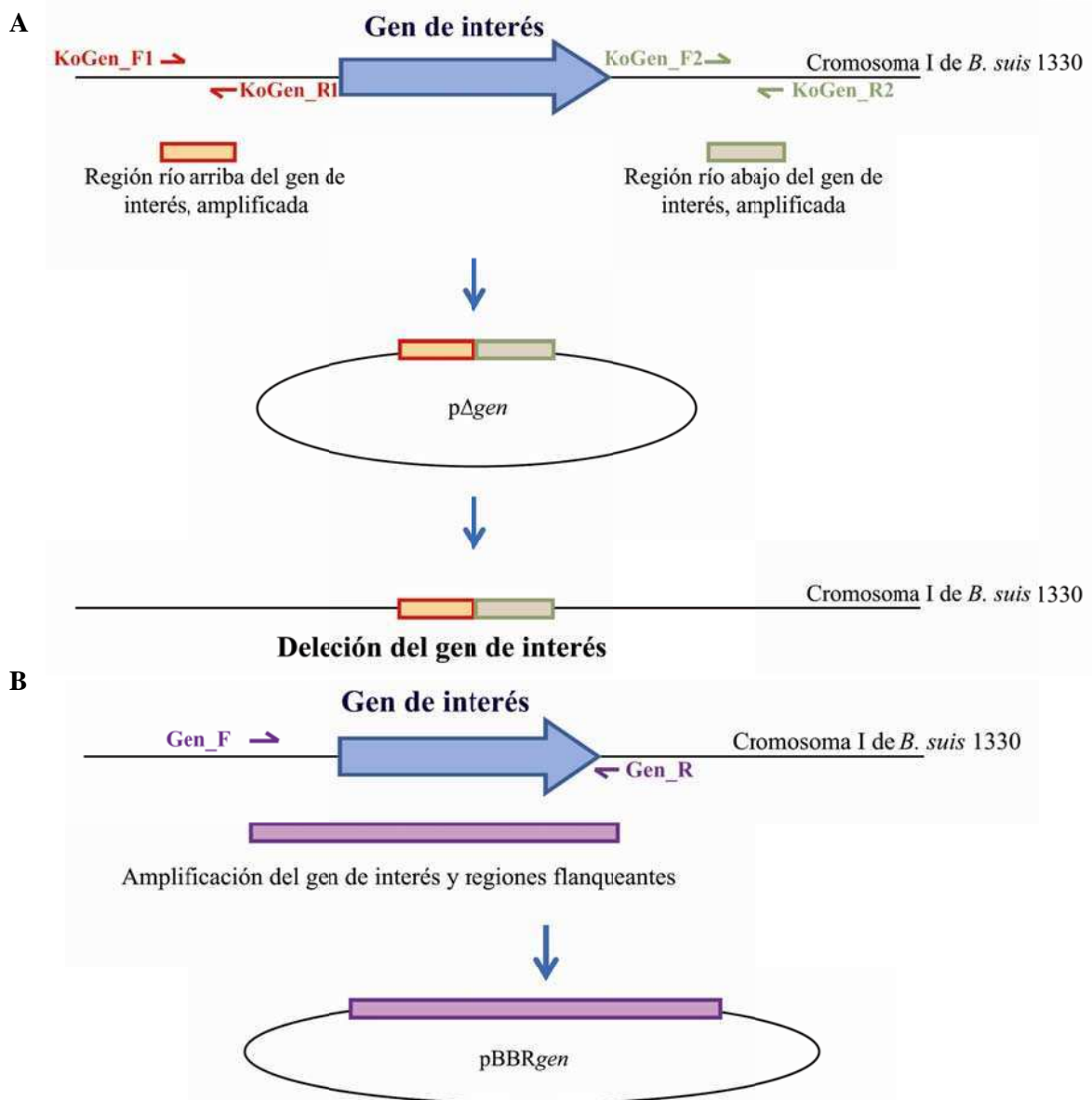


Figura 11. Esquema de obtención de plásmidos para la generación de cepas mutante y complementada.

(A) Esquema de la obtención del plásmido pΔgen, utilizado en la obtención de cepas de *B. suis* con un gen de interés deletado.

(B) Esquema de la obtención del plásmido pBBRgen (el cual es replicativo tanto en *E. coli* como *Brucella*) que porta el gen de interés junto con sus regiones flanqueantes.

La segunda estrategia consistió en expresar en forma heteróloga en una cepa no adherente ni invasiva de *E. coli* el gen que codifica para la adhesina candidata (209). Para ello, se transformó la cepa CC118 de *E. coli* con el plásmido pBBRgen el cual porta el gen de la adhesina y se evaluaron las propiedades conferidas al hospedador sustituto. Esta estrategia tiene la ventaja de proporcionar evidencias sobre adhesinas que puedan cumplir funciones redundantes con otras adhesinas en *Brucella*. Dado que la expresión del gen está regulada por su propio promotor, existe la posibilidad de una ineficiente expresión del gen en *E. coli*. Por este motivo será importante confirmar la expresión del gen.

I.2. Análisis bioinformático de BR_0072

El *locus* BR_0072 se localiza en el cromosoma I de *B. suis* 1330 entre las posiciones 78967 y 81189, y tiene una longitud de 2223 pares de bases (pb). La proteína predicha está anotada como una proteína putativa de membrana de 740 aminoácidos cuyo peso molecular estimado es de 75 kiloDalton (kDa). Río arriba de BR_0072 se encuentran los genes BR_0070 y BR_0071, los cuales se transcribirían en forma divergente a BR_0072 y codificarían proteínas hipotéticas conservadas (Figura 12A). Río abajo de BR_0072 y en la misma dirección de transcripción se encuentra BR_0073 cuyo producto correspondería a una proteína hipotética conservada. Río abajo de BR_0073 se ubica BR_0074, que se transcribiría en dirección opuesta y codificaría para una arginino succinato sintetasa (Figura 12A).

Utilizando SignalP (278) se determinó que la proteína codificada por BR_0072 tendría en su amino terminal una secuencia señal con sitio de clivaje entre los aminoácidos glicina y alanina de las posiciones 11 y 12, respectivamente, la cual mediaría el transporte de la proteína a través de la membrana interna vía la maquinaria Sec (278). Por otra parte, por análisis de dominios con la herramienta PFAM (275) se identificó la presencia de un dominio de tipo translocador típico de los autotransportadores de tipo II o triméricos (*YadA-like*) en la región C-terminal (ver sección 3.2.a. de la Introducción). Entre el dominio translocador y la secuencia señal se encuentra una región de 642 aminoácidos que correspondería al dominio “pasajero” del autotransportador (sección 3.2.a. de la Introducción). Por lo tanto, BR_0072 muestra la arquitectura general de los AT II y fue nombrada BtaE (por *Brucella trimeric autotransporter*). Dentro de la región que correspondería al dominio pasajero se identificaron tres repeticiones del motivo Hep_Hag (número de acceso PF05658) y cuatro del motivo HIM (número de acceso PF05662) (Figura 12 B). Se ha descrito que el motivo Hep_Hag está presente en la mayoría de las hemaglutininas e invasinas bacterianas. Incluso en estas proteínas se pueden encontrar hasta 10 repeticiones de dicho motivo. Además, el

motivo HIM también es frecuente en hemaglutininas e invasinas y se encuentra comúnmente asociado a Hep_Hag.

Como se mencionó en la sección 3.2.a. de la Introducción, se espera que los AT II tengan una estructura de tipo cabeza-conector-tallo-anclaje (Figura 8). Por análisis de BtaE con el programa y la base de datos daTAA (251) se identificaron varios segmentos correspondientes a cada una de dichas estructuras (Figura 12B). Las repeticiones del motivo funcional Hep_Hag coincidieron con los segmentos correspondientes a la cabeza, mientras que las repeticiones HIM se correspondieron únicamente a segmentos del conector. Tal como se esperaba, el segmento de anclaje a membrana coincidió con la región *YadA-like*. En concordancia con estas observaciones, un análisis reciente de BtaE con una versión actualizada de Pfam (versión 27.0), mostró la presencia de *head domains* y *coiled stalk domains* en reemplazo de los motivos Hep_Hag e HIM, respectivamente, aunque los números de acceso no se modificaron.

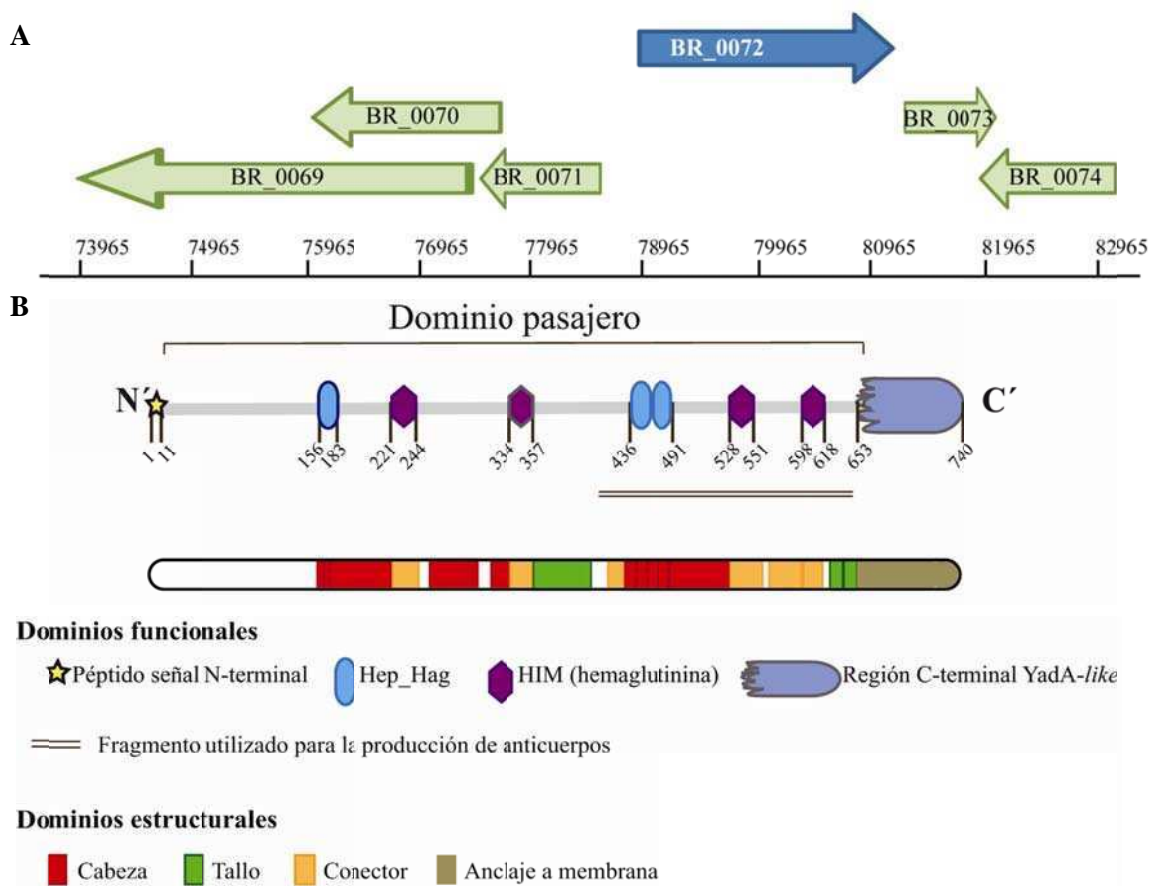


Figura 12. Entorno genético de *btaE* y dominios de la proteína

(A) Entorno genético de *btaE* (BR_0072). Construido en función al gráfico obtenido de TIGR CMR.

(B) Esquema de BtaE; se indican los dominios funcionales y estructurales que se reconocen a partir del análisis de secuencia.

Se utilizó la herramienta “Meta Server” del Instituto BioInfoBank (299), la cual permite predecir la estructura de una proteína y la compara con las estructuras conocidas de otras proteínas depositadas en distintas bases de datos. El análisis de BtaE utilizando ésta herramienta mostró, como se esperaba, una alta similitud en la estructura predicha del dominio C-terminal con dominios C-terminales de ATs II. También se obtuvo cierta similitud en la estructura predicha de la región comprendida entre los aminoácidos 564 a 620 de BtaE con la estructura depositada en PDB bajo el nombre 2qih_A. Esta estructura corresponde a un dominio del AT II UspA1 de *Moraxella catarrhalis*, responsable de la unión al receptor celular CEACAM1 (300). Por otro lado, al analizar BtaE mediante BLAST utilizando una base de datos que contiene proteínas o péptidos cuya estructura ha sido depositada en PDB, se encontró una similitud significativa con la secuencia de una porción de la cabeza del AT II BpaA de *Burkholderia pseudomallei* (3LA9_A) (301) y con la cabeza del AT II BadA de *Bartonella henselae* (3D9X_A) (302).

Por medio de BLAST y KEGG se analizó si la proteína BtaE se encuentra presente en otras especies de *Brucella* y otras cepas de *B. suis* (Tabla 15). Con excepción de *B. melitensis* (ver más abajo), las restantes cepas analizadas albergan un ortólogo de BtaE. Es llamativa la variabilidad en la secuencia de las distintas proteínas. Por ejemplo, el ortólogo de *B. abortus* 2308 tiene 1333 aminoácidos, casi 600 aminoácidos más que la proteína de *B. suis* 1330. También se observaron diferencias entre los ortólogos de distintas cepas de *B. suis* ya que, si bien algunas presentan una identidad mayor al 97% comparada con la secuencia de la proteína de *B. suis* 1330, otras, como ATCC 23445, comparten una identidad del 86.5%. El gen ortólogo de *B. melitensis* parece haberse fragmentado como consecuencia de una mutación que generó un sitio de terminación de la traducción. BMEI1873 de *B. melitensis* correspondería a la porción N terminal del gen de *B. suis* 1330, mientras que BMEI1872 correspondería a la porción C-terminal, incluyendo el barril translocador. Es posible que los productos de estos genes no sean funcionales.

Crasta y colaboradores (303) compararon la secuencia del genoma de la cepa atenuada (y vacunal) S19 de *B. abortus* con las secuencias genómicas de las cepas virulentas 2308 y 9-941 con el fin de identificar nuevos genes de virulencia. En este análisis identificaron 45 genes que fueron idénticos en ambas cepas virulentas pero distintos a los ortólogos de la cepa S19. Uno de estos correspondió al ortólogo de BtaE. Curiosamente, el ortólogo de la cepa S19 presentó mayor identidad con BtaE de *B. suis* 1330 que con el ortólogo de *B. abortus* 2308. Por análisis con ClustalW se observó que BtaE de *B. suis* y el ortólogo de S19 comparten una identidad del 97.8%, sin presencia de *gaps* o aberturas, y contienen el mismo número de dominios según la anotación daTAA. Por otro lado, el fragmento de la proteína de la cepa 2308 comprendido entre los aminoácidos 343 y 907 no está presente en el ortólogo de la cepa 19 (ni tampoco en *B. suis* 1330) y

como consecuencia el número de dominios estructurales según daTAA difiere notablemente (Tabla 15).

| Cepa | Locus | Longitud (aa) | Anotación daTAA | | | | % Identidad/Similitud |
|-------------------------------|-------------------|---------------|-----------------|-------|----------|---------|-----------------------|
| | | | Cabeza | Tallo | Conector | Anclaje | |
| <i>B. suis</i> 1330 | BR_0072 | 740 | 10 | 3 | 6 | 1 | - |
| <i>B. suis</i> VBI22 | BSVBI22_A0072 | 740 | 10 | 3 | 6 | 1 | 100/100 |
| <i>B. suis</i> 686 | EEY33640 | 759 | 10 | 3 | 6 | 1 | 97.4/97.4 |
| <i>B. suis</i> ATCC 23445 | BSUIS_A0075 | 835 | 12 | 3 | 7 | 1 | 86.5/86.5 |
| <i>B. abortus</i> 2308 | BAB1_0069 | 1333 | 20 | 3 | 11 | 1 | 55.1/55.2 |
| <i>B. abortus</i> S19 | BAbS19_I00660 | 768 | 10 | 3 | 6 | 1 | 94.3/94.9 |
| <i>B. melitensis</i> 16M | BMEI1872-BMEI1873 | 365-505 | 5-7 | 2-0 | 4-3 | 1-0 | 47.7/48.2-44.2/44.5 |
| <i>B. canis</i> ATCC 23365 | BCAN_A0073 | 740 | 9 | 3 | 6 | 1 | 99.7/99.7 |
| <i>B. microti</i> | BMI_175 | 994 | 14 | 3 | 8 | 1 | 74.3/74.4 |
| <i>B. pinnipedialis</i> B2/94 | EEX99450 | 795 | 12 | 2 | 7 | 0 | 73.7/73.8 |
| <i>B. neotomae</i> | WP_004687844 | 661 | 10 | 3 | 7 | 1 | 70.8/74.6 |
| <i>B. ovis</i> ATCC 25840 | BOV_0071 | 766 | 10 | 3 | 5 | 1 | 90.4/91.5 |

Tabla 15. Ortólogos de BtaE en distintas cepas y especies del género *Brucella*.

En cada caso se indica: el nombre del locus, el número de aminoácidos de la proteína, la cantidad de dominios estructurales correspondientes a cabeza, tallo, conector y anclaje identificados con daTAA y la identidad y similitud respecto a la proteína de *B. suis* 1330.

I.3. Obtención de la cepa de *B. suis* mutante en *btaE* y su complementada

A partir del ADN genómico de *B. suis* 1330 se amplificó una secuencia río arriba de *btaE* de 460 pb y un fragmento río abajo del gen de 330 pb (Figura 13A). Ambos productos de PCR fueron ligados entre sí. A partir de la ligación se amplificó por PCR el fragmento ligado de aproximadamente 800 pb (Figura 13B), el cual fue clonado en el vector pk18mobsacB, obteniéndose el plásmido p Δ *btaE*. Se confirmó que dicha construcción fuese correcta mediante *colony*-PCR, por digestión con enzimas de restricción y por secuenciación. El plásmido fue introducido a la cepa S17 de *E. coli* por transformación y luego transferido por conjugación biparental desde *E. coli* a *B. suis*. Se seleccionaron dobles recombinantes en medio selectivo en presencia de sacarosa ya que el plásmido contiene el gen *sac* que hace que la presencia de sacarosa sea letal para la bacteria que contiene el plásmido integrado. Las mutantes (sacarosa y ácido nalidixico resistentes y kanamicina sensibles) se confirmaron por *colony*-PCR como se explica en Materiales y Métodos. Con los oligonucleótidos adecuados se amplificó la banda correspondiente a la versión deletada del gen en los clones 14 y 15 (Figura 13C). Por otro lado, al utilizar el par de oligos KoBtaE_F1 y BtaE_Int no se espera amplificar producto a menos que se encuentre la versión silvestre del gen. A partir de *B. suis* silvestre (wt) se amplificó esta banda, mientras que los clones 14 y 15 no la amplificaron (Figura 13D). Se eligió el clon 14 para los siguientes estudios.

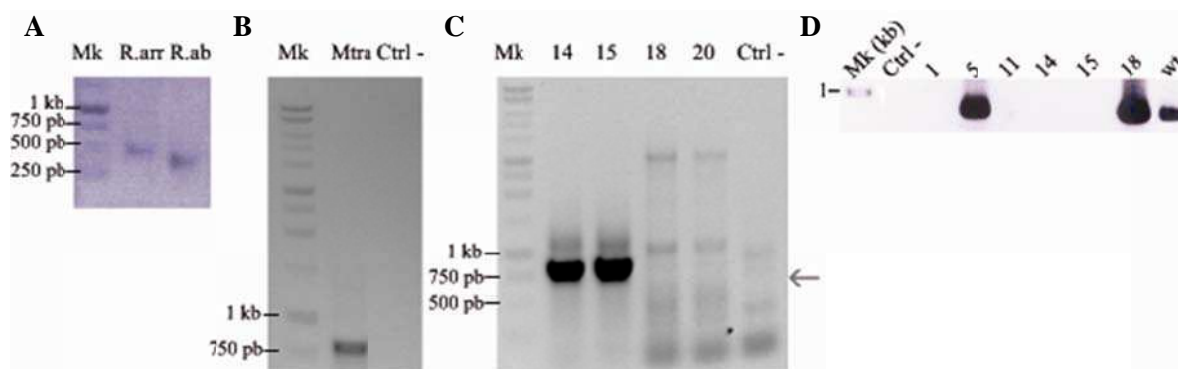


Figura 13. Obtención de *B. suis* $\Delta btaE$

(A) Se amplificó una región río arriba de *btaE* (R. arr) y otra región río abajo (R.ab), las cuales gracias a la adición de sitios de reconocimiento de enzimas de restricción se pudieron ligar entre sí, obteniéndose un producto de aproximadamente 800 pb. Esta construcción fue (B) amplificada mediante PCR, y el producto amplificado fue clonado en el plásmido pK18mobsacB, obteniéndose el plásmido p $\Delta btaE$. Se confirmó el correcto ensamblado del plásmido mediante *colony*-PCR, digestión del plásmido y secuenciación. Luego se transformó *B. suis* con este plásmido y se seleccionaron clones dobles recombinantes. Mediante *colony*-PCR utilizando oligos que amplifican (C) un fragmento de aproximadamente 800 pb en presencia de la versión deletcionada del gen, (D) y otro par de oligos que amplifican una banda de aproximadamente 700 pb en presencia de la versión silvestre del gen, se determinó que los clones 14 y 15 tenían el gen *btaE* deletcionado. En todos los casos Mk corresponde al marcador de peso molecular, y Ctrl corresponde al control.

Con el fin de evaluar que la deletción de BR_0072 no haya afectado la expresión de BR_0073, se extrajo el ARN total de la cepa silvestre y la mutante ($\Delta btaE$) y con el ADNc generado a partir de dicha extracción se analizó la presencia del ARN mensajero de BR_0073 por RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos para BR_0073. Este análisis reveló para la cepa mutante, una banda de una intensidad similar a la que se obtiene en la cepa silvestre, sugiriendo que la deletción de *btaE* no produjo un efecto polar sobre genes río abajo (no se muestra).

Con el fin de complementar la mutante, el gen *btaE* completo (incluida una región río arriba de 565 pb que probablemente contiene su propio promotor) fue clonado en un vector replicativo en *Brucella*. Para ello, a partir del ADN genómico de *B. suis* 1330 se amplificó una región de aproximadamente 2.8 kb (Figura 14A), la cual contiene al gen *btaE* y sus regiones flanqueantes. Este fragmento fue clonado en el vector de amplio rango pBBR1MCS obteniéndose el plásmido pBBR*btaE*. Esta construcción fue confirmada mediante *colony*-PCR y restricción del plásmido. La secuenciación del inserto permitió comprobar que éste no tuviera errores con respecto a la secuencia genómica publicada. El plásmido pBBR*btaE* fue introducido en la cepa S17 de *E. coli* y luego fue transferido por conjugación biparental a *B. suis* $\Delta btaE$. Mediante *colony*-PCR se

confirmó la presencia de las versiones deletcionada y/o silvestre del gen en las distintas cepas (Figura 14B y C, respectivamente).

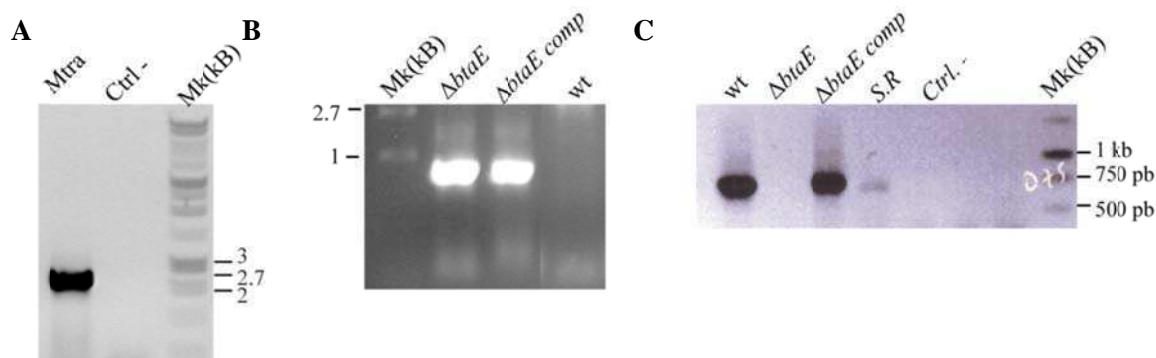


Figura 14. Obtención de *B. suis* $\Delta btaE$ pBBR*btaE*.

(A) A partir del ADN genómico se amplificó un fragmento de aproximadamente 2.8 kb que contiene a *btaE* y sus regiones flanqueantes, el cual se clonó en el vector pBBR1MCS, obteniéndose el plásmido pBBR*btaE*. El plásmido se introdujo en *B. suis* $\Delta btaE$ y se obtuvo la cepa complementada *B. suis* $\Delta btaE$ pBBR*btaE*. Utilizando distintos pares de oligos se confirmó mediante *colony*-PCR que la cepa complementada amplificara tanto (B) una banda de 800 pb correspondiente a la versión deletcionada del gen, (C) como una banda de casi 780 pb correspondiente a la copia del gen silvestre provista por el plásmido.

La expresión de *btaE* en las distintas cepas se analizó mediante RT-PCR a partir de ARN extraído de cultivos en TSB. Se obtuvo una banda del tamaño esperado tanto en la cepa silvestre (wt) como en la complementada ($\Delta btaE$ comp.), mientras que dicha banda estuvo ausente en la mutante (Figura 15). Tanto en el control negativo de la PCR (sin molde) como en los controles en ausencia de la retrotranscriptasa no se obtuvo amplificación (Figura 15). Estas observaciones indican que *btaE* se expresa *in vitro* en las condiciones ensayadas y que la presencia de pBBR*btaE* restaura su expresión en la mutante $\Delta btaE$.

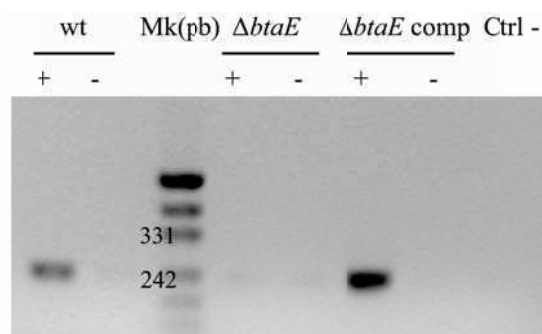


Figura 15. RT-PCR

Se extrajo el ARN de cultivos en TSB de las cepas silvestre (wt), *B. suis* $\Delta btaE$ ($\Delta btaE$) y *B. suis* $\Delta btaE$ pBBR*btaE* ($\Delta btaE$ comp). El ADN se eliminó por tratamiento con ADNasa y luego se sintetizó el ADNc. A modo de control para cada cepa la reacción de síntesis de ADNc se realizó por duplicado, en presencia (+) o ausencia (-) de la retrotranscriptasa seguida de la reacción de PCR.

I.4. Obtención de anticuerpos policlonales anti-BtaE

Con el objetivo de obtener anticuerpos anti-BtaE, se amplificó a partir del ADN genómico de *B. suis* 1330 un fragmento del gen (región subrayada en la Figura 12B), que corresponde a una porción del dominio pasajero que codificaría un péptido de aproximadamente 22 kDa. Por PCR se amplificó un fragmento del tamaño esperado (aproximadamente 650 pb, figura 16A) que fue clonado en el vector pET28 de manera que el péptido quede fusionado traduccionalmente a un *tag* de Histidina (HisTag). Se comprobó que el clonado fuese correcto mediante digestión del plásmido, por PCR (Figura 16B) y por secuenciación. El plásmido resultante (pAcBtaE) fue transferido a *E. coli* BL21 y la expresión se indujo en presencia de distintas concentraciones de IPTG: 50 μ M, 0.4 mM y 1mM. En las tres condiciones de inducción se observó la presencia en los extractos totales de una proteína extra (indicada con una flecha en la figura 16C). La identidad del péptido derivado de BtaE se confirmó por *Western blot* con anticuerpo primario anti-His (Figura 16D). La proteína recombinante se obtuvo parcialmente en la fracción citoplasmática y en los cuerpos de inclusión (Figura 16E).

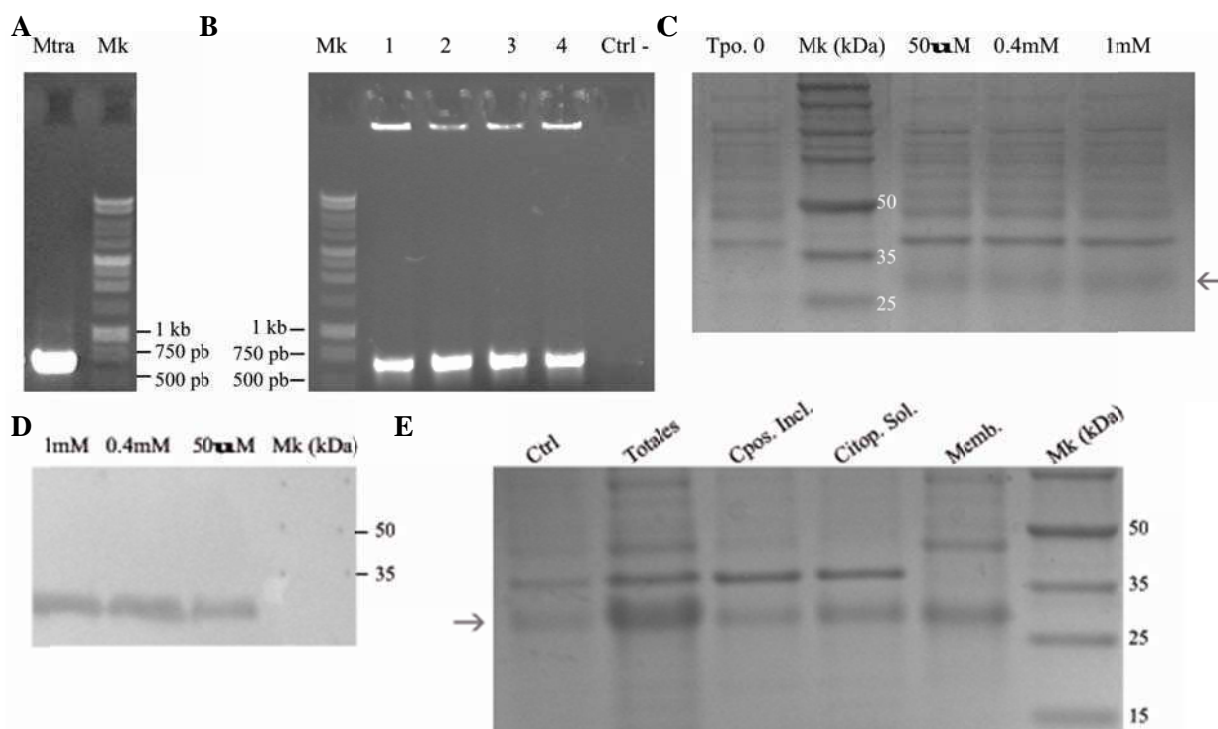


Figura 16. Construcción de pAcBtaE y puesta a punto de la inducción del péptido derivado de BtaE.

(A) Se amplificó a partir de ADN genómico de *B. suis* 1330 una porción del gen *btaE*. Este fragmento fue clonado en el vector pET 28, respetando el marco de lectura original. Se confirmó que la construcción (pAcBtaE) no tuviera errores por (B) *colony*-PCR, y secuenciación. *E. coli* BL21 fue transformada con pAcBtaE y (C) se evaluó la expresión del péptido derivado de BtaE a distintas concentraciones de IPTG. (D) Se confirmó que la banda

inducida correspondiera al péptido de interés de BtaE mediante *Western blot* con anticuerpos anti-HisTag. (E) Se determinó la localización sub-celular del péptido de interés.

El péptido de BtaE se purificó a partir de la fracción citoplasmática soluble. Para ello, ésta fracción fue sometida a Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC, del inglés *High Performance liquid chromatography*) utilizando una columna con níquel (IMAC, por *Immobilized metal affinity chromatography*). Aunque una proporción considerable del péptido se perdió en el *flowthrough* (FT), otra parte del péptido eluyó en la fracción G4 (Figura 17A). Esta fracción fue concentrada y sometida a cromatografía en columna S-75. El péptido se encontró mayoritariamente en la fracción F1, la cual presentó varias bandas de peso molecular similar (Figura 17B). Mediante *Western blot*, utilizando como anticuerpo primario anti-HisTag se confirmó la identidad del péptido, aunque también se observaron bandas proteicas de mayor peso molecular (Figura 17C), probablemente por la presencia de multímeros del péptido resistentes a SDS. Por último, se concentró la fracción F1 obtenida de la columna S-75 y se la sometió a cromatografía en columna S-200. El péptido de BtaE eluyó de la columna S-200 mayoritariamente en la fracción F3 (Figura 17D). Se confirmó la identidad del péptido mediante *Western blot* (Figura 17E). Esta fracción fue utilizada para inocular ratones y obtener los anticuerpos policlonales anti-BtaE.

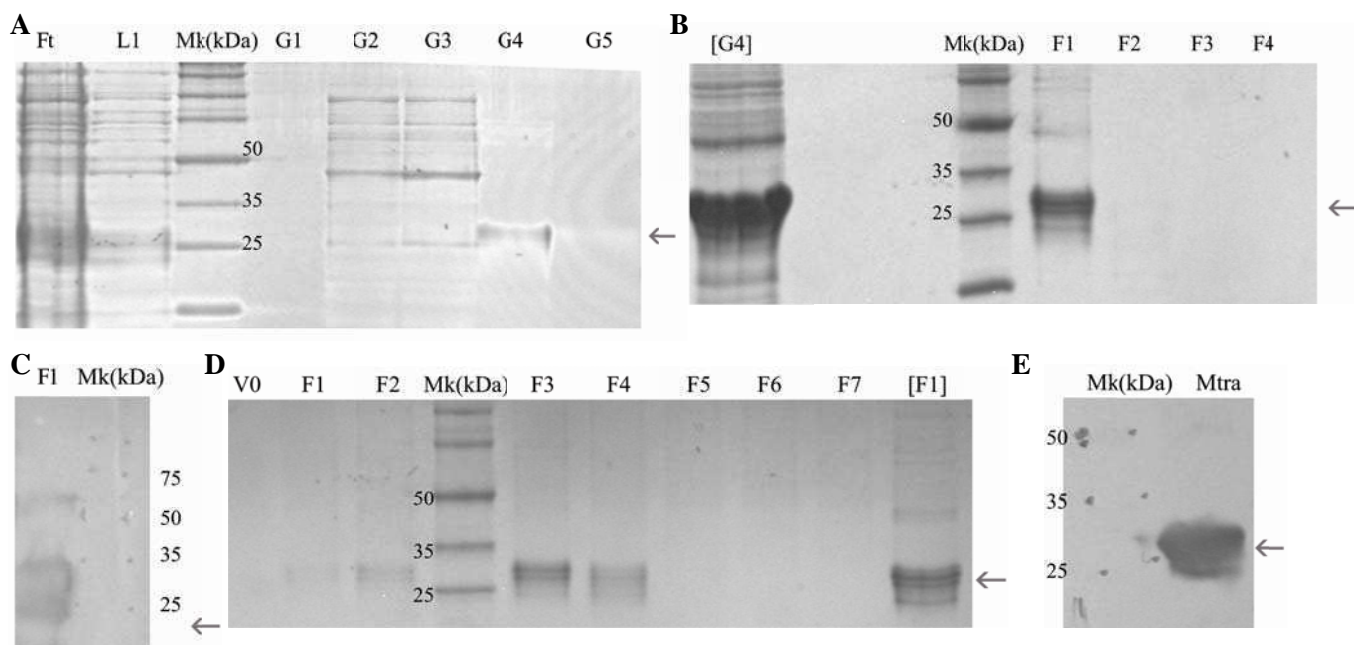


Figura 17. Purificación del péptido derivado de BtaE.

(A) Se utilizó una columna de níquel para purificar el péptido de interés a partir de la fracción citoplasmática soluble, la fracción G4 mostró mayores niveles del péptido. Esta fracción fue concentrada y sometida a cromatografía en columna S-75. (B) El péptido de interés eluyó principalmente en la fracción F1. (C) La identidad del péptido fue confirmada por *Western blot*. La fracción F1 fue concentrada y (D) purificada en una columna S-

200, obteniéndose el péptido en las fracciones F1 a F4. (E) La identidad del péptido en F3 fue confirmada por *Western blot*. Ésta fracción fue utilizada para inocular ratones.

La presencia de BtaE en membranas totales de *B. suis* se analizó por *Western blot*. Los trímeros de los AT II presentan una alta resistencia a las condiciones de desnaturalización comúnmente utilizadas. Por este motivo, las preparaciones fueron sometidas a un fuerte proceso de desnaturalización mediante tratamiento con el detergente Sarkosyl 1% (lauroil sarcosinato de sodio) y ácido fórmico, y posteriormente sometidas a SDS-PAGE y *Western blot*. BtaE fue detectada en la cepa silvestre con los anticuerpos anti-BtaE (1:8.000) como una proteína de aproximadamente 75 kDa que correspondería a la forma monomérica de BtaE, mientras que esta banda proteica estuvo ausente en la cepa mutante (Figura 18). Este resultado estaría en línea con la predicción de que BtaE se encontraría en la membrana externa.

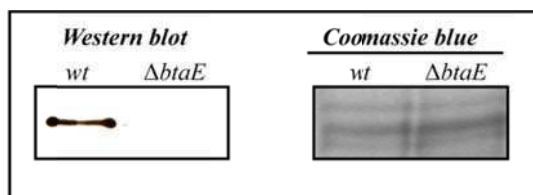


Figura 18. *Western blot* de membranas totales de *Brucella suis* 1330.

Las membranas totales de *B. suis* y *B. suis* $\Delta btaE$ fueron sometidas a un fuerte proceso de desnaturalización y posteriormente a SDS-PAGE y *Western blot* utilizando los anticuerpos anti-BtaE (1:8.000). A modo de control de carga se corrieron en paralelo las mismas muestras en otro gel, el cual fue teñido con *Coomassie blue*.

I.5. Expresión heteróloga en *E. coli*

La cepa no adherente ni invasiva de *E. coli* CC118 fue transformada con el plásmido pBBR*btaE*. La expresión de la proteína BtaE en el hospedador heterólogo se analizó por *Western blot*. Debido a las dificultades encontradas para desnaturalizar al trímero se decidió analizar la forma trimérica de BtaE. Para esto, las proteínas presentes en las membranas totales fueron separadas por electroforesis en un gel semi-nativo discontinuo y analizadas por *Western blot* utilizando los anticuerpos anti-BtaE. Los anticuerpos reconocieron en *E. coli* pBBR*btaE* una banda que correspondería a BtaE, la cual estuvo ausente en la cepa control (Figura 19). Esta observación indica que *E. coli* pBBR*btaE* expresa la proteína BtaE.

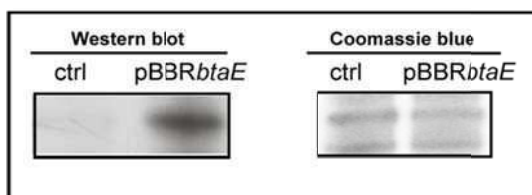


Figura 19. *Western blot* de membranas totales de *E. coli* pBBR*btaE*.

Las proteínas presentes en las membranas totales de *E. coli* pBBR1MCS (ctrl) y *E. coli* pBBR*btaE* (pBBR*btaE*) fueron separadas en un gel semi-nativo y analizadas por *Western blot* utilizando anticuerpos anti-BtaE.

I.6. Análisis de fenotipos asociados a la envoltura celular

Se ha observado que las bacterias del género *Brucella* cultivadas en el laboratorio sufren comúnmente un proceso denominado “disociación”, debido a cambios en la estructura del antígeno O de su LPS, que convertirían a la bacteria en una cepa rugosa (ver sección 2.2.a. de la Introducción). Estos cambios en la superficie de la bacteria podrían modificar las propiedades de adhesión. Con el fin de evaluar esta posibilidad se realizó un control utilizando acriflavina (294). El ensayo consiste en resuspender las bacterias en una dilución de acriflavina 0.1% p/v y observar la formación de una suspensión homogénea de células en el caso de células lisas o bacterias aglutinadas que sedimentan rápidamente en el caso de bacterias rugosas. A modo de control se incluyó *B. ovis* como cepa rugosa. Como se puede observar en la figura 20, la cepa mutante *btaE* presenta el mismo comportamiento que la cepa parental lisa, sugiriendo que la mutante no ha sufrido disociación.

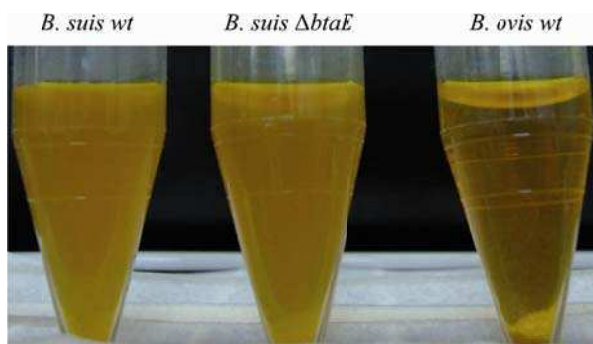


Figura 20. Evaluación de disociación.

Se realizó una suspensión de colonias de *B. suis* wt (control de cepa lisa), *B. ovis* (control de cepa rugosa) y *B. suis* Δ *btaE*, en acriflavina 0.1 % p/v. Tanto *B. suis* wt como *B. suis* Δ *btaE* se emulsionan fácilmente, mientras que *B. ovis* forma un precipitado.

En segundo lugar se analizó la posibilidad que la delección de *btaE* resulte en un fenotipo pleiotrópico sobre la estabilidad de la membrana externa. Para analizar el estado de la membrana, se evaluó la tolerancia a distintos compuestos. Se comparó la tolerancia de *B. suis* Δ *btaE* y la cepa silvestre a: deoxicolato de sodio (DOC) 0.1%, EDTA 200 μ g/ml, Tritón X-100 0.1% y a SDS 0.01%. No se observaron diferencias significativas entre ambas cepas en cuanto a la tolerancia a ninguno de estos compuestos (Figura 21).

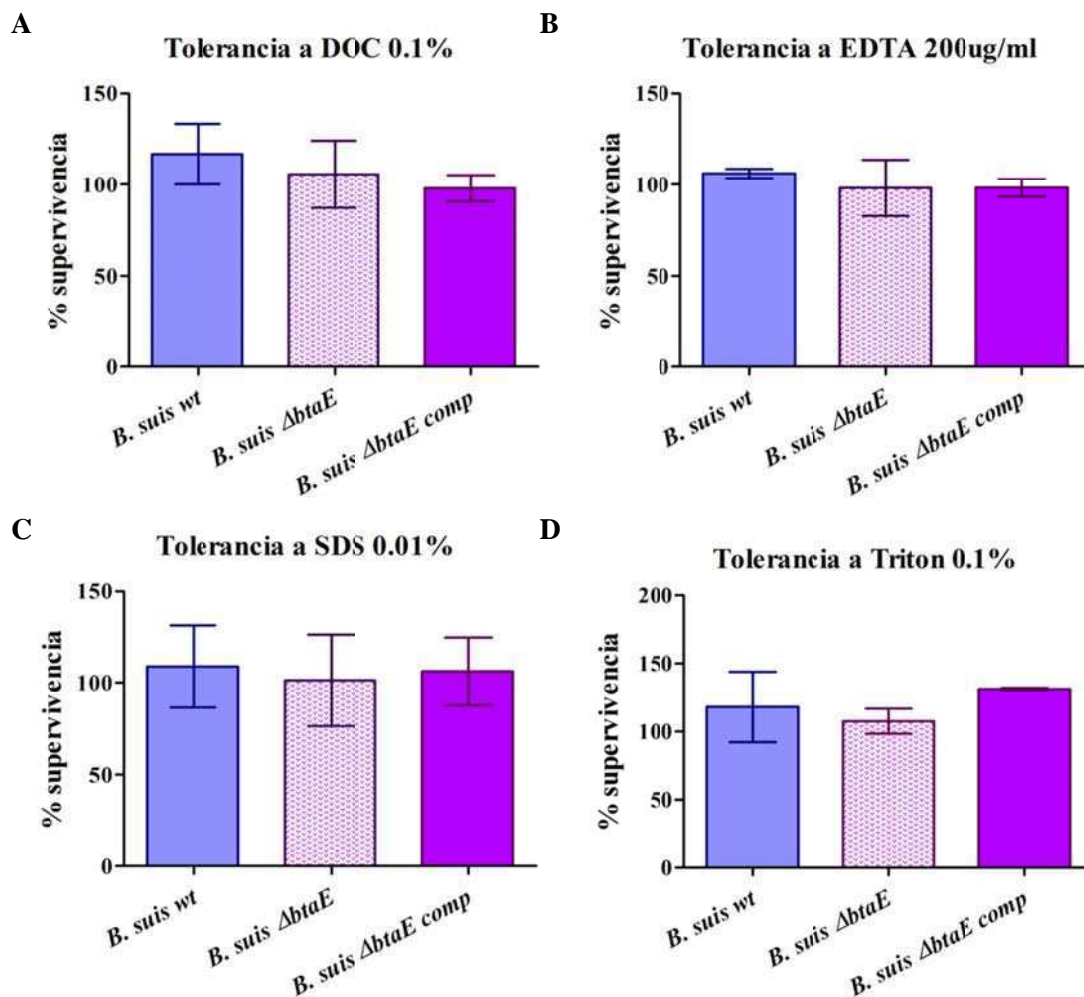


Figura 21. Tolerancia de *B. suis* $\Delta btaE$ a DOC, EDTA, SDS y Tritón X-100.

A modo de control del estado de la envoltura de la mutante en *btaE* se comparó la tolerancia de la mutante con las cepas *B. suis* wt y complementada a: (A) DOC 0.1%, (B) EDTA 200 μ g/ml, (C) SDS 0.01% y (D) Tritón X-100 0.1%. En todos los casos se graficó el porcentaje de unidades formadoras de colonias (u.f.c) obtenidas luego de la incubación con cada uno de los compuestos. El porcentaje de bacterias que sobrevivieron se normalizó con la cepa silvestre a la cual se le asignó el valor 100%. Los resultados que se muestran corresponden a un experimento representativo de tres realizados por triplicado. Los datos fueron analizados mediante el análisis ANOVA ($p > 0.05$).

Las especies del género *Brucella* son particularmente resistentes al lipopéptido catiónico polimixina B y a otros péptidos catiónicos fisiológicamente activos en mamíferos (ver sección 2.2.a. de la Introducción). En otras bacterias Gram negativas, el anillo peptídico de la polimixina B interactúa con el LPS de la membrana externa, desplazando el calcio y magnesio que estabilizan al LPS, lo cual a su vez perturba la membrana externa (304). Además, la porción correspondiente al ácido graso de la polimixina B contribuye a la inserción del compuesto en la membrana,

produciendo una disrupción fisicoquímica que da lugar a cambios en la permeabilidad de la misma (304, 305). Continuando con el análisis de un posible efecto pleiotrópico de la delección de *btaE* se analizó la tolerancia de la mutante a distintas concentraciones de polimixina B (entre 0 y 100 unidades/ml). Se incluyeron *B. abortus* y *E. coli* como controles adicionales (155). No se observaron diferencias entre la cepa silvestre y la mutante en *btaE* en cuanto a la tolerancia a las distintas concentraciones de polimixina B ensayadas (Figura 22).

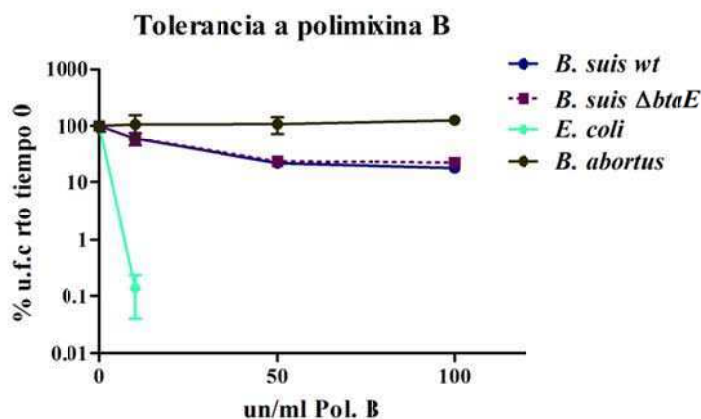


Figura 22. Tolerancia a polimixina B.

Se incubaron *B. suis wt*, *B. suis ΔbtaE*, *E. coli* (como control de cepa sensible) y *B. abortus* (como control adicional de cepa resistente) en distintas concentraciones de polimixina B. Para cada cepa y concentración utilizadas, se determinó el porcentaje de u.f.c, adjudicando el valor de 100% a la incubación sin polimixina B. Los resultados que se muestran corresponden a un experimento representativo de tres realizados por triplicado.

Los resultados obtenidos sugieren que la delección de *btaE* no produce un efecto pleiotrópico (directo o indirecto) sobre la estabilidad y/o estructura de la membrana externa.

I.7. Autoagregación y formación de *biofilm*

Hemos observado que *B. suis* autoagrega y sedimenta notablemente en medios líquidos. Por microscopía de fluorescencia se pudo observar que las bacterias forman agregados de diferentes tamaños (Posadas et al, comunicación personal). Se analizó si BtaE estaría involucrada en la capacidad de la bacteria de autoagregar. Para ello, se evaluó por una lado, si *E. coli* pBBR*btaE* presenta la misma cinética de autoagregación que la cepa control y por el otro, el efecto de la delección de *btaE* en la autoagregación de *B. suis*. Sin embargo, no se observaron diferencias en la autoagregación de *E. coli* que expresa BtaE y *E. coli* que contiene el vector vacío (Figura 23A). Tampoco se observaron diferencias en cuanto a la cinética de autoagregación entre la cepa silvestre y *B. suis ΔbtaE* (Figura 23B).

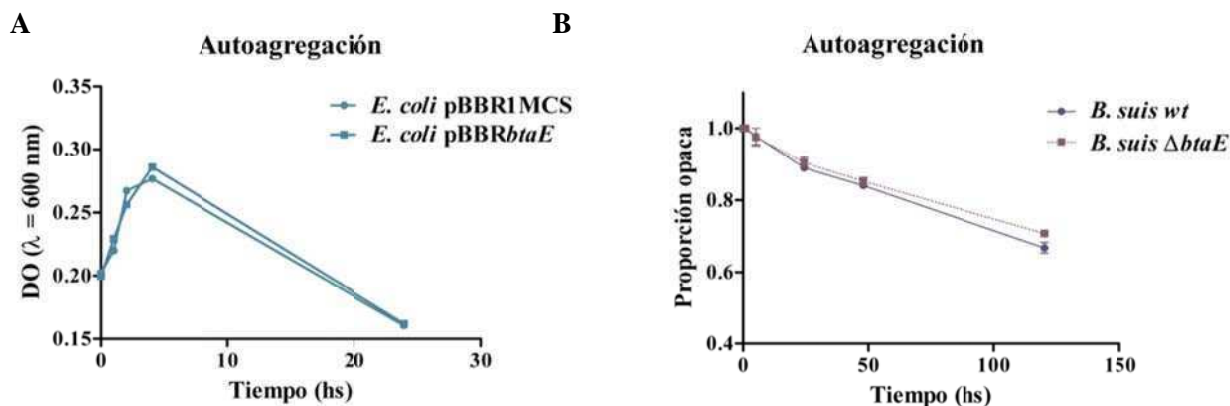
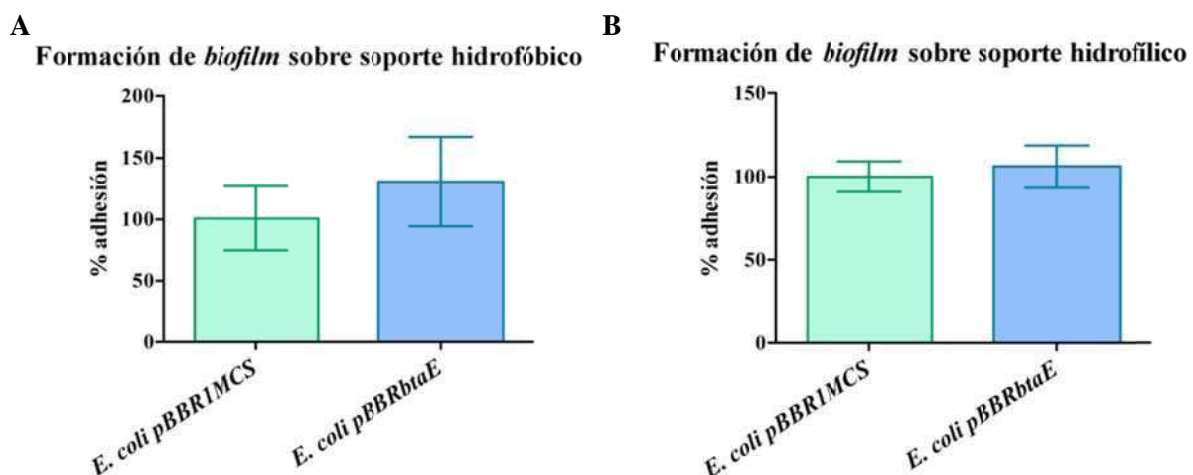


Figura 23 Rol de BtaE en la autoagregación bacteriana.

Se analizó la cinética de autoagregación de (A) *E. coli* pBBRbtaE y (B) *B. suis* $\Delta btaE$, comparándolas con sus cepas control. Los resultados que se muestran corresponden a un experimento representativo de tres realizados por triplicado.

Estas observaciones sugieren que BtaE no estaría involucrada en la autoagregación bacteriana y por lo tanto sugiere que BtaE no mediaría las interacciones célula-célula.

Por otra parte, la formación de *biofilm* sobre una superficie abiótica es un proceso complejo que implica en primer lugar la adhesión a la superficie, y luego el reclutamiento de otras bacterias mediante interacciones entre bacterias. Para estudiar si BtaE intervendría en este proceso se midió la formación de *biofilm* sobre placas de poliestireno y/o vidrio mediante tinción de la biomasa con cristal violeta. No se observaron diferencias entre *E. coli* pBBRbtaE y la cepa control tanto en la adhesión a poliestireno (soporte hidrofóbico) (Figura 24A) como en la adhesión a vidrio (soporte hidrofílico) (Figura 24B). Tampoco se observaron diferencias en cuanto a la formación de *biofilm* sobre soporte hidrofóbico entre *B. suis* $\Delta btaE$ y la cepa silvestre (Figura 24C).



C
Formación de *biofilm* sobre soporte hidrofóbico

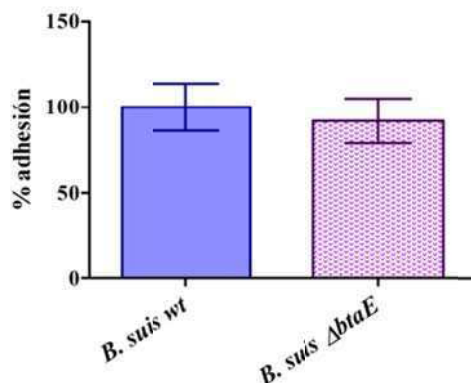


Figura 24. Formación de *biofilm* sobre soportes abióticos.

Se analizó la capacidad de formar *biofilm* de *E. coli* pBBR1MCS y *E. coli* pBBR*btaE* sobre (A) poliestireno y (B) vidrio. (C) Se evaluó la capacidad de formación de *biofilm* sobre poliestireno de *B. suis* y *B. suis* $\Delta btaE$. Los valores corresponden al porcentaje de biomasa adherida, referidos a la cepa control a la cual se le asignó el valor de 100%. Los resultados que se muestran corresponden a un experimento representativo de tres realizados por octuplicado. Los datos fueron analizados por Test de Student.

*, significativamente distinto al control ($p < 0.05$), con 95% de confianza.

Estas observaciones sugieren que BtaE no participa en la interacción entre bacterias y tampoco influiría en la interacción de la bacteria con soportes abióticos.

I.8. Adhesión a componentes de la matriz extracelular

Como ya se describió en la sección 3.2.b. de la Introducción, diversas evidencias sugieren que la adhesión de *Brucella* a la ECM y a células del hospedador podría ser importante para el proceso infeccioso (253-255, 257, 262). Incluso se ha propuesto que la adhesión estaría mediada por proteínas de la superficie de la célula del hospedador ricas en residuos de ácido siálico y/o residuos sulfatados, así como también por componentes de la ECM como por ejemplo fibronectina, colágeno y vitronectina (253). Se estudió entonces si BtaE está involucrada en la adhesión a compuestos de la ECM o a fetuína (incluida por ser rica en ácido siálico).

No se observaron diferencias entre *E. coli* pBBR*btaE* y *E. coli* pBBR1MCS en cuanto a la adhesión a colágeno ni a fetuína; en cambio, la cepa que expresa BtaE mostró una mayor capacidad de adhesión tanto a ácido hialurónico (AH) como a fibronectina (Figura 25A). Por otro lado, no se observaron diferencias entre la cepa silvestre de *B. suis* y la mutante en *btaE* en la adhesión a colágeno, fetuína y fibronectina. En cambio, la mutante presentó una menor adhesión a AH, que se restauró en la cepa complementada (Figura 25B).

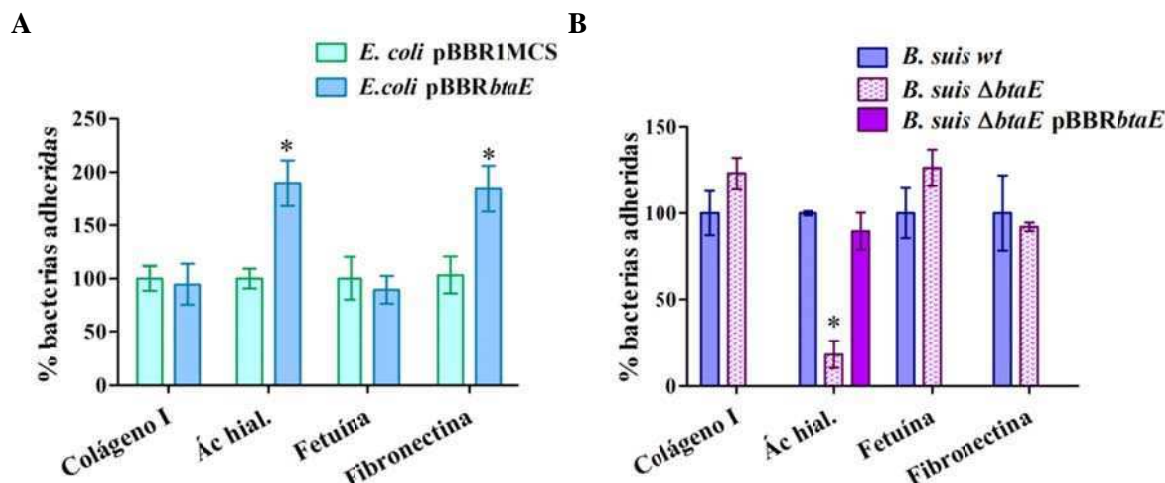


Figura 25. Adhesión a componentes de la ECM

Se analizó la adhesión de (A) *E. coli* pBBR*btaE* y *E. coli* pBBR1MCS, así como la de (B) *B. suis* Δ *btaE* y *B. suis* wt a distintos compuestos de la ECM y a fetuina. Los valores corresponden al porcentaje de bacterias adheridas a los pocillos luego de la incubación, referidos a la cepa control a la cual se le asignó el valor de 100%. Los resultados que se muestran corresponden a un experimento representativo de tres realizados por triplicado. Los datos fueron analizados por Test de Student o ANOVA, según corresponda.

*, significativamente distinto al control ($p < 0.05$), con 95% de confianza.

Los resultados obtenidos indican que BtaE estaría involucrada en la adhesión a AH y sugieren que también podría participar en la adhesión a fibronectina. La ausencia de un fenotipo defectivo de Δ *btaE* podría deberse a una redundancia de funciones entre BtaE y otras adhesinas como BmaC (262).

I.9. Función de BtaE en la adhesión e invasión a células del hospedador

Para poder evaluar la contribución de BtaE en la interacción de *B. suis* con las células del hospedador se estudió la adhesión e invasión a células HeLa. La línea HeLa es un modelo validado diferente a fagocitos profesionales que ha sido utilizado extensamente para analizar en *Brucella* spp. la capacidad de invasión y replicación intracelular. Para determinar si diferencias en la invasión se deberían a un defecto en la invasión o serían una consecuencia de una adhesión disminuida, se calculó también la relación entre bacterias invasoras y adheridas.

No se observaron diferencias significativas en la capacidad de adhesión e invasión a HeLa de *E. coli* pBBR*btaE* y la cepa control (Figura 26A y B). En cambio, la mutante en *btaE* mostró una disminución significativa tanto en el porcentaje de bacterias adheridas (del $63 \pm 7\%$ respecto a la cepa silvestre) (Figura 26C) como en el porcentaje de bacterias invasoras (del $70 \pm 14\%$ respecto a la cepa silvestre) (Figura 26D). Tanto los porcentajes de bacterias adheridas como invasoras se restauraron con pBBR*btaE*, confirmando que la ausencia de BtaE es la responsable de

los fenotipos observados. Se hace notar que el porcentaje de bacterias invasoras respecto a las bacterias adheridas fue similar en las distintas cepas (Figura 26E), es decir que la eficiencia en la invasión fue similar en las distintas cepas, sugiriendo que BtaE está involucrada en la adhesión inicial de *B. suis* a HeLa y no así en la invasión.

La ausencia de un fenotipo diferencial *in vivo* en *E. coli* que expresa BtaE y *E. coli* control puede deberse a una insuficiente expresión y/o translocación de BtaE en el hospedador heterólogo. Alternativamente, la función de BtaE como adhesina sería dependiente del entorno celular de *Brucella*.

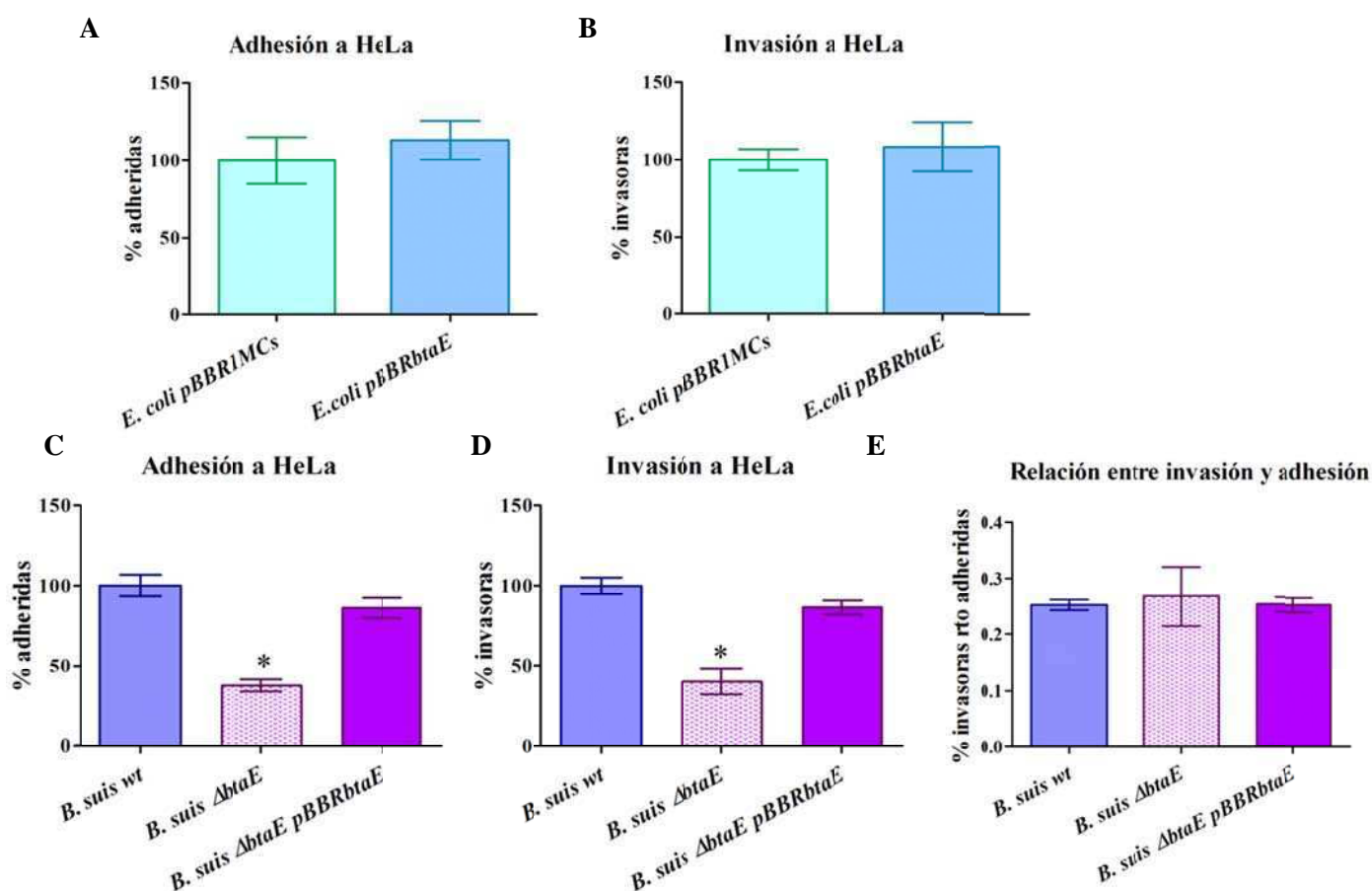


Figura 26. Adhesión e invasión a células HeLa.

Las células HeLa se infectaron con las distintas cepas de *E. coli* (A y B) o *B. suis* (C-E), utilizando una multiplicidad de infección de 100:1. Se determinó el porcentaje de bacterias (A, C) adheridas e (B, D) invasoras y luego (E) se determinó el porcentaje de bacterias invasoras respecto a las adheridas, es decir la relación entre invasoras y adheridas. El porcentaje de bacterias adheridas e invasoras se expresó relativo a la cepa control (*E. coli* pBBR1MCS ó *B. suis* según corresponda), a la cual se le asignó el valor de 100%. Los resultados que se muestran corresponden a un experimento representativo de tres realizados por triplicado. Los datos fueron analizados por test de Student o ANOVA, según corresponda.

*, significativamente distinto del control ($p < 0.05$), con un intervalo de confianza del 95%.

Con el fin de confirmar el defecto de la cepa $\Delta btaE$ en la infección de células HeLa se realizó un ensayo de competencia con la cepa parental. Para ello, se infectaron células HeLa, co-inoculando cantidades equivalentes de *B. suis* wt y *B. suis* $\Delta btaE$. Se utilizó una multiplicidad de infección de 50:1 para cada cepa, resultando en una multiplicidad de infección total de 100:1, al igual que en los ensayos anteriores. La mutante en *btaE* fue fuertemente desplazada por la cepa silvestre, tanto en la adhesión como en la invasión (Figura 27A y B), reforzando la hipótesis de que BtaE participa en la adhesión de *Brucella* a estas células.

Otro enfoque utilizado para evaluar el rol de BtaE en la adhesión a células fue analizar si el AH es capaz de competir en la adhesión de *B. suis* a células HeLa. Al pre-incubar la cepa silvestre con 25 $\mu\text{g/ml}$ de AH, se observó una disminución en la adhesión a las células de un 60% (Figura 27C). Este porcentaje es similar al de adhesión de la mutante en BtaE (Figura 26C). Por otro lado, la adhesión a HeLa de la cepa mutante en *btaE* no fue mayormente afectada por la pre-incubación con AH. Estos resultados sugieren que la adhesión de BtaE al AH compite con la adhesión a HeLa mediada por BtaE y refuerzan el rol de BtaE en la adhesión a células del hospedador.

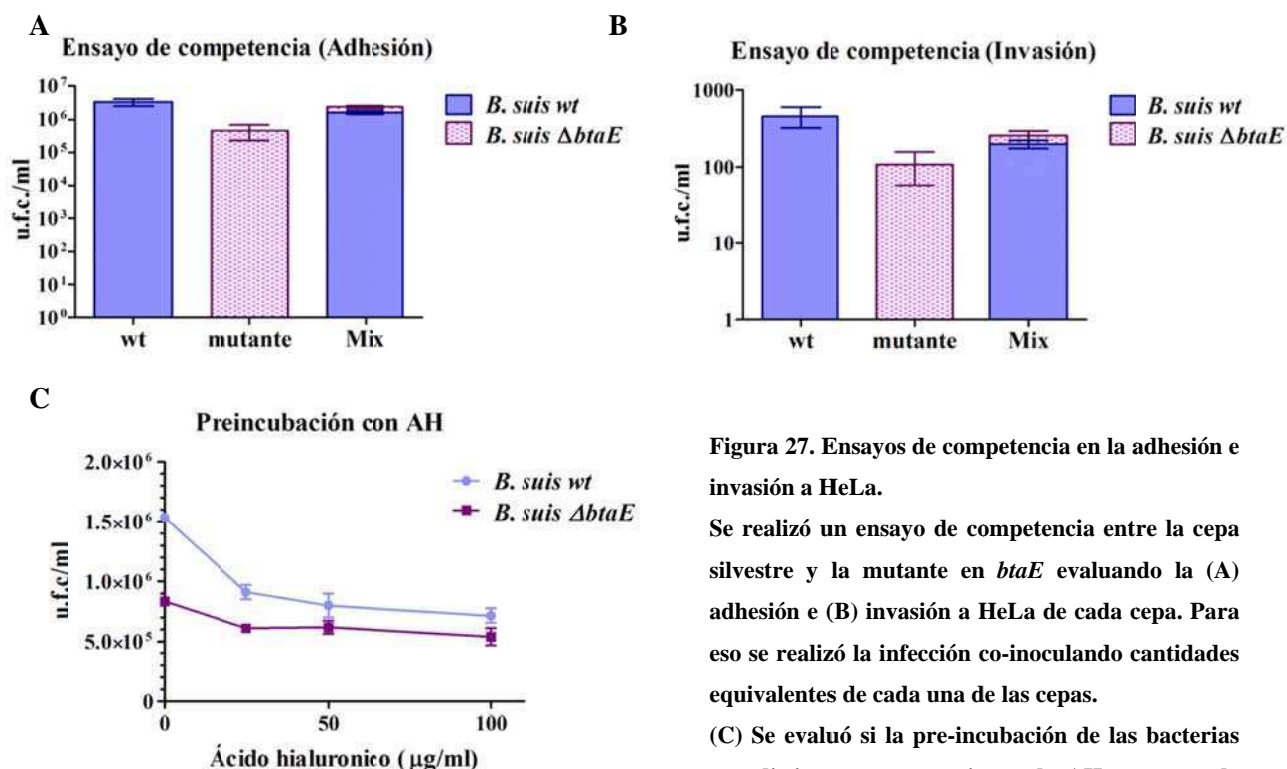


Figura 27. Ensayos de competencia en la adhesión e invasión a HeLa.

Se realizó un ensayo de competencia entre la cepa silvestre y la mutante en *btaE* evaluando la (A) adhesión e (B) invasión a HeLa de cada cepa. Para eso se realizó la infección co-inoculando cantidades equivalentes de cada una de las cepas.

(C) Se evaluó si la pre-incubación de las bacterias con distintas concentraciones de AH es capaz de competir en la adhesión a HeLa. Los resultados que se muestran corresponden a un experimento representativo de tres realizados por duplicado. Los datos están expresados como u.f.c./ml. Los valores representan el promedio \pm desvío estándar de un experimento representativo.

Para validar el análisis del fenotipo adhesivo de la mutante *in vivo* se utilizó otra línea celular, la línea A549 de origen epitelial de pulmón humano. Éstas células son eficientemente infectadas por *Brucella* spp. (306). La mutante *btaE* mostró una reducción significativa en la adhesión ($50 \pm 8\%$) e invasión ($51 \pm 13\%$) a células A549, comparada con la cepa silvestre, a la cual se le asignó el valor de 100% (ver Figura 28A y B). La cepa complementada con el plásmido pBBR*btaE* presentó un fenotipo restaurado. Por otro lado la relación entre la invasión y la adhesión de la mutante y la cepa silvestre fue similar, sugiriendo que la disminución en la invasión de *B. suis* $\Delta btaE$ a células A549 es una consecuencia de la menor adhesión. Las diferencias entre las cepas silvestre y complementada no fueron estadísticamente significativas ($p > 0.05$) (Figura 28C).

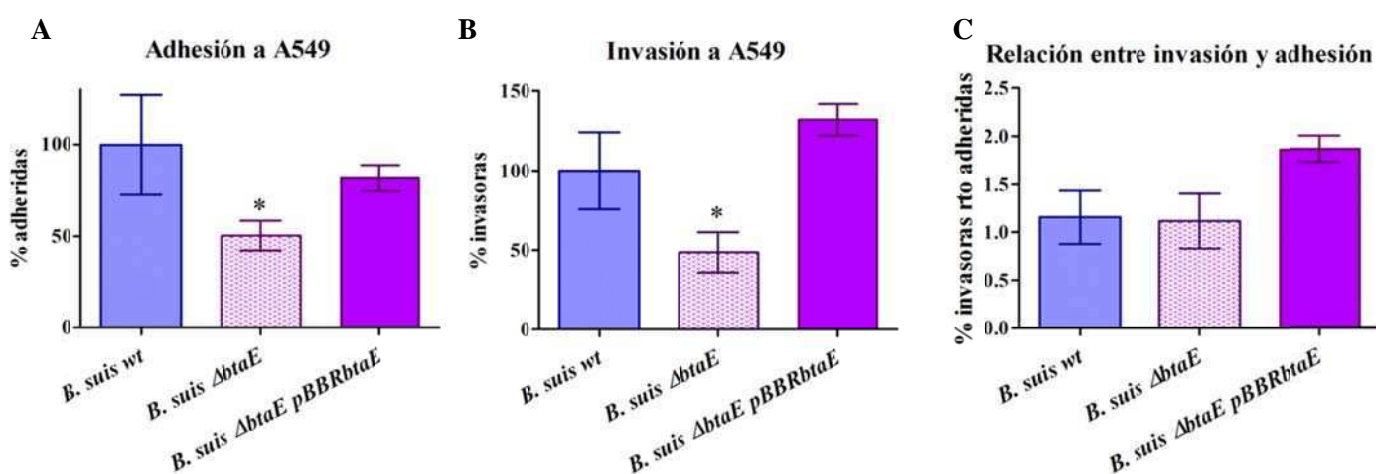


Figura 28. Adhesión e invasión a células epiteliales de pulmón, línea A549.

Se infectaron células A549 con *B. suis* wt, *B. suis* $\Delta btaE$ y *B. suis* $\Delta btaE$ pBBR*btaE* y se calculó el porcentaje de bacterias (A) adheridas, (B) invasoras (C) y se determinó la relación entre invasoras y adheridas. El porcentaje de bacterias adheridas e invasoras se expresó relativo a la cepa parental, a la cual se le asignó el 100%. Los resultados que se muestran corresponden a un experimento representativo de tres realizados por triplicado. Los datos fueron analizados por ANOVA.

*, significativamente distinto del control ($p < 0.05$), con un intervalo de confianza del 95%.

En conjunto, estos resultados indican que BtaE está involucrada en la adhesión a las células del hospedador de origen epitelial. Dado que la infección de macrófagos es crucial en el ciclo de vida de *Brucella* dentro del hospedador, se decidió explorar la posibilidad que BtaE contribuya con la adhesión y/o invasión a fagocitos profesionales utilizando como modelo la línea J774 de macrófagos murinos. No se observaron diferencias en cuanto a la adhesión o invasión entre la cepa silvestre y la mutante en *btaE* (no se muestra), indicando que, al menos *in vitro*, BtaE no contribuye con la interacción inicial de *B. suis* con los macrófagos.

I.10. Replicación intracelular

Para evaluar la posibilidad de que BtaE esté involucrada en etapas posteriores a la adhesión e invasión, se evaluó la replicación intracelular utilizando macrófagos murinos y células HeLa. En ambos modelos *B. suis* wt y *B. suis* $\Delta btaE$ presentaron la misma cinética de replicación intracelular, lo cual sugiere que BtaE no sería necesaria para etapas tardías de la infección a estos modelos celulares (Figura 29).

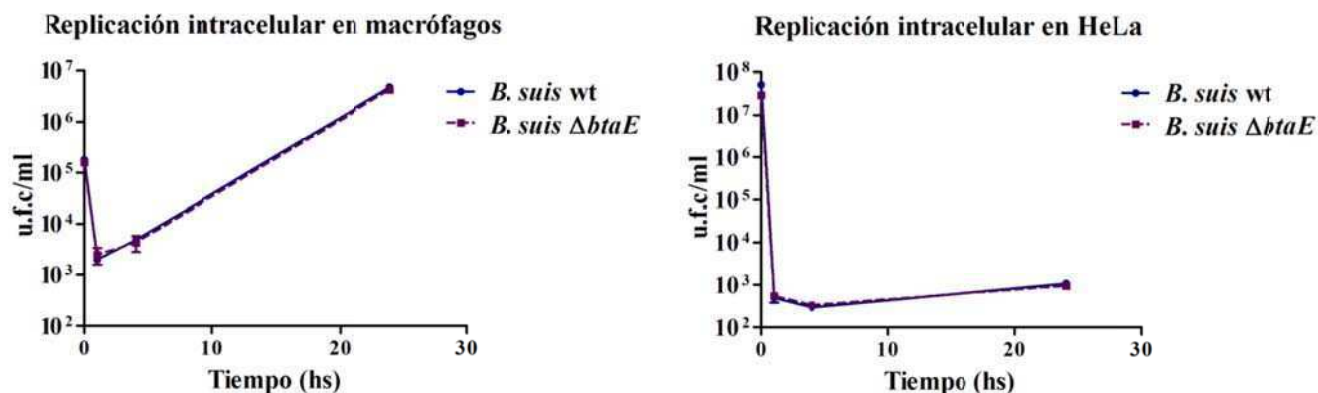


Figura 29. Replicación intracelular.

Se midió la cinética de la replicación intracelular de *B. suis* wt y *B. suis* $\Delta btaE$, utilizando los modelos de (A) macrófagos murinos y (B) células HeLa. Los resultados que se muestran corresponden a un experimento representativo de tres realizados por duplicado.

I.11. Localización de BtaE

Es esperable que una adhesina se exprese sobre la superficie bacteriana de modo de poder interactuar con el receptor o ligando ubicado sobre la superficie de la célula eucariota o la ECM. Además, los miembros de los AT II caracterizados hasta el momento son proteínas integrales de la membrana externa que no sufren un clivaje del dominio pasajero, a diferencia de lo que ocurre con los AT I. De todas maneras, es necesario demostrar que estas características también se cumplen para BtaE. Por un lado, como se muestra en la figura 18, los anticuerpos anti-BtaE detectaron una proteína en la fracción de membranas de la cepa silvestre que estuvo ausente en la mutante, indicando que BtaE se localiza en dicha fracción. Recientemente, evidencias de nuestro laboratorio mostraron que el autotransportador monomérico BmaC se localizaría mayoritariamente de manera unipolar (262). Para evaluar si BtaE se encuentra sobre la superficie y si también se localiza en una región particular de la célula, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia. Para ello, las cepas de *B. suis* y *B. suis* $\Delta btaE$ marcadas con GFP fueron cultivadas en medio rico hasta fase exponencial. Las bacterias fueron fijadas sin permeabilizar y analizadas por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-BtaE y microscopía confocal. En las condiciones del ensayo se detectó BtaE en

aproximadamente 1-3% de las bacterias examinadas de la cepa *B. suis* wt. En todos los casos la señal roja correspondiente a BtaE mostró localización unipolar (Figura 30A). Tal como se esperaba no se observó señal roja en las células de *B. suis* $\Delta btaE$, mientras que la señal se restauró en la cepa complementada con el plásmido pBBR*btaE* (no se muestra). Hasta nuestro conocimiento, ésta sería la primer descripción de un AT trimérico con localización unipolar.

Se decidió evaluar de la misma manera la localización de la adhesina BtaE cuando se la expresa en forma heteróloga en *E. coli*. *E. coli* pBBR*btaE* mostró una señal correspondiente a la proteína (en rojo) en el 5% de las bacterias. En todos los casos la señal presentó localización unipolar (Figura 30B). En cambio, la señal estuvo ausente en la cepa control *E. coli* pBBR1MCS (no se muestra).

Estas observaciones indican que BtaE se localiza sobre la superficie de la bacteria que la porta, y que al menos mayoritariamente, lo hace de modo unipolar. Además, los resultados sugieren que el mecanismo involucrado en la localización polar del AT trimérico BtaE estaría conservado entre *B. suis* y *E. coli*.

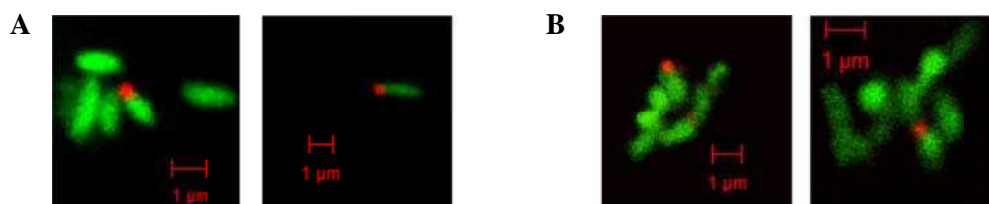


Figura 30. Localización superficial de BtaE en *Brucella* y *E. coli*.

Se cultivaron (A) *B. suis* wt y (B) *E. coli* pBBR*btaE* marcadas con GFP. Las células (sin permeabilizar) fueron analizadas por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-BtaE (rojo). Las muestras fueron observadas utilizando una lente plana-apocromática (100X/1.4 Oil DIC objective) en un microscopio confocal Pascal de Zeiss.

Se analizó también la expresión de BtaE cuando las bacterias están en contacto con la célula. Para ello, se colocó un cubreobjetos circular en el fondo de los pocillos de las placas, y sobre éstos, se cultivaron las células HeLa. Las células fueron infectadas siguiendo el mismo protocolo que el utilizado en los ensayos de adhesión e invasión pero utilizando bacterias marcadas con GFP. Una hora post-infección (p.i.) las células fueron analizadas por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-BtaE y microscopía confocal. Las bacterias en contacto con las células en las cuales se pudo detectar BtaE, presentaron la proteína en el polo que estaba en contacto con la célula (Figura 31). Además, como se describió previamente (262), las bacterias usualmente tomaron contacto con la superficie de la célula hospedadora a través de un polo.

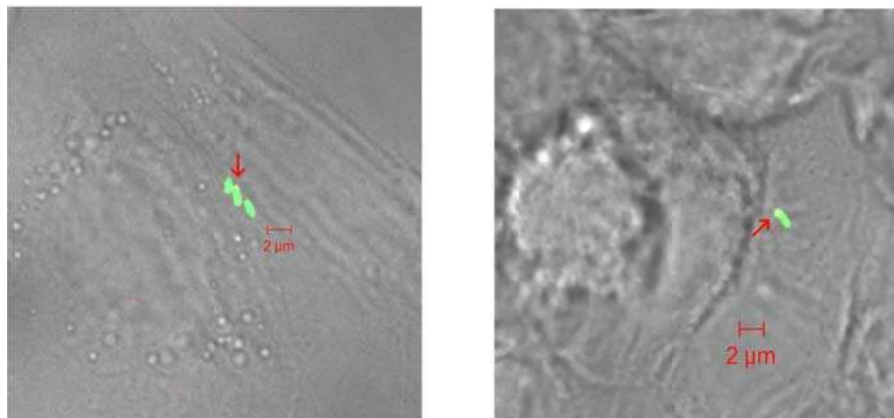


Figura 31. Inmunofluorescencia de bacterias adheridas a HeLa.

Después de una hora de iniciada la infección con *B. suis* wt marcada con GFP, las células fueron fijadas sin permeabilizar y analizadas por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-BtaE. Las células HeLa se observaron por transmisión, mientras que las bacterias (en verde) y BtaE (en rojo, señalada por una flecha roja) se observaron mediante microscopía confocal, utilizando una lente plana-apocromática (100X/1.4 Oil DIC objective) en un microscopio Pascal de Zeiss.

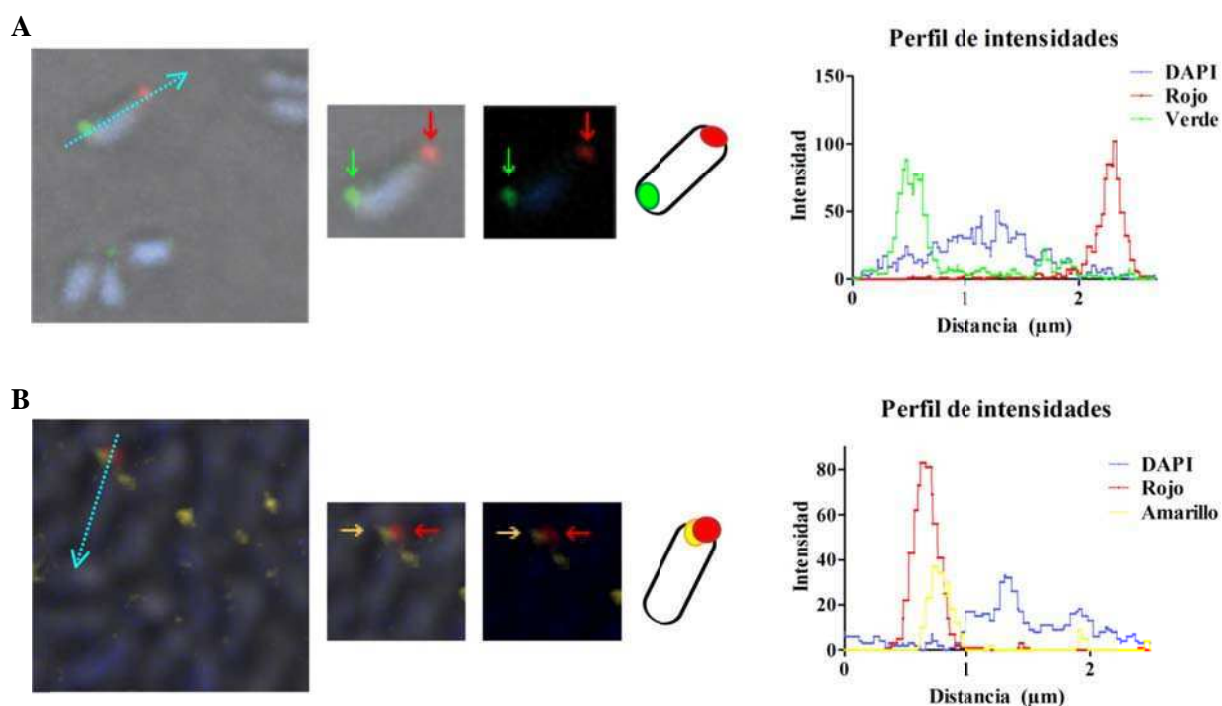
Teniendo en cuenta que: i) las adhesinas de *B. suis* 1330 BmaC y BtaE presentaron localización unipolar, ii) aparentemente *Brucella* se pondría en contacto con la superficie de la célula del hospedador a través de uno de sus polos sobre el cual se detectaron tanto BmaC (262) como BtaE y iii) la división celular de *Brucella* es asimétrica y da lugar a dos células hijas diferentes, con polos distintos (39), surgió la hipótesis que las adhesinas podrían estar localizadas en un determinado polo (nuevo o viejo). Para estudiar esta posibilidad, se analizó la localización de BmaC y BtaE por inmunofluorescencia de bacterias que portaban fusiones traduccionales a proteínas fluorescentes de marcadores de polo viejo o nuevo.

Como se describió en la sección 1.1. de la Introducción, PdhS es una histidin quinasa que se recluta específicamente en el polo viejo de *B. abortus* (41). AidB es una proteína hipotéticamente involucrada en la reparación de ADN, la cual es reclutada en el polo nuevo de *Brucella* o en el sitio de constricción (sección 1.1.de la Introducción) (42). Dado que ambos marcadores de polo fueron identificados en *B. abortus*, en primer lugar se evaluó la localización del ortólogo de BmaC en *B. abortus* (el cual tiene un 99.6% de identidad de secuencia aminoacídica con el homólogo en *B. suis*). Mediante inmunofluorescencia con anticuerpos anti-BmaC se confirmó que, en *B. abortus*, el ortólogo de BmaC también presenta localización unipolar (no se muestra). Luego se analizó la presencia de BmaC en bacterias que expresaban la fusión PdhS-eGFP o AidB-YFP y se evaluó la localización relativa de BmaC. Se utilizó tinción con DAPI y contraste de fase para distinguir la forma de la bacteria. El análisis mediante microscopía confocal mostró que cada vez que BmaC fue detectada (en rojo) sobre la superficie de *B. abortus* que expresaba la

fusión de PdhS-eGFP (en verde), la adhesina se ubicó en el polo opuesto al del marcador (29 casos) (Figura 32A). En ningún caso se observó que BmaC y PdhS-eGFP co-localizaran. En cambio cada vez que se detectó BmaC en una cepa que portaba la fusión AidB-YFP (en amarillo), la adhesina estuvo presente o bien en el mismo polo que el marcador (31 casos) o en bacterias con el marcador difuso, pero nunca se encontró en el polo opuesto (ver Figura 32B). Como se esperaba, la mutante de *B. abortus bmaC* no mostró señal roja (no se muestra). Estas observaciones indican que en *B. abortus*, BmaC se localiza en el polo nuevo de la bacteria.

Con cepas de *B. suis* que expresan fusiones de los marcadores de polo se realizó el mismo análisis que para *B. abortus* y se llegó a la misma conclusión, es decir, en la condición analizada, BmaC solamente fue detectada en el polo nuevo de la bacteria (no se muestra).

Siguiendo el mismo protocolo, se estudió la localización relativa de BtaE en *B. suis*. Cada vez que la adhesina BtaE fue detectada (en rojo) en una bacteria que expresaba el marcador de polo viejo (PdhS-eGFP, en verde), la proteína se ubicó en el polo opuesto al del marcador (30 casos) (Figura 32C) y en ningún caso estuvo ubicada en el mismo polo. En cambio, en todos los casos en los que se detectó a BtaE en una bacteria que portaba el marcador de polo nuevo (AidB-YFP, en amarillo), la adhesina se encontró en el mismo polo que el marcador (17 casos) (Figura 32D) o en bacterias en las cuales el marcador se encontraba difuso, pero en ningún caso se encontró que BtaE estuviera en el polo opuesto a AidB. Estas observaciones indican que BtaE se localiza, al menos mayoritariamente, en el polo nuevo de la bacteria.



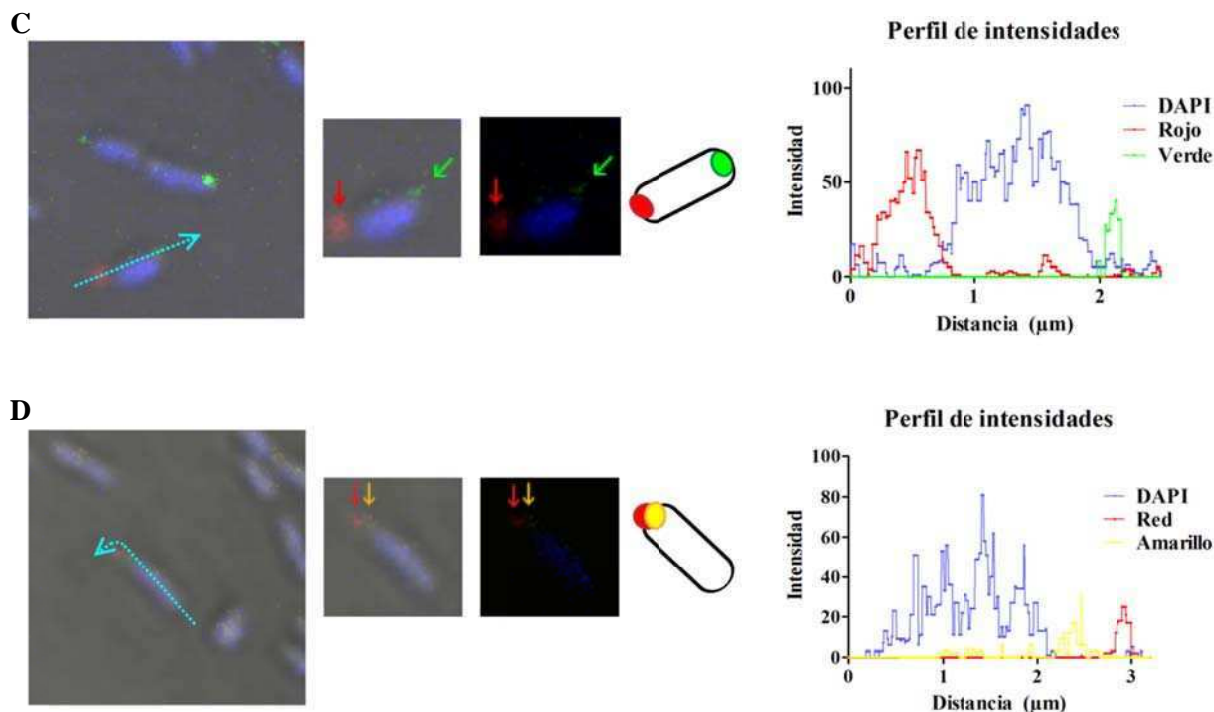


Figura 32. BtaE y BmaC se localizan en el polo nuevo de *B. suis*.

Se realizaron inmunofluorescencias con anticuerpos anti-BmaC en cultivos fijados (sin permeabilizar) de *B. abortus* expresando (A) PdhS-eGFP, o (B) AidB-YFP. Se realizó además tinción con DAPI y observación de contraste de fase para determinar la forma de las bacterias. Las células fueron observadas por microscopía confocal utilizando un microscopio LSM 510 Meta con lente Plana-apocromática (60Z/1.4 oil DIC objective). En las imágenes representativas se indican BmaC, PdhS-eGFP y AidB-YFP con flechas rojas, verdes y amarillas, respectivamente. Además se muestra una representación esquemática y un perfil de intensidades de los distintos canales, construido sobre la línea punteada celeste que está presentada en la primer foto, expresado en unidades arbitrarias. El mismo análisis fue realizado para BtaE en *B. suis* tanto con (C) PdhS-eGFP como con (D) AidB-YFP.

Se puede concluir que, en las condiciones del ensayo, BmaC y BtaE se detectan en una pequeña proporción de bacterias, pero en todos los casos ambas adhesinas se localizan en el polo nuevo de la bacteria. Estas observaciones sugieren que el polo nuevo de *Brucella* estaría funcionalmente diferenciado para la adhesión.

I.12. Resistencia a suero de BtaE

Como se mencionó anteriormente (sección 2.2.a. de la Introducción), *Brucella* es muy tolerante a la actividad bactericida del complemento (142, 307). La estructura particular del LPS de bacteria es, al menos en parte, responsable de esta mayor tolerancia al complemento. Sin embargo se ha propuesto que otras moléculas además del LPS también podrían contribuir con dicha resistencia (151). Dado que algunos ATs triméricos, como por ejemplo YadA de *Y. enterocolitica*

(308) y UspA2 de *Moraxella catarrhalis* (309), están involucrados en la tolerancia de éstas bacterias al complemento, se decidió evaluar un posible rol de BtaE en la tolerancia a este mecanismo de defensa del hospedador. Para ello, se midió el porcentaje de supervivencia de *E. coli* que expresa BtaE y de la mutante *btaE* luego de ser incubadas en una dilución de suero porcino con actividad de complemento y compararlas con las cepas control.

No se encontraron diferencias en la supervivencia de *E. coli* pBBR*btaE* respecto a la cepa control (Figura 33A). Se comprobó que la actividad bactericida del suero fuese debida al complemento; para ello, se comparó para cada cepa la cantidad de bacterias viables luego de ser incubadas en *buffer* (control de viabilidad), suero o suero previamente calentado (30 min a 56°C). Este tratamiento desnaturaliza los componentes del complemento. Como se puede observar en la figura 33B, la actividad bactericida del suero se perdió al inactivar el complemento. Del mismo modo, no se observaron diferencias en la tolerancia al complemento entre *B. suis* Δ *btaE*, y la cepa parental. Estos resultados indican que BtaE no estaría involucrada en la tolerancia de *Brucella* al complemento.

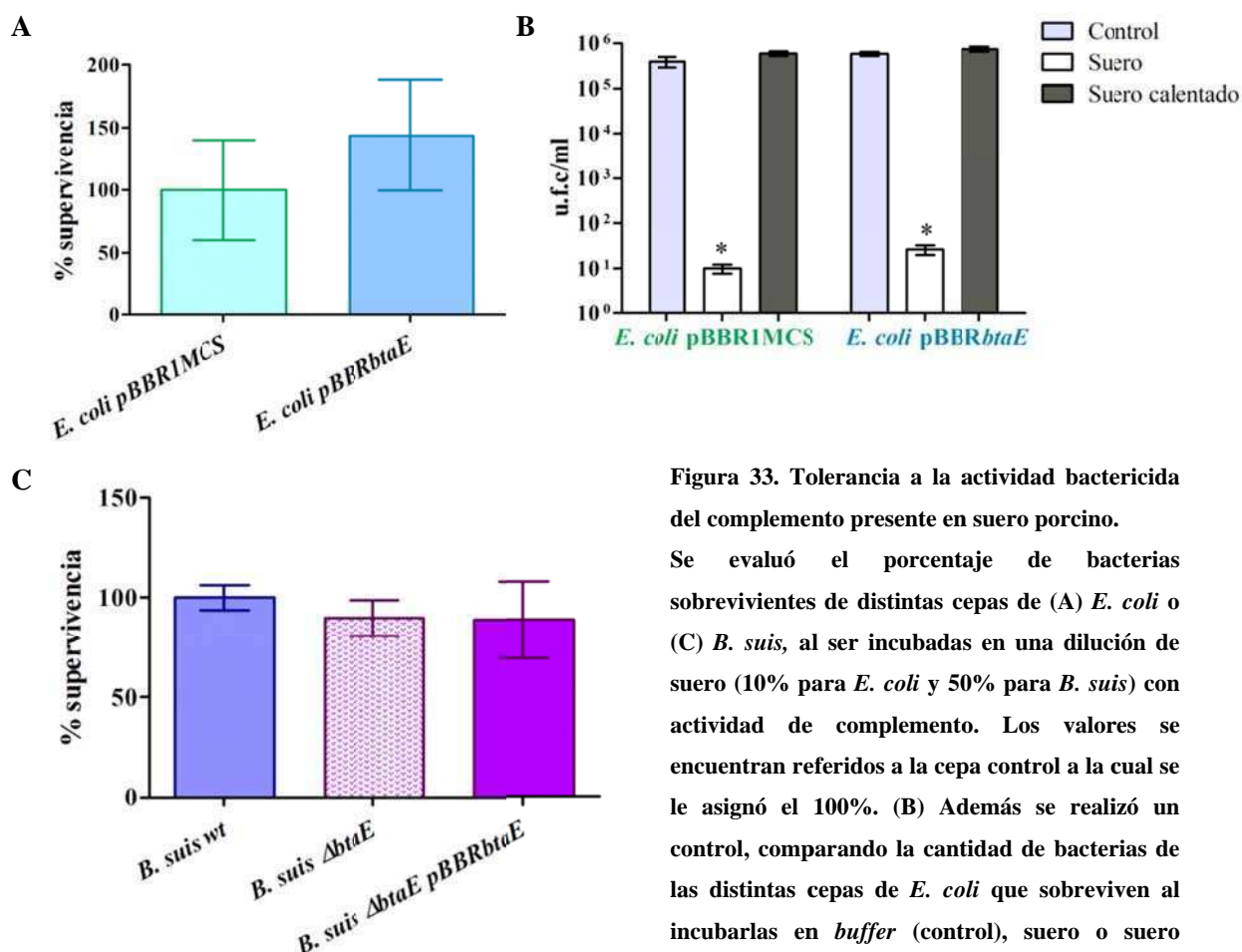


Figura 33. Tolerancia a la actividad bactericida del complemento presente en suero porcino.

Se evaluó el porcentaje de bacterias sobrevivientes de distintas cepas de (A) *E. coli* o (C) *B. suis*, al ser incubadas en una dilución de suero (10% para *E. coli* y 50% para *B. suis*) con actividad de complemento. Los valores se encuentran referidos a la cepa control a la cual se le asignó el 100%. (B) Además se realizó un control, comparando la cantidad de bacterias de las distintas cepas de *E. coli* que sobreviven al incubarlas en *buffer* (control), suero o suero

calentado a 56°C durante 30 min. Los resultados que se muestran corresponden a un experimento representativo de tres realizados por triplicado. Los datos fueron analizados por test de Student o ANOVA, según corresponda.

*, significativamente distinto del control ($p < 0.05$), con un intervalo de confianza del 95%

I.13. Expresión *in vivo* de BtaE

Es esperable que BtaE se exprese *in vivo* en el hospedador natural. Por lo tanto, se analizó la presencia de anticuerpos capaces de reconocer a BtaE en sueros de 14 chanchos sanos y 14 chanchos infectados con *B. suis* a través de un ensayo de ELISA indirecto. Los sueros fueron gentilmente cedidos por Sebastián Elena y Ana Nicola del SENASA. Los pocillos de placas de ELISA fueron recubiertos con la fracción sub-celular enriquecida en cuerpos de inclusión de las cepas de *E. coli* BL21 pAcBtaE (la cual expresa el péptido derivado de BtaE utilizado para la obtención de anticuerpos, sección I.4 de éste capítulo) o de la cepa transformada con el plásmido vacío como control. Los pocillos recubiertos se incubaron con los sueros y se midió el título de anticuerpos capaces de reconocer a BtaE, mediante el uso de la proteína A/G conjugada a fosfatasa alcalina. A los valores obtenidos se les restó la señal observada en pocillos que tenían inmovilizados los cuerpos de inclusión de la cepa control (plásmido vacío), analizados con el mismo suero. El título de anticuerpos capaces de reconocer a BtaE fue significativamente mayor en chanchos enfermos que en sanos (Figura 34A), incluso si se descarta al cerdo muy desviado con alto título. Estos resultados sugieren que: i) BtaE se expresaría *in vivo* en el hospedador natural, ii) la proteína sería antigénica y iii) BtaE induciría una respuesta humoral generando producción de anticuerpos.

También se analizó la expresión de BtaE en un suero humano proveniente de un individuo infectado con *B. suis* y un suero de un individuo sano, gentilmente cedidos por la Dra. Nidia Lucero de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS). La señal de anticuerpos anti-BtaE en el suero del paciente enfermo fue significativamente mayor ($p < 0.001$) que el obtenido para el individuo sano (Figura 34B). Sin embargo, es importante señalar que este resultado es preliminar y que para confirmar esta observación será necesario evaluar un número significativo de sueros humanos provenientes de individuos infectados y sanos.

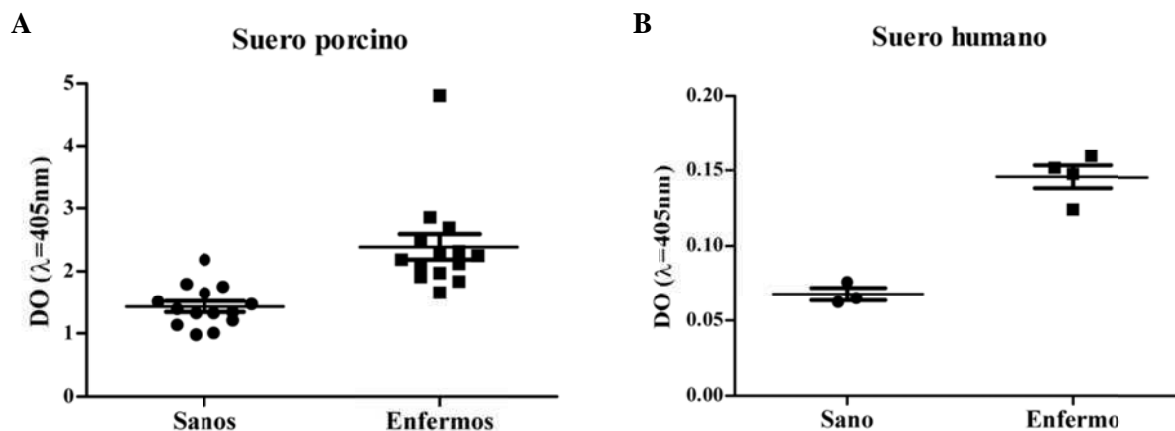


Figura 34. Anticuerpos anti-BtaE.

Se estudió la presencia de anticuerpos capaces de reconocer a BtaE en sueros provenientes de (A) porcinos y (B) humanos. En cada caso se comparó la señal de anticuerpos capaces de reconocer BtaE en sueros provenientes de individuos sanos y enfermos. Los ensayos realizados en porcinos fueron realizados dos veces, mientras que en el caso de los humanos se realizaron 4 repeticiones, en ambos casos por triplicado. Los datos fueron analizados por test Student, y en ambos hospedadores se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$), las cuales no están indicadas en el gráfico por claridad.

I.14. Virulencia en ratones

Para evaluar la contribución de BtaE en la virulencia de *B. suis*, se investigó el efecto de la delección de *btaE* sobre el recuento de bacterias en bazo de ratón. Cabe destacar que normalmente al realizar infecciones de ratones con *Brucella*, las bacterias son inoculadas vía inyección intraperitoneal. Dado que es posible que BtaE esté involucrada en etapas tempranas de la infección, se decidió inocular los ratones a través de la ruta intragástrica. Se ha descrito que la carga bacteriana en bazo y otros órganos de ratones infectados con *B. abortus* por la vía digestiva incrementa significativamente a los 7 días p.i., y se estabiliza a tiempos más largos (310). Por lo tanto, se decidió evaluar la carga bacteriana en bazo a 7 y 30 días p.i. en colaboración con la Dra. Silvia Estein (Laboratorio de Inmunología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (U.N.C.P.B.A.), Tandil). Tanto a los 7 como a los 30 días p.i. la carga bacteriana en bazo de ratones infectados con la cepa mutante fue significativamente menor que en ratones inoculados con la cepa parental (Figura 35A y B). A los 7 días p.i. la reducción de la mutante respecto de la cepa silvestre fue de 0.76 log, mientras que a los 30 días fue de 1.24 log. La cepa complementada mostró una infección similar a la cepa parental.

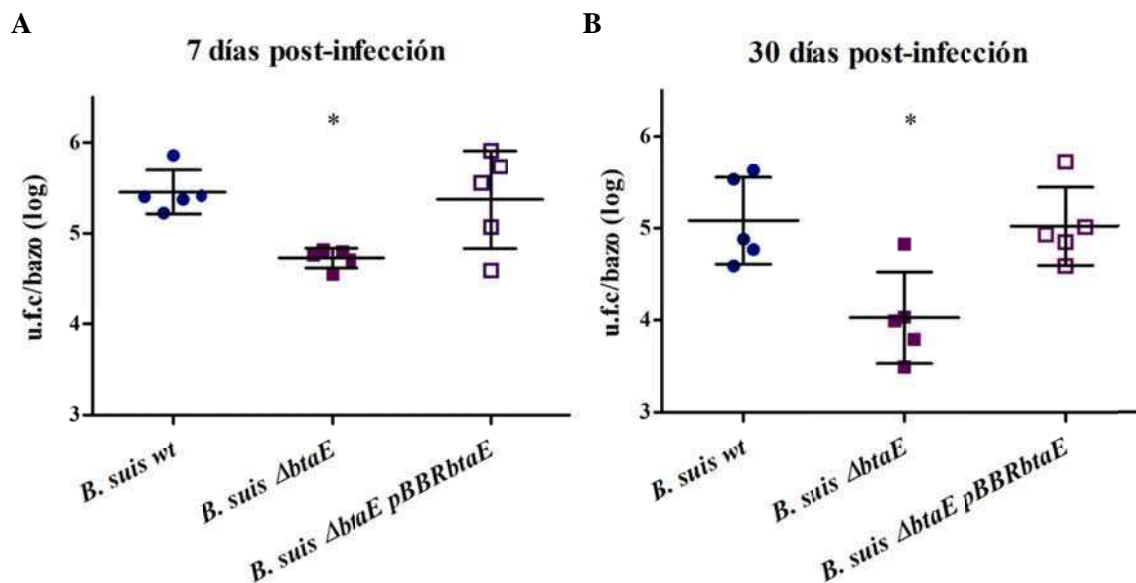


Figura 35. Rol de BtaE en la virulencia de *B. suis*.

Se inocularon intragástricamente ratones BALB/c (10 ratones por grupo) con: *B. suis*, *B. suis* Δ btaE o la cepa complementada. Cinco ratones de cada grupo fueron sacrificados a los (a) 7 y (b) 30 días p.i., a los cuales se les determinó la cantidad de bacterias en el bazo. Para ello se plaquearon diluciones del homogenato de bazo en duplicado, y se determinaron las u.f.c. Los resultados se expresan como el valor \log_{10} por bazo y se evaluaron mediante ANOVA. El experimento se repitió dos veces obteniéndose resultados similares.

*, significativamente distinto a la cepa silvestre ($p < 0.05$)

Estos resultados indican que BtaE es necesaria para una virulencia completa de *B. suis* en ratones infectados por la vía intragástrica, tanto en etapas tempranas como tardías de la infección.

Capítulo II: Caracterización de BR_1846

II. 1. Análisis bioinformático de BR_1846

El *locus* BR_1846 se localiza en el cromosoma I de *B. suis* 1330 entre las posiciones 1778557 y 1777721 y tiene una longitud de 837 pb. El producto del gen está anotado como una proteína hipotética de una longitud de 278 aminoácidos y un peso molecular estimado de 28.5 kDa. Al analizar las regiones adyacentes a BR_1846 se observa que los genes lindantes se encuentran codificados en la misma hebra de ADN (Figura 36A). Río abajo se encuentran los *loci* BR_1843 y BR_1844, los cuales codifican proteínas involucradas en la biosíntesis de aminoácidos de la familia del glutamato y el *locus* BR_1845, que codificaría una proteína que uniría GTP. Río arriba se encuentran BR_1847 y BR_1848, los cuales codificarían putativas acetiltransferasas.

Al analizar con más detalle la secuencia de BR_1846 se determinó que la proteína tendría en su amino terminal una secuencia señal con sitio de clivaje entre los aminoácidos alanina y prolina de las posiciones 29 y 30, respectivamente. Este péptido señal mediaría el transporte de la proteína a través de la membrana interna por la maquinaria Sec (278). El análisis del C-terminal reveló la presencia del dominio traslocador típico de los AT II (dominio C-terminal *YadA-like*). Entre el dominio C-terminal y la secuencia señal se observó una región de 170 aminoácidos que correspondería al dominio pasajero del autotransportador. Dado que la proteína consta de los elementos típicos de ATII se la llamó BtaF (por *Brucella trimeric autotransporter*). Con respecto a la región que corresponde al dominio pasajero no se encontraron dominios asociados a alguna función ni tampoco dominios conservados de función desconocida (Figura 36B).

Como se mencionó en la Introducción (ver sección 3.2.a), se espera que los AT II tengan una estructura de tipo cabeza-conector-tallo-anclaje (Figura 8). Sin embargo al estudiar la estructura modular de BtaF se pudieron identificar únicamente el clásico dominio de anclaje de membrana, que coincide con el dominio C-terminal *YadA-like*, y segmentos correspondientes al tallo (Figura 36C). No se pudieron predecir dominios estructurales correspondientes al conector ni a la cabeza.

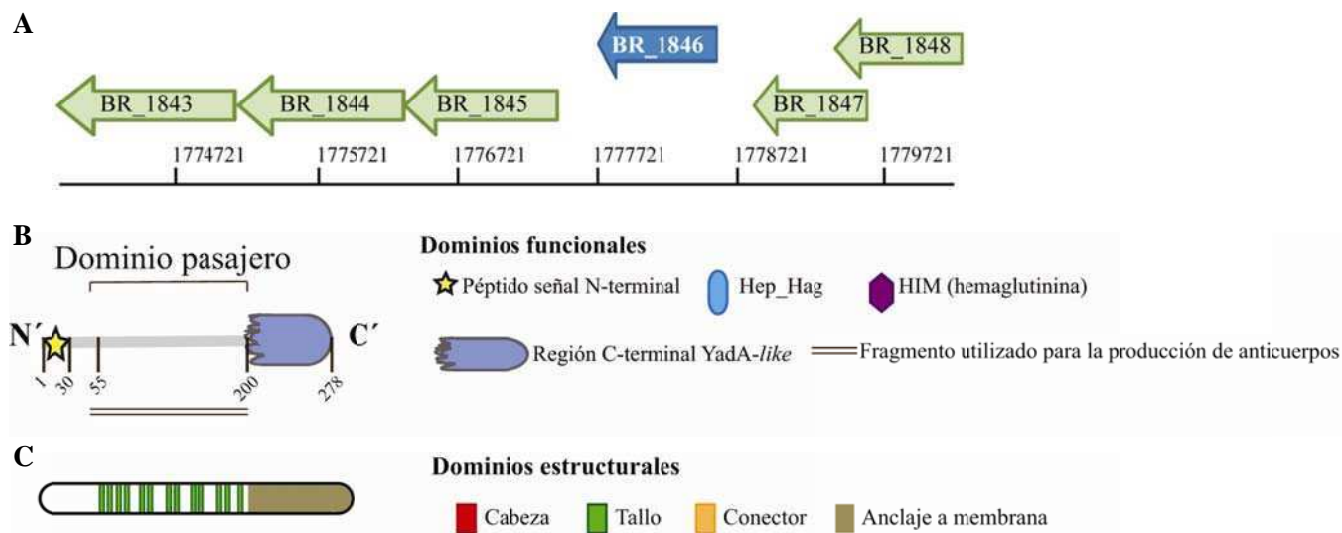


Figura 36. Entorno genético de *btaF* y dominios de la proteína

(A) Entorno genético de *btaF* (BR_1846), construido en función al gráfico obtenido de TIGR CMR.

Esquema de BtaF en el cual se indican los dominios (B) funcionales y (C) estructurales, que se reconocen a partir del análisis de la secuencia proteica.

Mediante el uso de MetaServer (299) se comparó la estructura predicha de BtaF con las estructuras de proteínas depositadas en distintas bases de datos. Este análisis mostró, como se esperaba, una alta similitud en la estructura predicha para el dominio C terminal de BtaF, con estructuras ya resueltas correspondientes a dominios C terminales de otros ATs II. Por otro lado, si bien a nivel secuencia el dominio pasajero no presenta similitud con ningún dominio descrito, se encontró una similitud significativa en su estructura predicha con las estructuras 2qih_A y 1p9hA. La similitud con 2qih_A se observa entre los aminoácidos 57 y 201 de BtaF. Esta estructura pertenece al dominio del AT II UspA1 de *M. cattarhalis* responsable de la unión al receptor celular CEACAM1 (300). Por otro lado, la estructura 1p9h_A corresponde a un dominio del AT II YadA de *Y. pestis* responsable de la unión a colágeno (241); la similitud con YadA se observa en la región entre los aminoácidos 50 y 207 de BtaF.

Finalmente, se realizó una búsqueda de ortólogos a BtaF en distintas especies y cepas del género *Brucella* utilizando BLAST (276) y KEGG (277). Las proteínas ortólogas se compararon con BtaF de *B. suis* 1330 (Tabla 16). Se encontraron ortólogos anotados en todas las especies clásicas salvo en *B. ovis*; sin embargo, al realizar una búsqueda en el genoma de *B. ovis* se pudo identificar la presencia de un ORF que no se encuentra anotado como tal, que codificaría para un homólogo de BtaF. El gen se encuentra en el cromosoma I de *B. ovis* entre las posiciones 1786495 y 1785911 (585 nucleótidos). Todos los ortólogos presentan los dominios característicos (y esenciales) de los ATs: secuencia señal, dominio pasajero y dominio translocador.

Es interesante destacar que dentro de los ortólogos se observó una importante variabilidad entre las distintas especies, así como también entre cepas de una misma especie. El largo total de la proteína varió entre 155 (para *B. melitensis* BMEI0205) y 437 aminoácidos (para *B. microti*) (Tabla 16). En forma similar al ortólogo de *B. suis* 1330, no se detectaron dominios estructurales correspondientes a la cabeza en varios de los homólogos; sin embargo, otros ortólogos presentaron uno e incluso dos de estos dominios. El porcentaje de similitud del ortólogo de la cepa 1330 de *B. suis* con el de las proteínas de otras especies analizadas varió entre el 67.6% (para BAB1_1854 de *B. abortus* 2308) hasta el 86.5% (*B. pinnipedialis*). Al comparar homólogos de otras cepas de la *B. suis* se observó que en el caso de la cepa VBI22 las proteínas son idénticas (100% identidad), mientras que las correspondientes a otras cepas como 92/93 y la cepa 686 presentan una baja similitud (89.4 y 74.9% respectivamente). Incluso en la proteína de la cepa 686 se predicen dos dominios asociados a la estructura correspondiente a la cabeza, mientras que en los demás homólogos de *B. suis* analizados no se predice dicha estructura (Tabla 16). Todas estas observaciones indican que existe una importante variabilidad entre los ortólogos no solo entre las distintas especies del género, sino también entre distintas cepas de una especie.

| Cepa | Locus | Longitud (aa) | Anotación daTAA | | | | % Identidad/Similitud |
|----------------------------|---------------|---------------|-----------------|-------|----------|---------|-----------------------|
| | | | Cabeza | Tallo | Conector | Anclaje | |
| <i>B. suis</i> 1330 | BR_1846 | 278 | - | 1 | - | 1 | - |
| <i>B. suis</i> VBI22 | BSVBI22_A1842 | 278 | - | 1 | - | 1 | 100/100 |
| <i>B. suis</i> 92/29 | C062_01978 | 311 | - | 1 | - | 1 | 89.1/89.4 |
| <i>B. suis</i> 686 | EEY31924 | 269 | 2 | 1 | - | 1 | 74.6/74.9 |
| <i>B. abortus</i> 2308 | BAB1_1854 | 197 | 2 | 2 | - | 1 | 66.2/67.6 |
| <i>B. abortus</i> S19 | BAbS19_I17340 | 257 | 2 | 2 | - | 1 | 74.6/75.9 |
| <i>B. melitensis</i> 16M | BMEI0205 | 155 | - | 1 | - | 1 | 53.6/54 |
| <i>B. canis</i> ATCC 23365 | BCAN_A1884 | 374 | - | 2 | - | 1 | 73.5/74.1 |
| <i>B. microti</i> | BMI_I1862 | 437 | 1 | 2 | - | 1 | 61.3/62.5 |
| <i>B. pinnipedialis</i> | BPI_I1902 | 311 | - | 2 | - | 1 | 85.5/86.5 |
| <i>B. ovis</i> ATCC 25840 | Presente* | 195 | - | 1 | - | 1 | 69.4/69.4 |

Tabla 16. Ortólogos de BtaF en distintas cepas y especies del género *Brucella*.

En cada caso se indica: el nombre del *locus*, el número de aminoácidos de la proteína, la cantidad de dominios estructurales correspondientes a cabeza, tallo, conector y anclaje identificados con daTAA y la identidad y similitud con respecto a la proteína de *B. suis* 1330.

**Locus* no anotado; el cual codificaría un homólogo funcional a BtaF ubicado entre las posiciones 1786495 y 1785911 (585 nucleótidos) del cromosoma I de *B. ovis* ATCC25840.

II.2. Obtención de la cepa de *B. suis* mutante en *btaF* y su complementada

La mutante se generó siguiendo la misma estrategia descrita para *btaE*. A partir del ADN genómico de *B. suis* 1330 se amplificó un fragmento río arriba de *btaF* y un fragmento río abajo del gen (Figura 37A). Los *primers* introdujeron en el extremo 5' de cada hebra sitios de reconocimiento para distintas enzimas de restricción. Ambos productos fueron ligados entre sí, el producto de la ligación fue amplificado mediante PCR (Figura 37B) y clonado en el vector pK18mobsacB, obteniéndose el plásmido p Δ *btaF*. En la Figura 37C se puede observar que luego de la digestión del plásmido con las enzimas BamHI y SphI se obtuvieron las bandas esperadas. El plásmido fue transferido por conjugación biparental a *B. suis*. Se seleccionaron simples recombinantes en presencia de ácido nalidíxico y kanamicina. Las dobles recombinantes se seleccionaron en medio con sacarosa. Las mutantes se confirmaron por *colony*-PCR como se explica en “Materiales y Métodos” (Figura 37E).

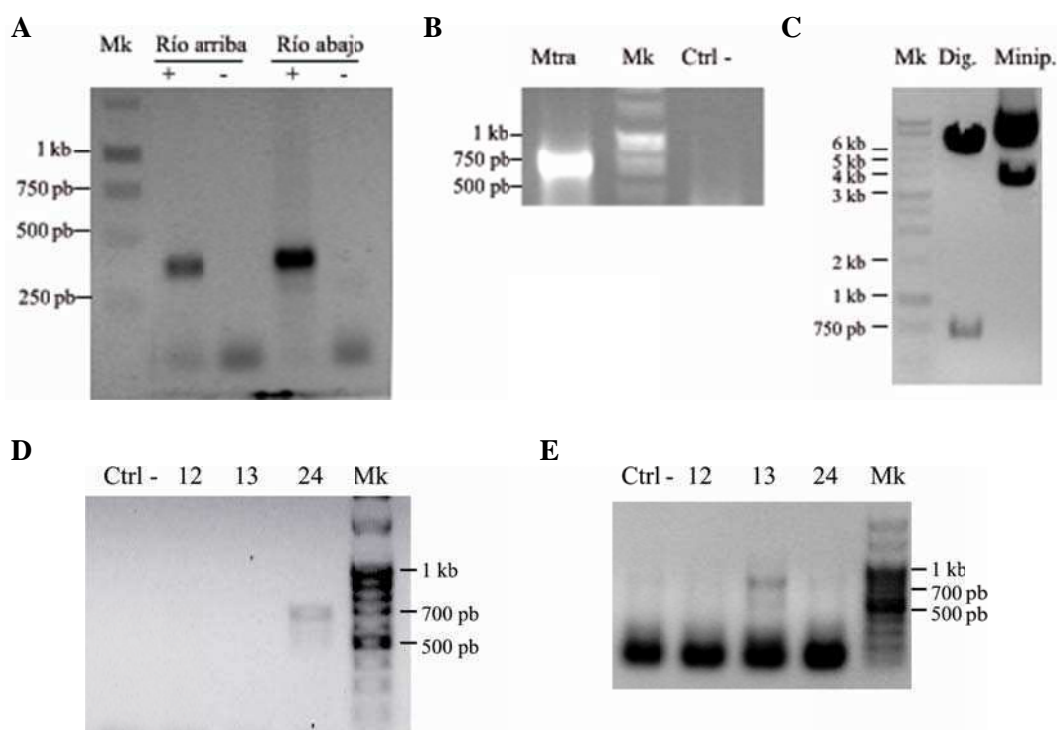


Figura 37. Obtención de *B. suis* Δ *btaF*

(A) Se amplificó una región río arriba de *btaF* y otra región río abajo, ambas de aproximadamente 370 pb; las cuales gracias a la adición de sitios de reconocimiento de enzimas de restricción se ligaron entre sí obteniendo un producto de aproximadamente 750 pb. (B) La ligación fue amplificada mediante PCR y luego clonada en el vector pK18mobsacB obteniéndose el plásmido p Δ *btaF*. Se confirmó su correcto ensamblado mediante *colony*-PCR, secuenciación y digestión del plásmido. (C) Al digerirlo con las enzimas BamHI y SphI se obtuvieron las bandas esperadas de aproximadamente 5.6 y 0.7 kb. Se transfirió el plásmido a *B. suis* 1330 y se seleccionaron clones dobles recombinantes. Se estudiaron los distintos clones mediante *colony*-PCR utilizando oligos que amplifican (D)

un fragmento de aproximadamente 660 pb en presencia de la versión silvestre del gen, (E) y otro par de oligos que amplifican un fragmento de aproximadamente 750 pb en presencia de la versión delecionada. Se pudo determinar que el clon 13 presenta el gen *btaF* delecionado, con lo cual se lo llamó *B. suis ΔbtaF*. En todos los casos Mk corresponde al marcador de peso molecular, y Ctrl al control.

Con el fin de complementar la mutante, el gen *btaF* fue clonado junto con sus regiones flanqueantes (incluida una región río arriba de 631 pb que probablemente contiene a su propio promotor) en el vector pBBR1MCS, cuyo origen replicativo es funcional en *Brucella* (Figura 38A), obteniéndose el plásmido pBBR*btaF*. Su correcto ensamblado se confirmó por *colony*-PCR, digestión del plásmido (Figura 38B) y secuenciación. Del mismo modo que como se explicó en el caso de *btaE*, el plásmido pBBR*btaF* fue transferido por conjugación biparental a *B. suis ΔbtaF*. Mediante *colony*-PCR se evaluó en la cepa complementada la presencia de las versiones delecionada y silvestre del gen (Figura 38C y D).

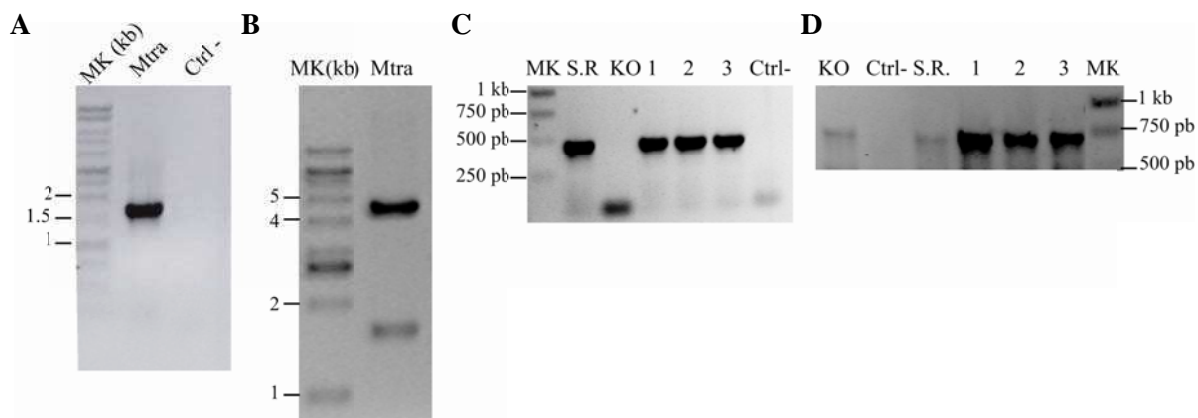


Figura 38. Obtención de *B. suis ΔbtaF* pBBR*btaF*.

(A) A partir del ADN genómico de *B. suis* 1330 se amplificó un fragmento de aproximadamente 1.6 kb que contiene a *btaF* y sus regiones flanqueantes, el cual se clonó en el vector pBBR1MCS obteniéndose el plásmido pBBR*btaF*. Se confirmó el correcto ensamblado mediante *colony*-PCR y (B) digestión del plásmido con las enzimas de restricción KpnI y SacI. Mediante la digestión se obtuvieron las bandas esperadas de aproximadamente 1.6 y 4.7 kb. Por otro lado se confirmó mediante secuenciación del inserto, que éste no tuviera errores en su secuencia. Finalmente el plásmido se introdujo en *B. suis ΔbtaF* y se obtuvo la cepa complementada *B. suis ΔbtaF* pBBR*btaF*. Mediante *colony*-PCR se evaluó que los distintos clones de la cepa complementada tuvieran tanto (C) la versión silvestre provista en el plásmido, como (D) la versión delecionada del gen. Como se detalla en “Materiales y Métodos” los oligonucleótidos utilizados amplifican en el primer caso una banda de unas 440 pb, mientras que con el segundo par de oligos se amplifica una banda de aproximadamente 750 pb. Los clones 1 a 3 amplifican ambas bandas, lo cual indica que son mutantes que han sido complementadas con lo cual poseen tanto la versión delecionada del gen como la silvestre.

II.3. Obtención de la cepa de *B. suis* mutante en *btaE* y *btaF*

Dado que BtaF y BtaE podrían tener funciones solapadas se decidió generar una doble mutante en los genes *btaE* y *btaF*. El análisis fenotípico de esta mutante permitirá evaluar posibles funciones redundantes, aditivas, sinérgicas o complementarias.

Para obtener la doble mutante se partió de la cepa *B. suis* $\Delta btaF$, a la cual se le delecionó el gen *btaE*. Para ello se realizó el mismo procedimiento que para obtener la simple mutante en *btaE* (Figura 39).

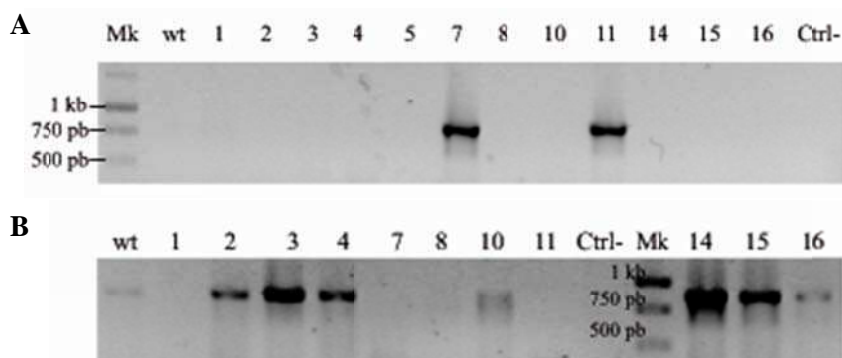


Figura 39. Obtención de *B. suis* $\Delta btaE\Delta btaF$

Se transformó *B. suis* $\Delta btaF$ con el plásmido $p\Delta btaE$ y se seleccionaron clones dobles recombinantes en medio selectivo. Mediante *colony*-PCR utilizando oligos que amplifican (A) un fragmento de aproximadamente 800 pb en presencia de la versión delecionada del gen, (B) y otro par de oligos que amplifican una banda de aproximadamente 700 pb en presencia de la versión silvestre del gen; se estudiaron los distintos clones. En los clones 7 y 11 se amplificó la banda correspondiente a la versión delecionada, pero no se amplificó la correspondiente a la versión silvestre. Estos resultados sugieren que los clones 7 y 11 tenían el gen *btaE* delecionado.

II.4. Obtención de anticuerpos policlonales anti-BtaF

Se amplificó a partir del ADN genómico de *B. suis* 1330 un fragmento del gen de 441 pb (Figura 40A), el cual codifica gran parte del dominio pasajero (ver región subrayada en la Figura 36B). El fragmento fue clonado en el vector pET28 de manera que el péptido resultante quede fusionado en su extremo N-terminal a un *tag* de histidina, obteniéndose el plásmido pAcBtaF. La presencia del inserto se evaluó por análisis de restricción, PCR (Figura 40B) y secuenciación. Uno de los clones positivos fue elegido para los estudios siguientes. La expresión del péptido derivado de BtaF en *E. coli* BL21 pAcBtaF se indujo con distintas concentraciones de IPTG: 50 μ M, 0.4 mM y 1mM. Se observó una expresión significativa en presencia de 50 μ M IPTG (indicado con una flecha en la Figura 40C). Se confirmó que la banda correspondiera al péptido derivado de BtaF mediante *Western blot* utilizando como anticuerpo primario anticuerpos anti-HisTag (Figura 40D). En estas condiciones de inducción, la fracción sub-celular con mayor proporción del péptido fue la

correspondiente a los cuerpos de inclusión (Figura 40E). Se decidió partir de los cuerpos de inclusión de cultivos inducidos con 50 μ M de IPTG, para la purificación del péptido.

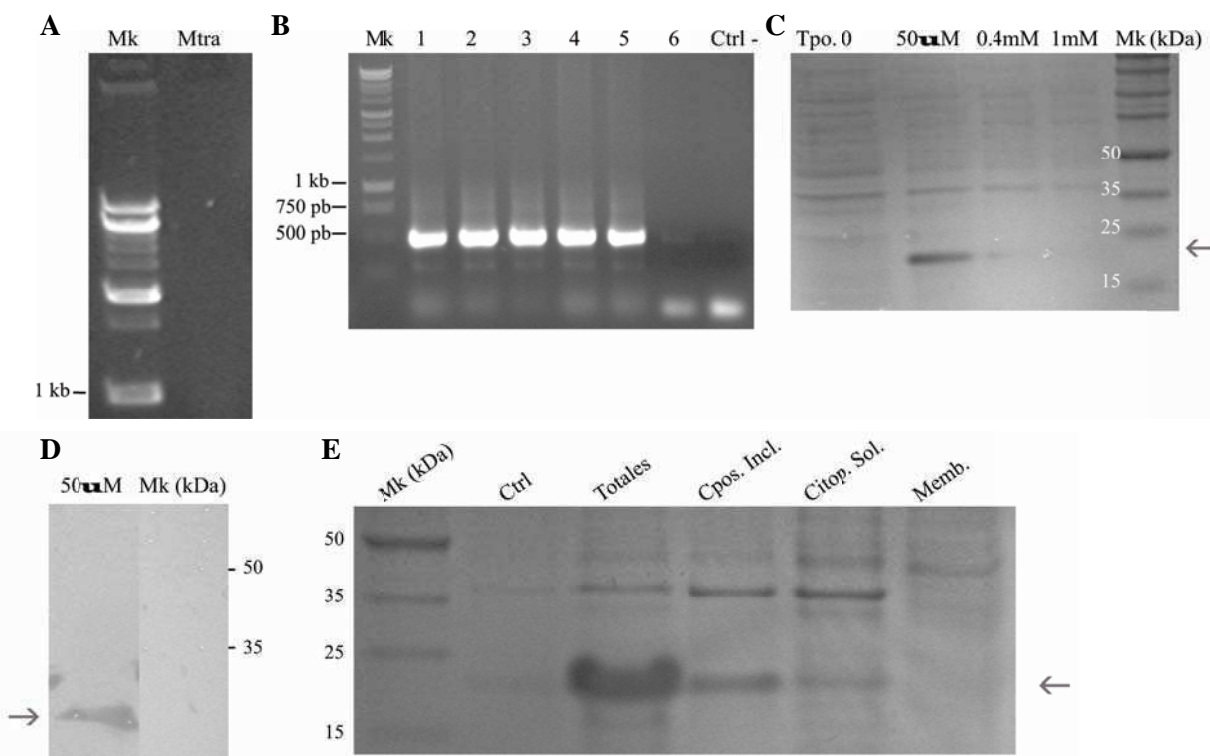


Figura 40. Construcción de pAcBtaF y puesta a punto de la inducción del péptido derivado de BtaF.

(A) Se amplificó a partir de ADN genómico de *B. suis* 1330 una porción de *btaF* y se lo clonó en el vector pET28. La construcción se confirmó por (B) *colony*-PCR, y secuenciación. Una vez obtenido el plásmido pAcBtaF, se transformó *E. coli* BL21 y (C) se evaluó la expresión del péptido derivado de BtaF a distintas concentraciones de IPTG. (D) Se confirmó la expresión del péptido mediante *Western blot*, con anticuerpos anti-HisTag. (E) Finalmente se determinó la localización sub-celular del péptido.

Como primera estrategia se separó el péptido utilizando una columna de níquel (IMAC). Sin embargo, el pegado del mismo fue ineficiente; tampoco se pudieron obtener separaciones satisfactorias por HPLC utilizando columnas que resuelven por tamaño. Se decidió utilizar una estrategia poco convencional, partiendo de los cuerpos de inclusión. Estos fueron lavados obteniéndose por un lado los cuerpos de inclusión “lavados” y por el otro los sobrenadantes generados en dicho proceso (fracciones llamadas SN y Snp1 a Snp3, ver detalle en “Materiales y Métodos”). Se separaron las proteínas de las distintas fracciones mediante SDS-PAGE. En las fracciones SN, Snp1, Snp2 y Snp3, se observó una banda proteica que según su tamaño correspondería al péptido de BtaF (Figura 41, indicada con una flecha). Se confirmó mediante *Western blot* que la banda identificada corresponde al péptido (no se muestra). En los cuerpos de inclusión “limpios”, la fracción correspondiente al péptido fue despreciable (Figura 41). Se

concentraron las fracciones Snp1, Snp2 y Snp3, y alícuotas de los concentrados y de SN fueron utilizadas para la cuantificación del péptido, como se indica en “Materiales y Métodos”. El resto fue separado mediante SDS-PAGE en geles de calle ancha. En cada calle se cortó la porción del gel correspondiente al péptido, se la liofilizó y conservó a -20°C . Esta preparación se utilizó para inocular ratones y generar anticuerpos policlonales como se describe en “Materiales y Métodos”.

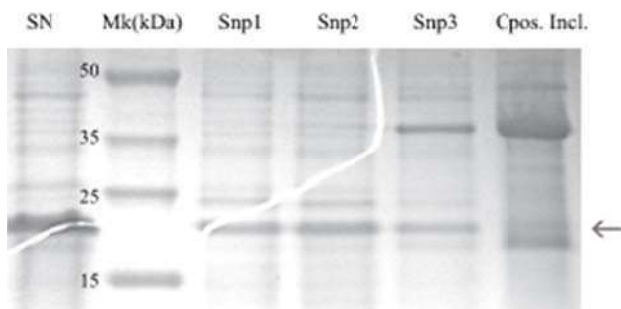


Figura 41. Purificación del péptido derivado de BtaF.

Se partió de una fracción cruda de cuerpos de inclusión a la cual se le realizaron lavados; de este modo se obtuvieron los cuerpos de inclusión limpios (Cpos. Incl.) y sobrenadantes provenientes de los lavados (SN, Snp1 a Snp3). Se separaron las proteínas de las distintas fracciones mediante SDS-PAGE (el péptido derivado de BtaF está indicado con una flecha). Se confirmó que dicha banda fuese la esperada mediante *Western blot* (no se muestra).

La expresión de BtaF *in vitro* y la capacidad de los anticuerpos de reconocer a BtaF fueron evaluadas por *Western blot*. Para ello se obtuvieron las proteínas totales de bacterias cultivadas en TSB. Dada la alta estabilidad del trímero conformado los AT II, se decidió separar las proteínas en un gel semi-nativo de modo de identificar el trímero. Los anticuerpos reconocieron específicamente en la cepa silvestre una proteína que correspondería al trímero de BtaF, mientras que esta banda estuvo ausente en la cepa mutante (Figura 42).

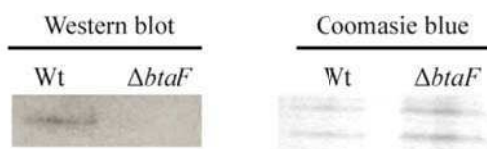


Figura 42. *Western blot* a partir de proteínas totales de *Brucella*.

Las proteínas totales de *B. suis* y *B. suis* $\Delta btaF$ fueron sometidas a una electroforesis en condiciones semi-nativas. BtaF fue revelada con anticuerpos policlonales anti-BtaF (1:800) y anticuerpos anti-ratón (1:30.000) como como anticuerpo secundario. Se muestra un equivalente teñido con *Coomassie blue*.

II.5. Expresión heteróloga en *E. coli*

Se transformó la cepa de *E. coli* CC118 (la cual es no adherente ni invasiva) con el plásmido pBBR*btaF* y se confirmó la expresión de BtaF por *Western blot*. Las proteínas totales de *E. coli* pBBR1MCS (control) y *E. coli* pBBR*btaF* (pBBR*btaF*) fueron separadas mediante electroforesis en gel semi-nativo. Luego se realizó el *Western blot* utilizando como anticuerpo primario los anticuerpos anti-BtaF generados en ratón. Los anticuerpos fueron capaces de

reconocer en *E. coli* pBBR*btaF* una banda que correspondería al trímero de BtaF, la cual estuvo ausente en la cepa control (Figura 43). Esto indica que efectivamente *E. coli* pBBR*btaF* expresa BtaF.

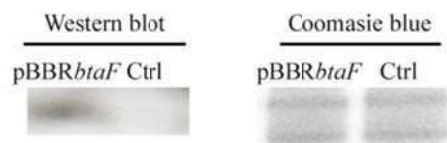


Figura 43. Western blot a partir de proteínas totales de *E. coli*.

Las proteínas totales de *E. coli* pBBR1MCS y *E. coli*.pBBR*btaF* fueron separadas en condiciones semi-nativas y analizadas por *Western blot* utilizando anticuerpos anti-BtaF (1:300). A modo de control de carga se corrieron en paralelo las mismas muestras en otras calles, las cuales fueron teñidas con *Coomassie blue*.

II.6. Análisis de fenotipos asociados a la envoltura celular

Para evaluar la posibilidad que *B. suis* Δ *btaF* hubiera sufrido cambios en el antígeno O debido al proceso de disociación (ver sección 2.2.a. de la Introducción), se evaluó el comportamiento de la cepa al realizar una suspensión de una colonia en acriflavina 0.1 % p/v. A modo de control se incluyeron *B. suis* silvestre (cepa lisa) y *B. ovis* (cepa rugosa). La cepa *B. suis* Δ *btaF* presentó el típico comportamiento de las cepas lisas, lo cual sugiere que no sufrió un proceso de disociación (Figura 44).

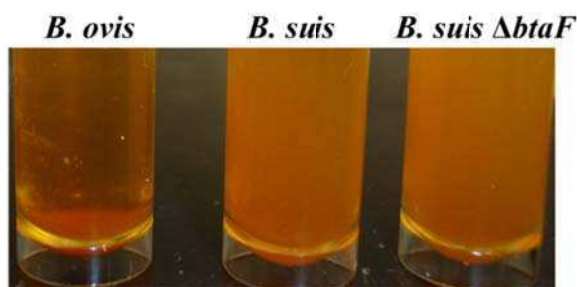


Figura 44. Evaluación de disociación.

Suspensión de colonias de *B. suis* wt (control de cepa lisa), *B. ovis* (control de cepa rugosa) y *B. suis* Δ *btaF* en acriflavina 0.1 %p/v.

Al igual que se realizó para la mutante en *btaE*, se realizaron otros controles del estado de la membrana de la mutante en *btaF*, evaluando la tolerancia a distintos compuestos. La tolerancia de *B. suis* Δ *btaF* a DOC 0.1%, EDTA 200 μ g/ml, Tritón X-100 0.1% y SDS 0.01% no mostró diferencias significativas con la de la cepa parental (ver Figura 45 A-D, respectivamente).

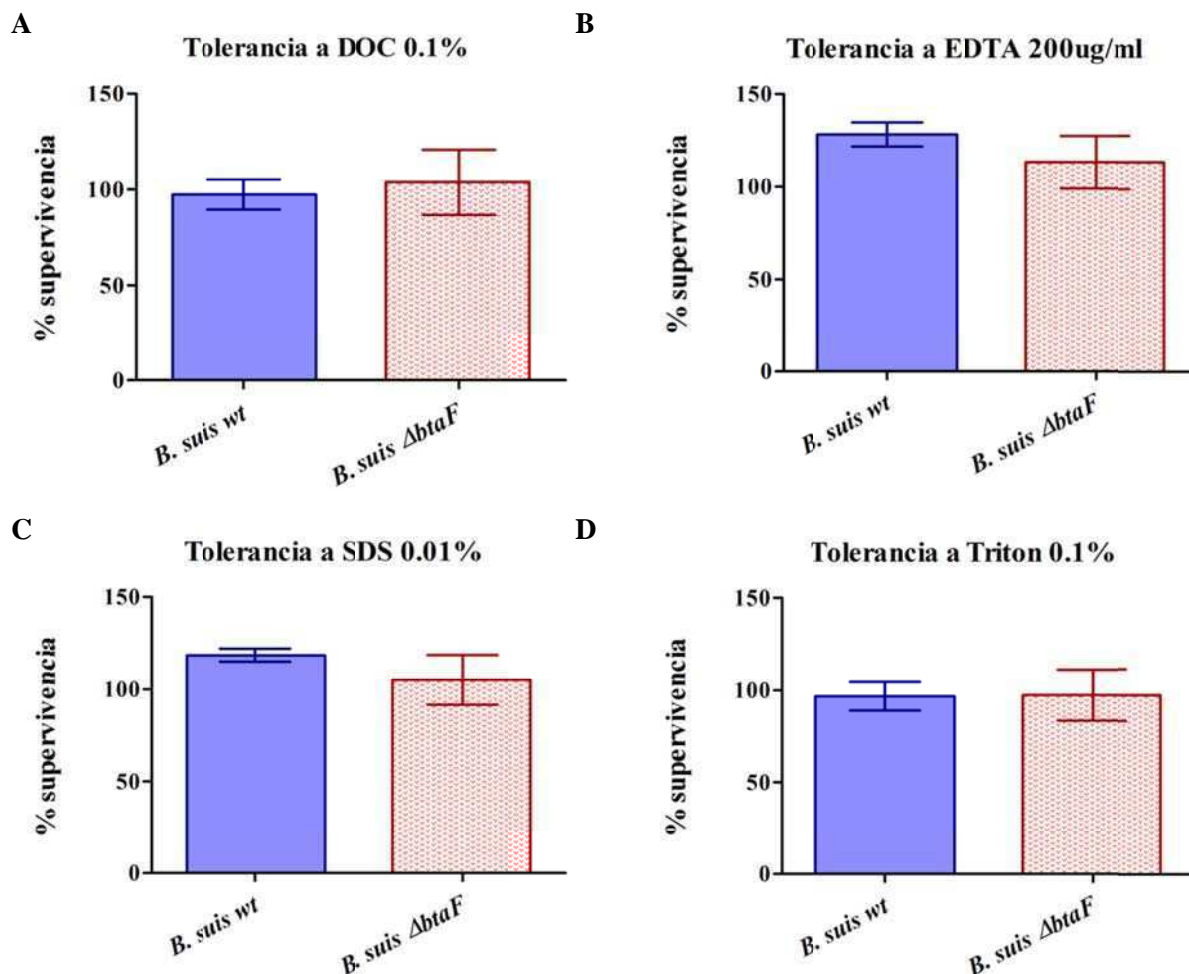


Figura 45. Tolerancia de *B. suis ΔbtaF* a DOC, EDTA, SDS y Tritón X-100

Se comparó la tolerancia de la mutante con la tolerancia de la cepa *B. suis wt* a: (A) DOC 0.1%, (B) EDTA 200 $\mu\text{g/ml}$, (C) SDS 0.01% y (D) Tritón X-100 0.1%. En todos los casos se grafica el porcentaje de u.f.c obtenidas luego de la incubación con cada uno de los compuestos, en relación a la cepa silvestre a la cual se le asignó el valor 100%. Los resultados que se muestran corresponden a un experimento representativo de tres realizados por triplicado. Los datos fueron analizados mediante el análisis ANOVA ($p > 0.05$).

Por último se evaluó la tolerancia característica de *Brucella* a polimixina B. En este ensayo se incluyeron a *B. abortus wt* y *E. coli* como un control adicional de cepa tolerante y un control de cepa sensible, respectivamente. No se observaron diferencias entre las cepas silvestre y mutante *btaF* en la tolerancia a las distintas concentraciones de polimixina B (Figura 46).

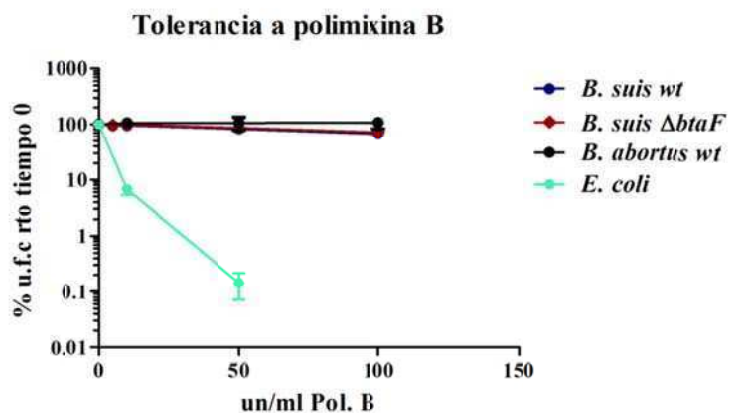


Figura 46. Tolerancia a polimixina B.

Se incubaron *B. suis wt*, *B. suis ΔbtaF*, *E. coli* (como control de cepa sensible) y *B. abortus wt* (como control de cepa resistente) en distintas concentraciones de polimixina B. Para cada cepa y concentración utilizadas, se determinó el porcentaje de u.f.c., adjudicando el valor de 100% a la incubación sin polimixina B.

Los resultados obtenidos indican que la delección de *btaF* no produce un fenotipo pleiotrópico sobre la envoltura bacteriana de *B. suis*.

II.7. Autoagregación y formación de *biofilm*

Como ya se mencionó en el capítulo anterior (sección I.7.) si BtaF estuviera involucrada en la adhesión bacteria-bacteria, esto se vería reflejado en un cambio en la cinética de autoagregación tanto por ganancia o pérdida de función. Sin embargo, no se observaron diferencias en la autoagregación de *E. coli* pBBR*btaF* y *B. suis ΔbtaF* con respecto a las cepas control (Figura 46A y B respectivamente), sugiriendo que BtaF no contribuye a la formación de agregados usualmente observada en la cepa silvestre (Posadas et al, comunicación personal).

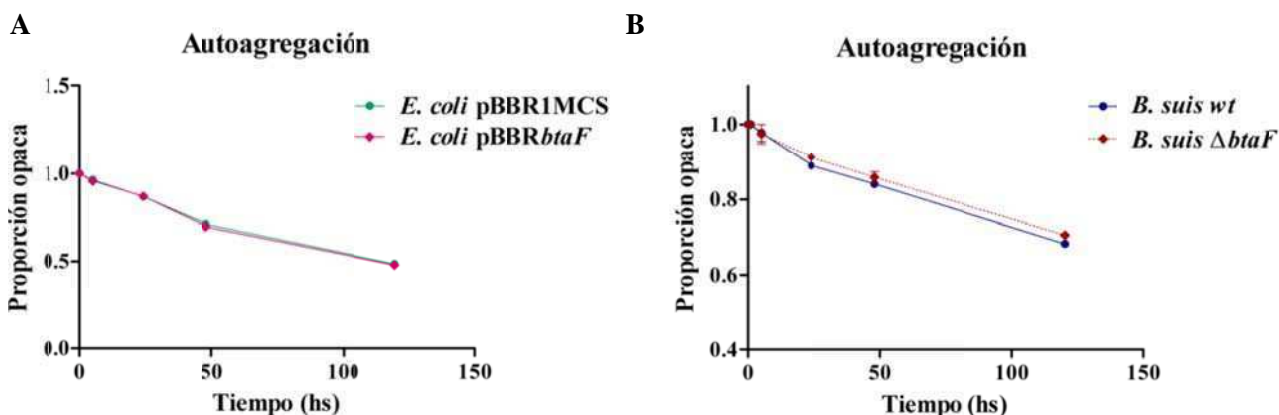


Figura 47. Rol de BtaF en la autoagregación bacteriana.

Se analizó la cinética de autoagregación de (A) *E. coli* pBBR*btaF* y (B) *B. suis ΔbtaF*; comparándolas con sus cepas control.

Como se describió en el capítulo anterior (sección I.7), BtaE tampoco estaría involucrada en la autoagregación. De manera similar, no se observaron diferencias en la cinética de sedimentación entre la doble mutante *ΔbtaE ΔbtaF* y la cepa silvestre, hasta 2 días después de dejar

el cultivo en reposo. Sólo se observó una reducción modesta pero significativa en la velocidad de sedimentación de la doble mutante a tiempos aún mayores (3-4 días) (Figura 48).

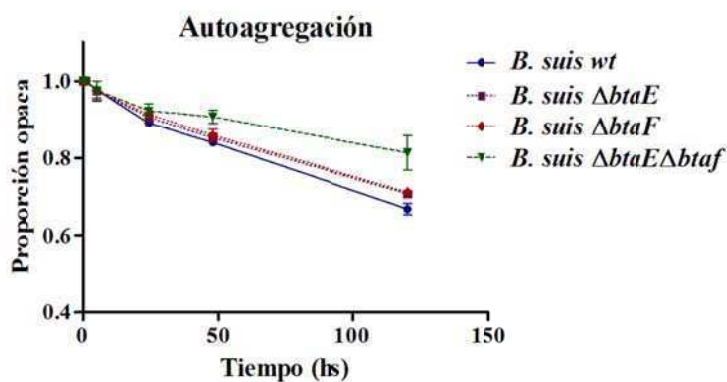


Figura 48. Autoagregación bacteriana en la doble mutante. Se analizó la cinética de autoagregación *B. suis wt*, *B. suis ΔbtaE*, *B. suis ΔbtaF* y la doble mutante *B. suis ΔbtaE ΔbtaF*.

Estos resultados sugieren que BtaE y BtaF podrían cumplir algún rol redundante que afecta en un bajo grado la autoagregación.

Otra manera de evaluar una posible función de la proteína en la interacción entre bacterias y además la adhesión a un soporte es analizar la formación de un *biofilm* sobre un soporte abiótico (ver sección I.7.). En primer lugar, se estudió la capacidad de *E. coli* pBBR*btaF* de formar un *biofilm* sobre placas de poliestireno y se la comparó con la capacidad de la cepa control. La cepa que expresa BtaF formó sobre el soporte hidrofóbico un *biofilm* seis veces mayor que el de la cepa control (Figura 49A). Se muestran también fotografías de la tinción de los pocillos correspondientes a cada una de las cepas, en las que se observa claramente la diferencia en la biomasa adherida. En cambio, al comparar la adhesión a vidrio (superficie hidrofílica), no se observaron diferencias entre ambas cepas (Figura 49B).

Por otro lado, la cepa de *B. suis* mutante en *btaF* presentó una reducción significativa (del 56%) en la biomasa de *biofilm* respecto a la cepa silvestre (Figura 49C). Esta diferencia se restauró al complementar la mutante con el plásmido pBBR*btaF*, confirmando el rol de BtaF en la formación *in vitro* del *biofilm* sobre poliestireno.

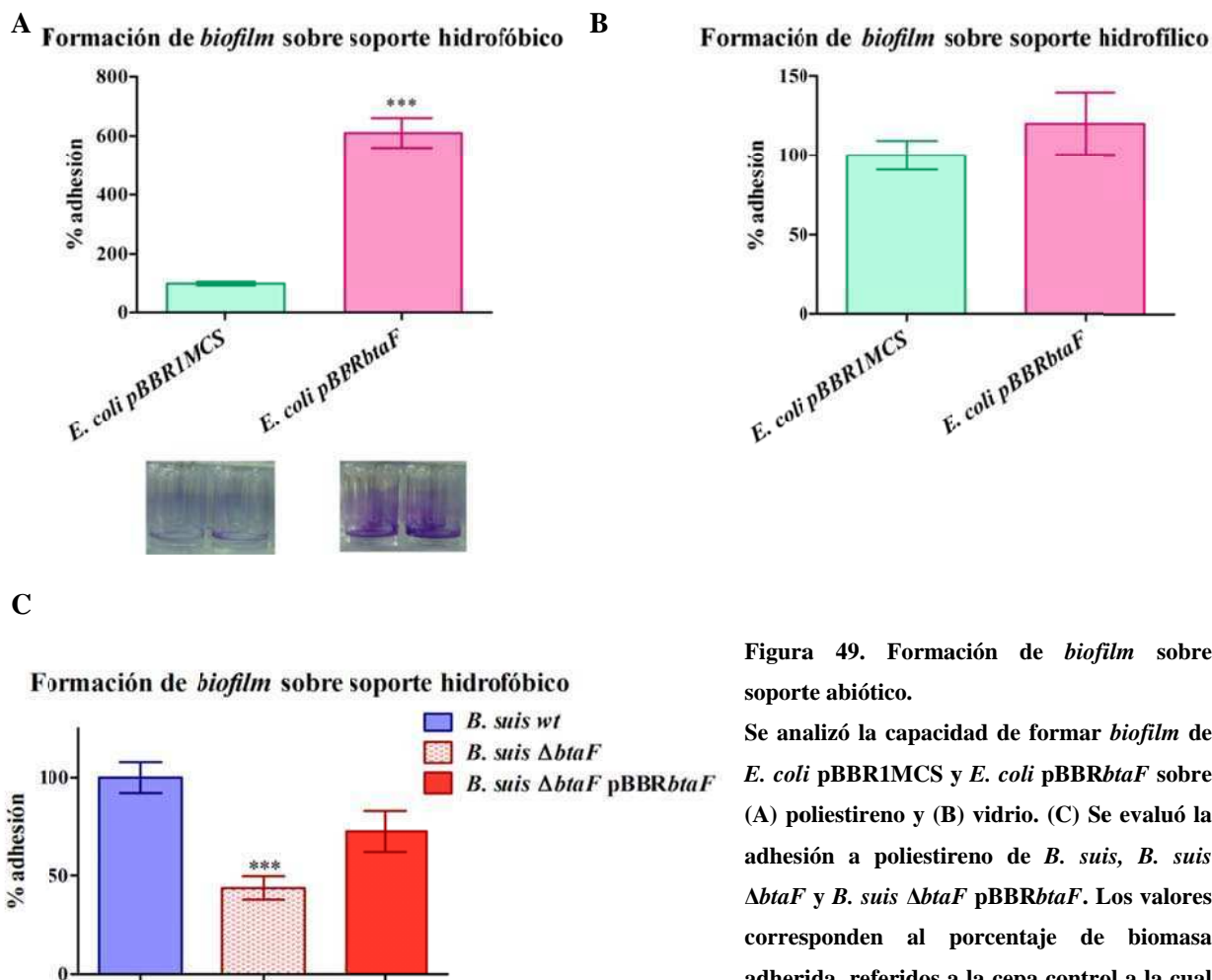


Figura 49. Formación de *biofilm* sobre soporte abiótico.

Se analizó la capacidad de formar *biofilm* de *E. coli* pBBR1MCS y *E. coli* pBBRbtaF sobre (A) poliestireno y (B) vidrio. (C) Se evaluó la adhesión a poliestireno de *B. suis*, *B. suis* $\Delta btaF$ y *B. suis* $\Delta btaF$ pBBRbtaF. Los valores corresponden al porcentaje de biomasa adherida, referidos a la cepa control a la cual se le asignó el valor de 100%. Los datos fueron analizados por Test de Student y ANOVA.

*, significativamente distinto al control ($p < 0.05$), con 95% de confianza.

Los resultados de los ensayos de autoagregación sugieren que BtaF no estaría implicada en la interacción entre bacterias. Por lo tanto, las diferencias en la formación de *biofilm* se deberían fundamentalmente a diferencias en la adhesión al sustrato.

Los resultados descritos en la sección I.7. indican que BtaE no estaría involucrada en la formación de *biofilms*. Para evaluar la posibilidad de una redundancia de funciones se comparó la capacidad de formar *biofilm* sobre placas de poliestireno de la cepa silvestre, la simple mutante en *btaF* y la doble mutante $\Delta btaE \Delta btaF$. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre la mutante en *btaF* y la doble mutante (Figura 50).

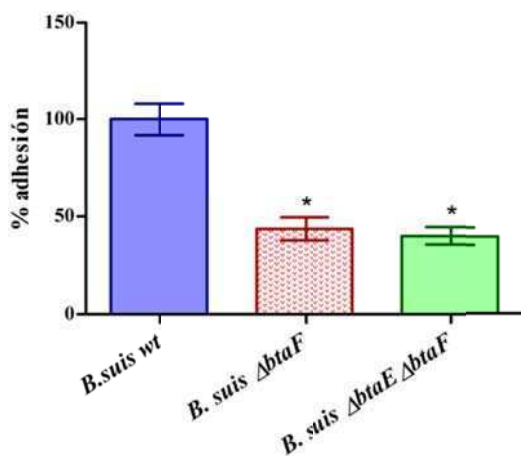
Formación de *biofilm* sobre soporte hidrofóbico

Figura 50. Formación de *biofilm* de la doble mutante sobre soporte hidrofóbico.

Se analizó la capacidad de formar *biofilm* sobre poliestireno de *B. suis* wt, *B. suis* $\Delta btaF$ y *B. suis* $\Delta btaE \Delta btaF$. Los valores corresponden al porcentaje de biomasa adherida, referidos a la cepa silvestre (control) a la cual se le asignó el valor de 100%. Los datos fueron analizados por ANOVA.

*, significativamente distinto al control ($p < 0.05$), con 95% de confianza

Los resultados obtenidos indican que BtaF (y no BtaE) participa en la adhesión a superficies abióticas hidrofóbicas.

II.8. Adhesión a componentes de la matriz extracelular

Del mismo modo como se describió para BtaE (sección I.8. del capítulo anterior), se estudió si BtaF está involucrada en la adhesión a componentes de la ECM o a fetuína. A través del enfoque heterólogo, se observó que BtaF le confiere a *E. coli* un incremento significativo en la adhesión a colágeno, AH, fetuína y fibronectina, comparado con la cepa control (Figura 51A). Por otro lado, la mutante $\Delta btaF$ de *B. suis* presentó una disminución significativa en cuanto a su adhesión a colágeno, HA y fetuína, comparada con la cepa parental. Los niveles de adhesión se recuperaron al complementar la mutante con el plásmido pBBR*btaF* (Figura 51B). En cambio, no se observaron diferencias significativas entre la mutante y la cepa silvestre en la adhesión a fibronectina (Figura 51B). Esto último probablemente se deba a que *Brucella* expresa otras adhesinas con capacidad de unión a fibronectina, que enmascaren a BtaF, como es el caso de BmaC (262)

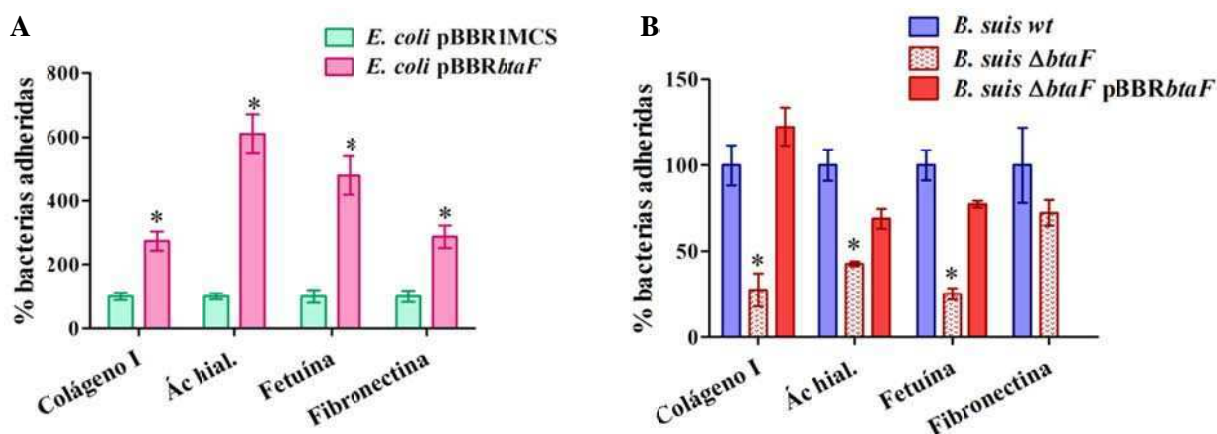


Figura 51. Adhesión a componentes de la ECM

Se analizó la adhesión de (A) *E. coli* pBBR*btaF* y *E. coli* pBBR1MCS, así como de (B) *B. suis* Δ *btaF* y *B. suis* wt a distintos compuestos de la ECM y a fetuína. Los valores corresponden al porcentaje de bacterias adheridas a los pocillos luego de la incubación, referidos a la cepa control a la cual se le asignó el valor de 100%. Los datos fueron analizados por Test de Student o ANOVA, según correspondiera.

*, significativamente distinto al control ($p < 0.05$), con 95% de confianza.

Como se describió previamente, la mutante Δ *btaE* estuvo afectada en la adhesión a AH (sección I.8.). Se evaluó el fenotipo de adhesión a los diferentes ligandos de la doble mutante Δ *btaE* Δ *btaF*. Curiosamente, las mutantes simples Δ *btaF* y Δ *btaE* presentaron niveles similares de adhesión a AH que la doble mutante (Figura 52). Una posible explicación de este resultado es que BtaE y BtaF participen en la adhesión a AH a través de la misma vía. Tampoco se observaron diferencias entre la simple mutante Δ *btaF* y la doble mutante Δ *btaE* Δ *btaF* en la adhesión a colágeno y fetuína, sugiriendo que sólo BtaF contribuiría con la adhesión a estos compuestos. Por último, no se observaron diferencias significativas entre la cepa silvestre, las mutantes simples y la doble mutante en la adhesión a fibronectina (Figura 52), indicando que BtaE y BtaF no son requeridas en la interacción de *Brucella* con fibronectina o, alternativamente, que otras adhesinas (como BmaC) pueden suplirlas (262).

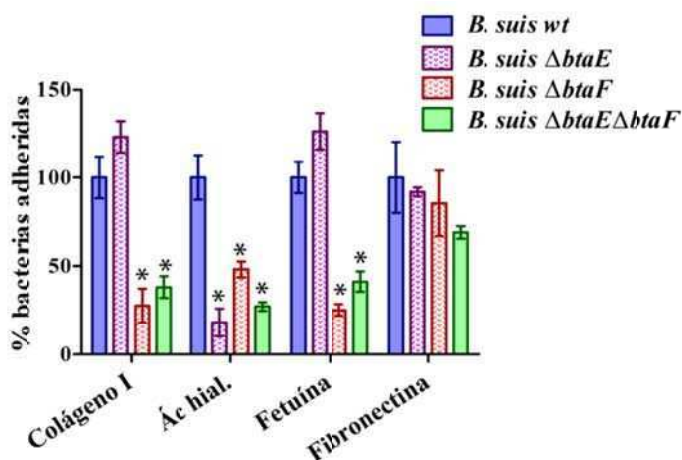


Figura 52. Adhesión a componentes de la ECM de la doble mutante.

Se analizó la adhesión de *B. suis* wt, *B. suis* Δ *btaE*, *B. suis* Δ *btaF* y *B. suis* Δ *btaE* Δ *btaF* a distintos compuestos de la ECM y a fetuína. Los valores corresponden al porcentaje de bacterias adheridas a los pocillos luego de la incubación, referidos a la cepa silvestre a la cual se le asignó el valor de 100%. Los datos fueron analizados por ANOVA. *, significativamente distinto a la cepa silvestre ($p < 0.05$), con 95% de confianza.

Tomados en conjunto, los resultados descritos en esta sección y en la anterior (II.7.) sugieren que BtaF promovería una adhesión inespecífica a diversas superficies; sugiriendo que BtaF tendría un rol más promiscuo en la adhesión al hospedador. Por otro lado, ambos autotransportadores triméricos, BtaE y BtaF, podrían participar a través de la misma vía en la adhesión a determinados ligandos del hospedador, como por ejemplo, AH.

II.9. Función de BtaF en la adhesión e invasión a células del hospedador

Para evaluar el posible rol de BtaF en la interacción de *B. suis* con las células del hospedador, se realizaron básicamente los mismos enfoques experimentales descritos para BtaE

(sección I.9.). Llamativamente, *E. coli* pBBR*btaF* adquirió una mayor eficiencia en la adhesión a HeLa ($151 \pm 20\%$), respecto a la cepa control. Por otro lado, no se observaron diferencias en cuanto a la invasión ni en la relación entre invasión y adhesión (Figuras 53A). En línea con estos resultados, la mutante *B. suis* Δ *btaF* mostró una disminución en la adhesión (del $45 \pm 8\%$) e invasión (del $49 \pm 14\%$) respecto a la cepa silvestre. Tanto los niveles de adhesión como de invasión de la cepa mutante se restauraron en la cepa complementada (Figura 53B). Por último, no se observaron diferencias significativas en la relación entre bacterias invasoras y adheridas entre las distintas cepas (Figura 53B). Esto indica que la menor invasión es una consecuencia de la menor adhesión. Estos resultados sugieren que BtaF estaría involucrada en la adhesión inicial de *B. suis* a HeLa y no así en la invasión.

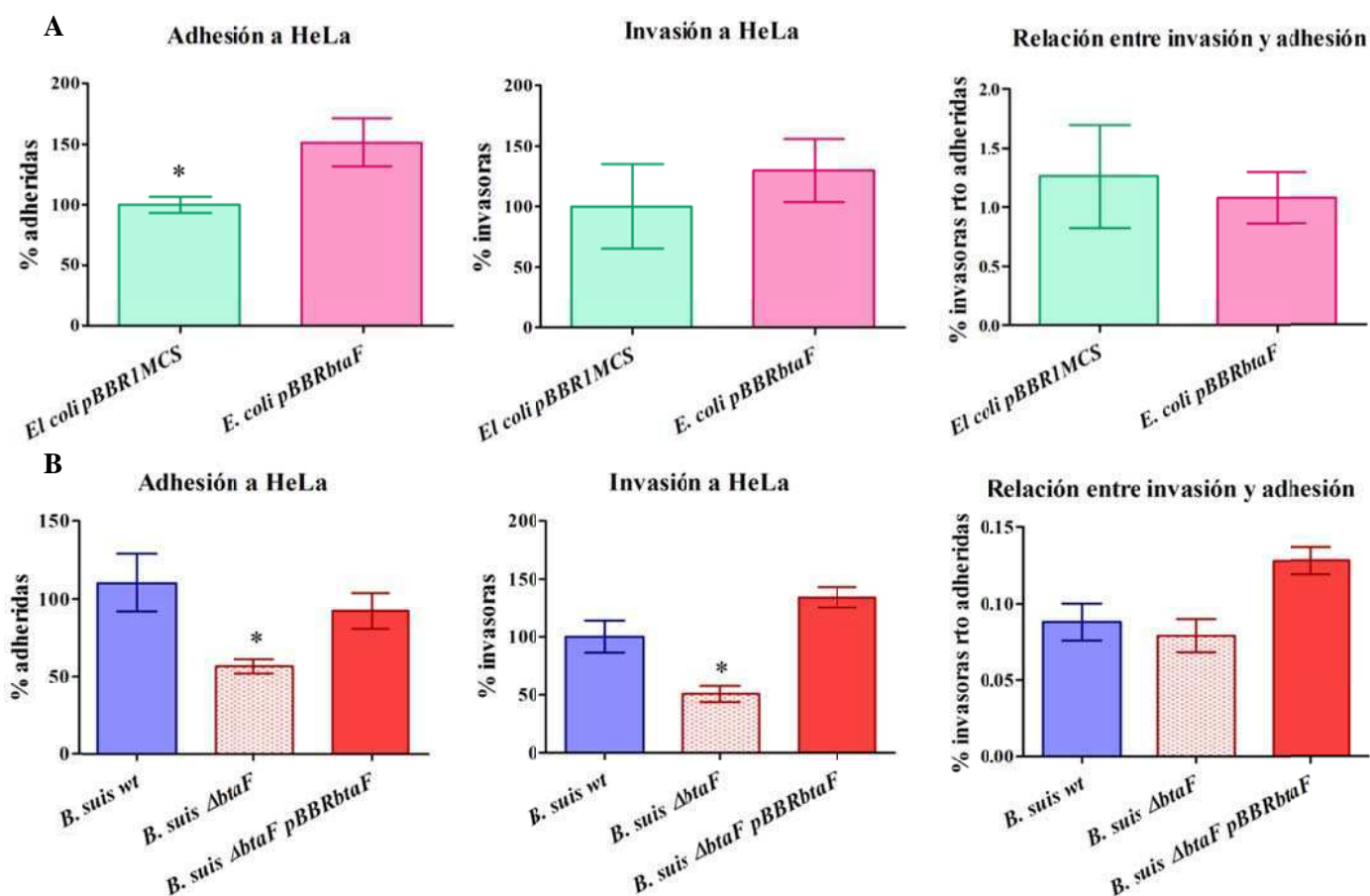


Figura 53. Adhesión e invasión a células HeLa.

Células HeLa se infectaron con las distintas cepas de *E. coli* (A) o *B. suis* (B), utilizando una multiplicidad de infección de 100:1. Se determinó el porcentaje de bacterias adheridas e invasoras y el porcentaje de bacterias invasoras respecto a las adheridas, es decir la relación entre invasoras y adheridas. El porcentaje de bacterias adheridas e invasoras se expresa relativo a la cepa control (*E. coli* pBBRIMCS ó *B. suis* según corresponda), a la cual se le asignó el 100%. Los datos fueron analizados por test de Student o ANOVA, según corresponda.

*, significativamente distinto del control ($p < 0.05$), con un intervalo de confianza del 95%.

Para confirmar el rol de BtaF en la adhesión a células epiteliales se realizó el mismo enfoque utilizando la línea epitelial obtenida de pulmón humano, A549. Similar a lo observado con células HeLa, *B. suis* $\Delta btaF$ mostró una disminución en la adhesión (del $69 \pm 9\%$) e invasión (del $68 \pm 16\%$) a A549 respecto a la cepa parental (Figura 54). No se observaron diferencias en la relación entre la adhesión e invasión a células de la línea A549 en las distintas cepas (Figura 54). Nuevamente, esta observación indica que la reducción en el porcentaje de bacterias invasoras sería una consecuencia de la menor adhesión. La mutante recuperó el fenotipo de la cepa silvestre al ser complementada con el plásmido pBBR*btaF*.

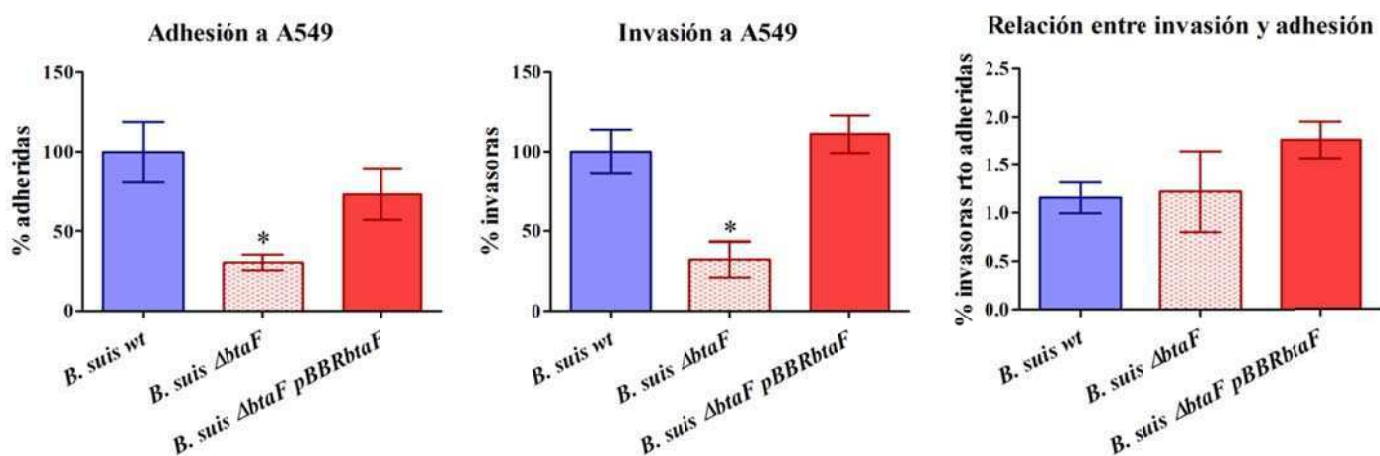


Figura 54. Adhesión e invasión a células epiteliales de pulmón, línea A549.

Se infectaron células A549 con *B. suis* wt, *B. suis* $\Delta btaF$ y *B. suis* $\Delta btaF$ pBBR*btaF* y, se determinaron los porcentajes de bacterias adheridas e invasoras y se analizó el porcentaje de bacterias invasoras respecto a las adheridas. El porcentaje de bacterias adheridas e invasoras se expresa relativo a la cepa parental, a la cual se le asignó el 100%. Los datos fueron analizados por ANOVA.

*, significativamente distinto del control ($p < 0.05$), con un intervalo de confianza del 95%.

Con el fin de evaluar el impacto de ambos autotransportadores triméricos en la adhesión a células de origen epitelial se repitió el mismo experimento de adhesión a células epiteliales pero incorporando al ensayo la mutante simple $\Delta btaE$ y la doble mutante $\Delta btaE \Delta btaF$. Curiosamente, la doble mutante mostró una reducción en la adhesión, similar a la observada en las simples mutantes, tanto al infectar células HeLa como A549 (Figura 55A y B, respectivamente). Nuevamente, la relación invasoras/adheridas de la doble mutante fue similar a la relación de la cepa silvestre. Estas observaciones sugieren que BtaE y BtaF tendrían un rol en la interacción de la bacteria a células no fagocíticas a través de la misma vía.

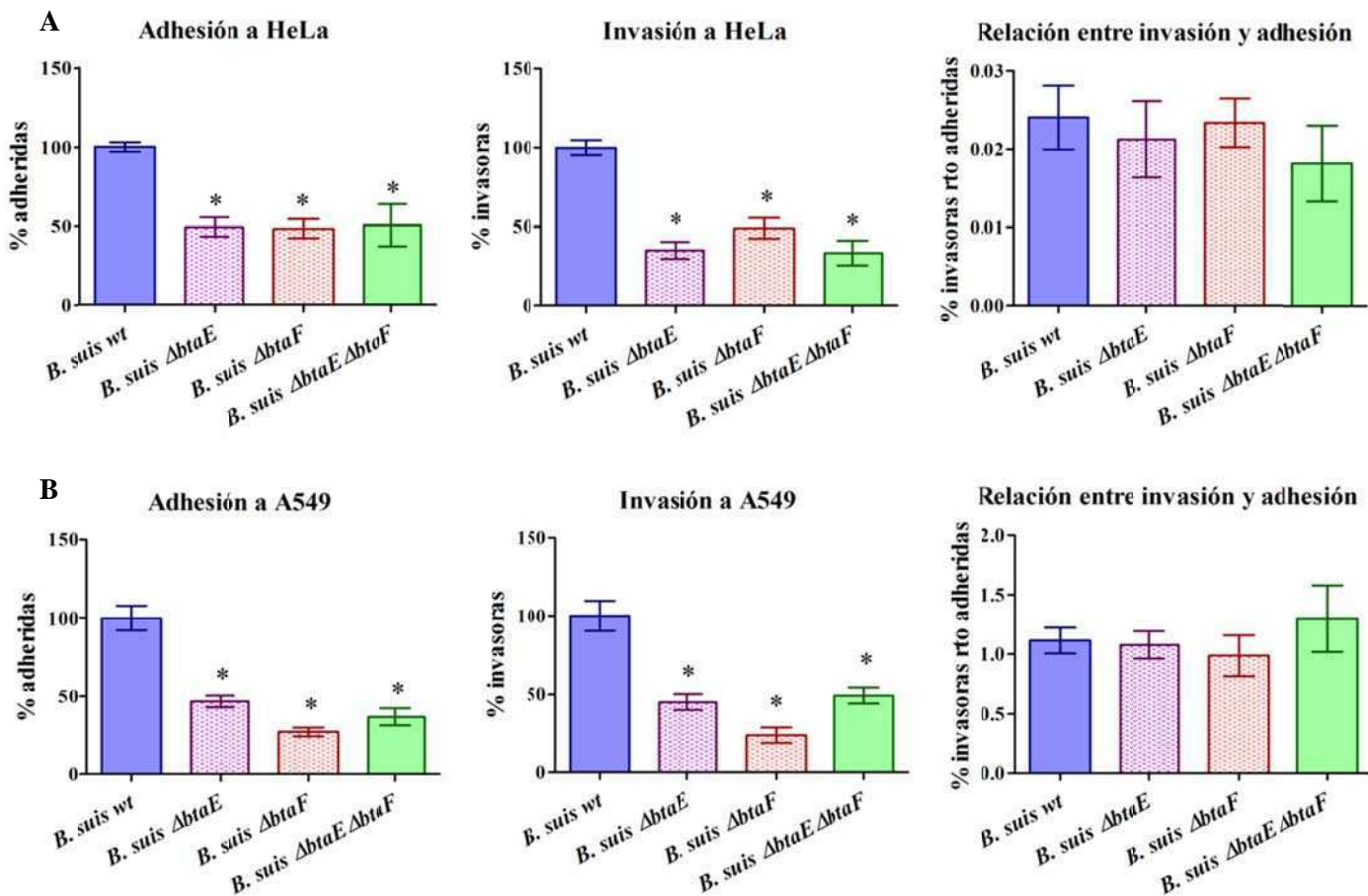


Figura 55. Adhesión e invasión a células HeLa y A549, de la doble mutante.

Se infectaron células (A) HeLa y (B) A549 con distintas cepas de *Brucella*: *B. suis* wt, *B. suis* $\Delta btaE$, *B. suis* $\Delta btaF$ y *B. suis* $\Delta btaE \Delta btaF$. Se determinaron los porcentajes de bacterias adheridas, invasoras, y la relación entre invasoras y adheridas. Los valores indicados como los porcentajes de bacterias adheridas e invasoras se expresan relativos a la cepa control (*B. suis* wt), a la cual se le asignó el 100%. Los datos fueron analizados por ANOVA.

*, significativamente distinto del control ($p < 0.05$), con un intervalo de confianza del 95%.

De la misma manera como se hizo para BtaE (sección I.9) se exploró la posibilidad que BtaF contribuya con la adhesión o invasión a fagocitos profesionales utilizando como modelo la línea J774 de macrófagos murinos. No se observaron diferencias en cuanto a la adhesión o invasión a estas células entre la cepa silvestre y la mutante en *btaF* (no se muestra). Como se describió, BtaE tampoco estaría involucrada en la adhesión ni invasión de macrófagos (sección I.9.). Con el fin de evaluar si ambas proteínas podrían tener funciones redundantes, se analizó el fenotipo de la doble mutante en macrófagos. Sin embargo, no se observaron diferencias entre la cepa silvestre y la doble mutante en la adhesión o invasión a estas células (no se muestra).

II.10. Replicación intracelular

Para evaluar la posibilidad que BtaF esté involucrada en la infección de células del hospedador en etapas posteriores a la adhesión e invasión, se analizó la replicación intracelular utilizando macrófagos murinos (línea J774) y HeLa. En ambos modelos, *B. suis* wt y *B. suis* $\Delta btaF$ presentaron la misma cinética de replicación intracelular (Figura 56A y B, respectivamente). Un resultado similar se había obtenido para la mutante *btaE* (sección I.10.). Se repitió el ensayo en HeLa incluyendo a la mutante $\Delta btaE$ y a la doble mutante. Sin embargo, tampoco se observaron diferencias significativas entre ninguna de las mutantes y la cepa parental (Figura 56C).

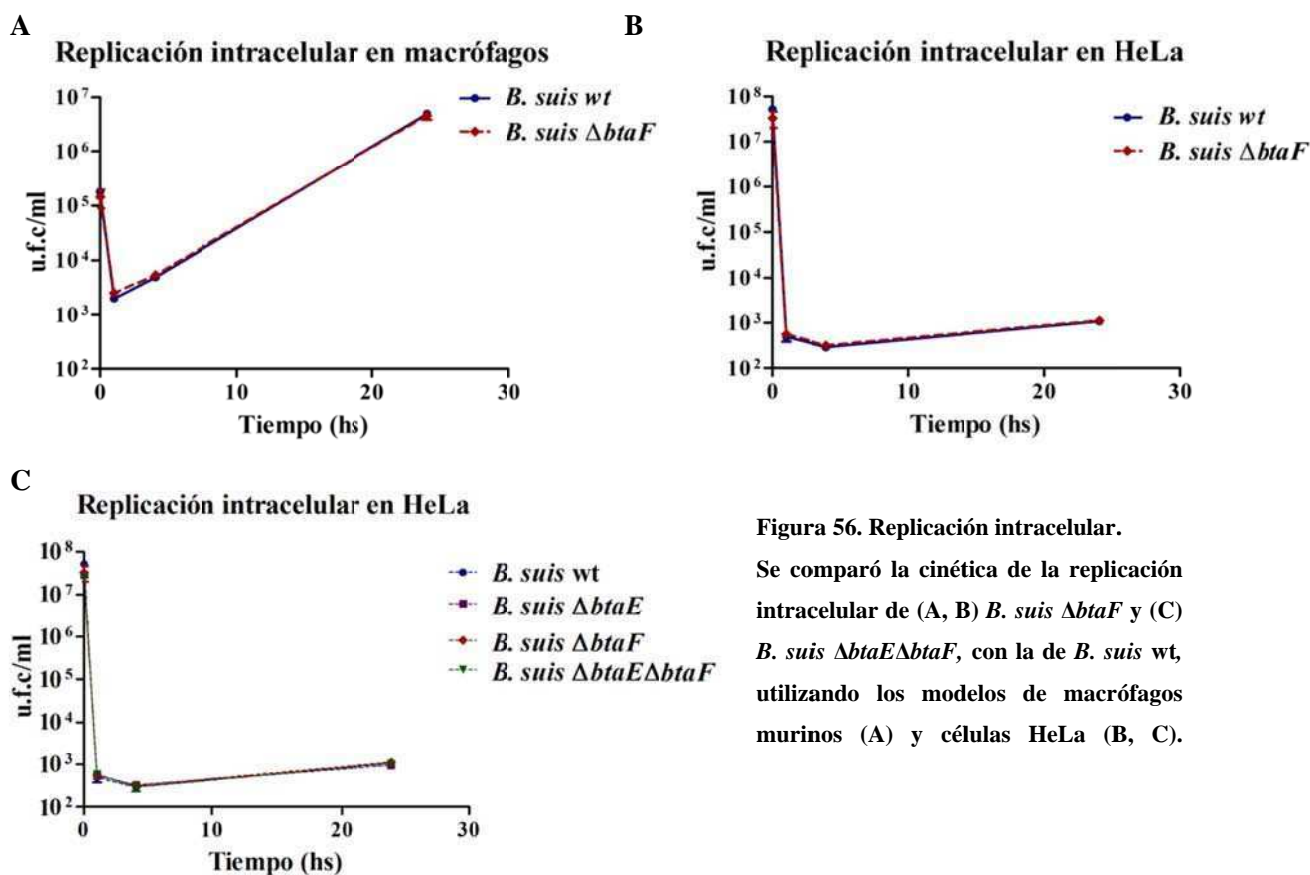


Figura 56. Replicación intracelular.

Se comparó la cinética de la replicación intracelular de (A, B) *B. suis* $\Delta btaF$ y (C) *B. suis* $\Delta btaE\Delta btaF$, con la de *B. suis* wt, utilizando los modelos de macrófagos murinos (A) y células HeLa (B, C).

Los resultados obtenidos refuerzan la hipótesis de que ni BtaE ni BtaF estarían involucradas en etapas tardías de la infección celular.

II.11. Localización de BtaF sobre la superficie

Con el fin de confirmar que BtaF se localiza sobre la superficie bacteriana se realizaron inmunofluorescencias utilizando como anticuerpo primario los anticuerpos policlonales anti-BtaF generados en ratón. Para ello, se cosecharon cultivos en fase exponencial de cepas de *B. suis* wt y

B. suis $\Delta btaF$ marcadas con GFP, cultivadas en TSB. Las células fueron fijadas con paraformaldehído y sin someterlas a un tratamiento de permeabilización se analizó la presencia de BtaF por inmunofluorescencia con anticuerpos anti-BtaF y microscopía confocal. En las condiciones del ensayo se pudo detectar a BtaF en un 3 a 4% de las bacterias examinadas. Para la cepa silvestre, en todos los casos ($n = 50$) la señal de BtaF (en rojo) mostró localización unipolar. En algunos casos la señal no se localizó exactamente en el centro del polo, sino que fue sub-polar (Figura 57A). Como se esperaba, no se detectó señal correspondiente a BtaF en *B. suis* $\Delta btaF$ (no se muestra). La señal unipolar se restauró en la cepa complementada con el plásmido pBBR*btaF* (no se muestra). Utilizando el mismo procedimiento se evaluó la localización superficial de BtaF en *E. coli* pBBR*btaF*. En este caso también se detectó señal correspondiente a BtaF en un muy bajo porcentaje de la población y en todos los casos se localizó unipolarmente (Figura 57B). Como se predecía, no se detectó señal en la cepa control (no se muestra).

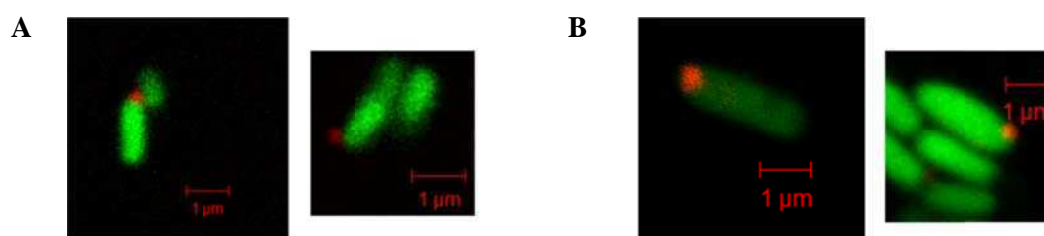


Figura 57. Localización superficial de BtaF en *B. suis* y *E. coli*.

Se cultivaron (A) *B. suis* wt y (B) *E. coli* pBBR*btaF* marcadas con GFP. Las células (sin permeabilizar) fueron analizadas por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-BtaF (rojo). Las muestras fueron observadas utilizando una lente plana-apocromática (100X/1.4 Oil DIC objective) en un microscopio confocal Pascal de Zeiss.

Estas observaciones indican por un lado, que BtaF se localiza sobre la superficie bacteriana y en particular lo hace de modo unipolar; por el otro, al igual que como se observó para BtaE (sección I.11.), BtaF se autotransporta correctamente a la superficie en el hospedador heterólogo, ubicándose también de manera unipolar. Esto sugiere que el mecanismo involucrado en la localización polar de los AT triméricos BtaE y BtaF está conservado en *B. suis* y *E. coli*.

De modo de poder determinar si al igual que ocurre con las adhesinas BmaC y BtaE, BtaF se localiza en un polo específico de la bacteria, se utilizó el mismo enfoque que en los casos de esas otras proteínas. Es decir, se realizaron inmunofluorescencias en cepas de *B. suis* transformadas con fusiones de PdhS y AidB a proteínas fluorescentes (como marcadores de polo viejo (41) y nuevo (42), respectivamente). De esta manera se observó que cada vez que se pudo detectar BtaF (en rojo) en bacterias que portan el marcador de polo viejo (PdhS-eGFP, en verde), BtaF se localizó en el polo opuesto a PdhS (27 casos; Figura 58A). En ningún caso se observó que BtaF y PdhS co-

localizaran. En cambio, al analizar la cepa que porta la fusión AidB-GFP (en verde), se observó que BtaF se localiza o bien en el mismo polo que el marcador (40 casos, Figura 58B) o en células en las que el marcador estaba difuso. En ningún caso se observó que BtaF se localice en el polo opuesto a AidB.

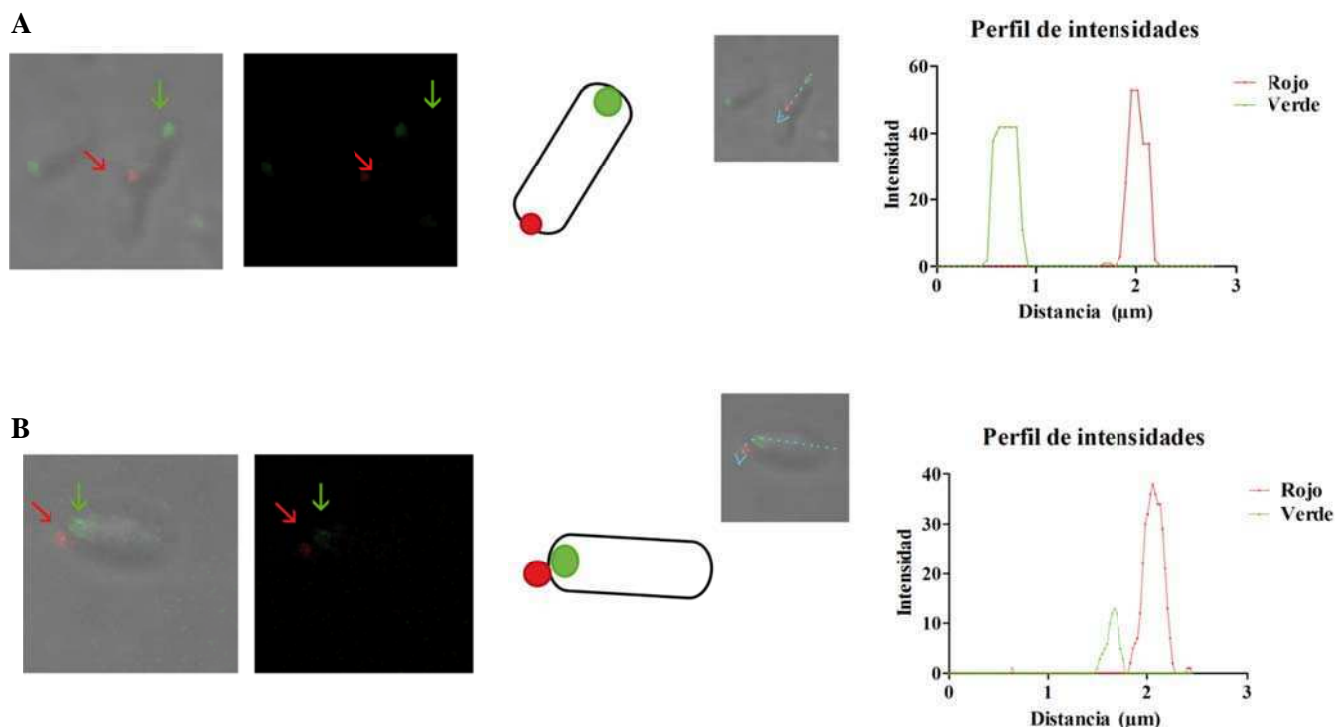


Figura 58. Localización de BtaF.

Se realizaron inmunofluorescencias con anticuerpos anti-BtaF en cultivos fijados (sin permeabilizar) de *B. suis* wt expresando (A) PdhS-eGFP, o (B) AidB-YFP. Se observó por contraste de fase la forma de las bacterias. Las células fueron observadas por microscopía confocal utilizando un microscopio LSM 510 Meta con lente Plana-apocromática (60Z/1.4 oil DIC objective). En las imágenes representativas se indican BtaF con flechas rojas, mientras que PdhS-eGFP y AidB-YFP se indican con flechas verdes. Además se muestra una representación esquemática y un perfil de intensidades de los distintos canales, construido sobre la línea punteada celeste que está presentada en la primer foto, expresado en unidades arbitrarias.

Estos resultados sugieren que al igual de lo observado para BmaC y BtaE, BtaF también se localiza en el polo nuevo de la bacteria.

II.12. Resistencia a suero

Como ya se mencionó en la Introducción (sección 3.2.a), algunos AT pueden cumplir funciones múltiples, contribuyendo, por ejemplo, a la resistencia al complemento presente en el suero del hospedador. Para evaluar la posibilidad de que BtaF esté involucrada en la tolerancia al complemento, se analizó la supervivencia de la cepa de *E. coli* que expresa BtaF en suero porcino

10% y se la comparó con la supervivencia de la cepa control. Sorprendentemente *E. coli* pBBR*btaF* mostró un importante incremento (de 10 veces) en el porcentaje de bacterias sobrevivientes comparado con la cepa control (Figura 59A). Para confirmar que la actividad bactericida del suero estuviera dada por el complemento, se realizó un control en el cual a cada cepa se la incubó con *buffer*, suero o suero calentado para inactivar el complemento. Aunque en distinta medida, tanto *E. coli* pBBR*btaF* como la cepa control mostraron una importante caída en el número de u.f.c viables al incubarla en suero en vez de en *buffer*. Sin embargo, al utilizar suero calentado se restauró la cantidad de bacterias viables (Figura 59B).

Se realizó un experimento similar al anterior, comparando la supervivencia de la mutante en *btaF* de *B. suis* con la cepa silvestre. Dado que *B. suis* es muy resistente a la actividad del complemento (sección 3.2.a. de la Introducción), el suero porcino fue diluido sólo al 50%, y las incubaciones duraron 90 minutos. En estas condiciones la cepa Δ *btaF* mostró una reducción significativa en la supervivencia (del $53 \pm 4\%$) comparada con la supervivencia de la cepa silvestre. La cepa complementada mostró niveles de supervivencia similares a los de la cepa silvestre (Figura 59C).

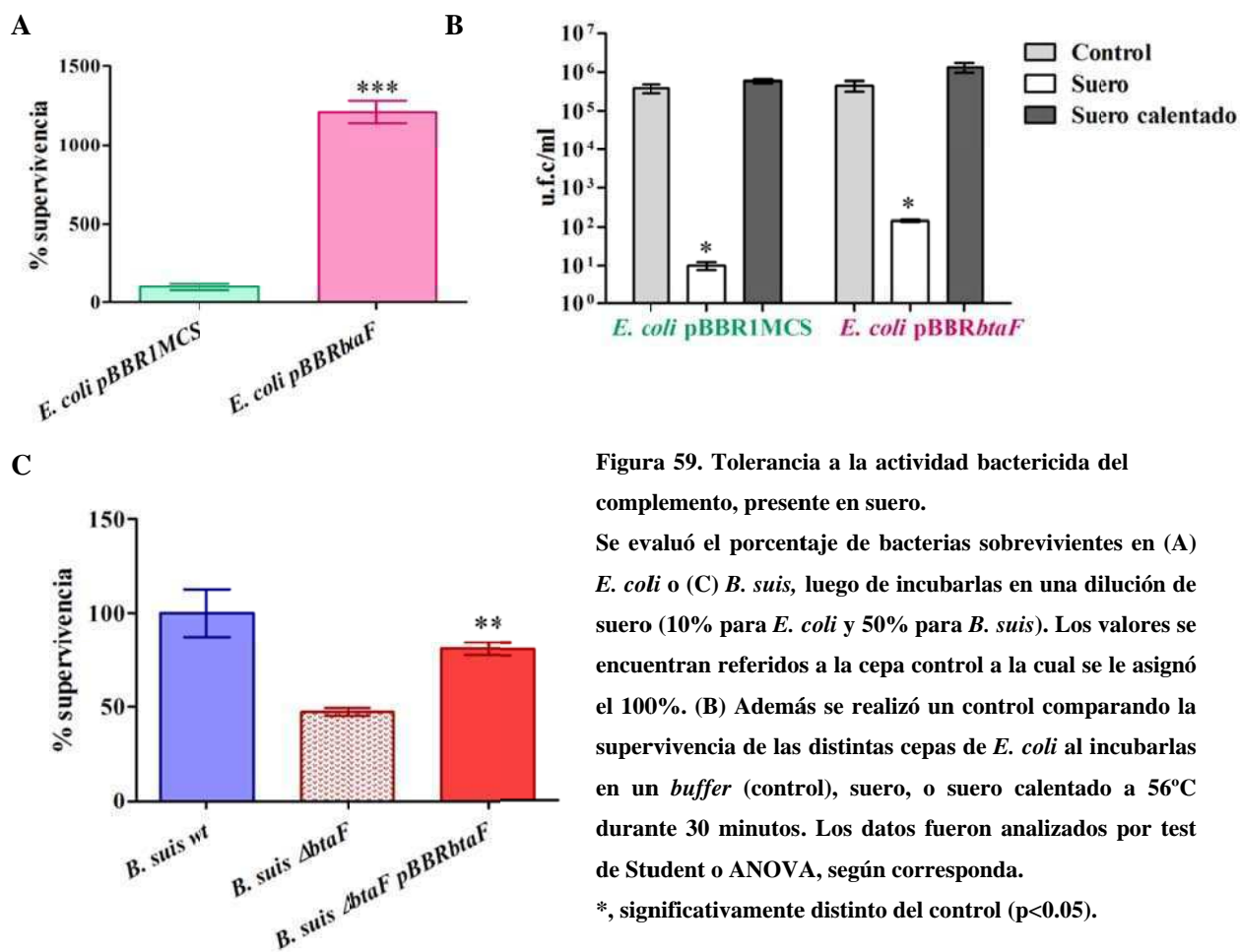


Figura 59. Tolerancia a la actividad bactericida del complemento, presente en suero.

Se evaluó el porcentaje de bacterias sobrevivientes en (A) *E. coli* o (C) *B. suis*, luego de incubarlas en una dilución de suero (10% para *E. coli* y 50% para *B. suis*). Los valores se encuentran referidos a la cepa control a la cual se le asignó el 100%. (B) Además se realizó un control comparando la supervivencia de las distintas cepas de *E. coli* al incubarlas en un *buffer* (control), suero, o suero calentado a 56°C durante 30 minutos. Los datos fueron analizados por test de Student o ANOVA, según corresponda.

*, significativamente distinto del control ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos sugieren que BtaF confiere a la bacteria que la porta, cierta tolerancia a la actividad bactericida del complemento presente en el suero.

II.13. Expresión *in vivo* de BtaF

Con el fin de determinar si BtaF se expresa *in vivo* en el hospedador natural, se analizó la presencia de anticuerpos capaces de reconocer a BtaF en sueros de 14 chanchos infectados con *B. suis* y 14 chanchos sanos, utilizando el mismo ensayo de ELISA indirecto realizado para BtaE (sección I.13.). El título de anticuerpos capaces de reconocer a BtaF fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en chanchos enfermos que en sanos (Figura 60A), incluso si se descarta al cerdo muy desviado con un alto título.

De manera preliminar se realizó el mismo análisis utilizando suero humano de un individuo sano y otro infectado con *B. suis*. La señal de anticuerpos anti-BtaF fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en el suero del paciente enfermo que en el del sano (Figura 60B).

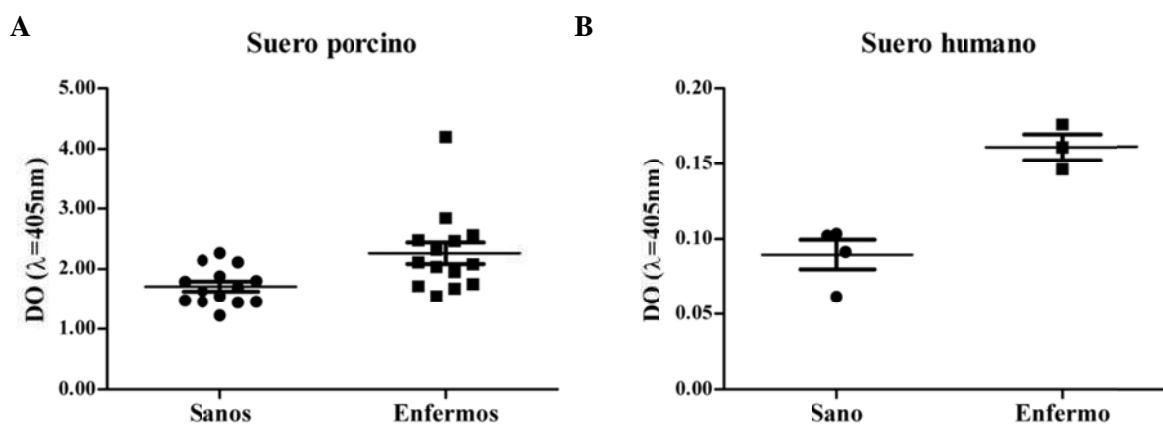


Figura 60. Anticuerpos anti-BtaF.

Se estudió la presencia de anticuerpos capaces de reconocer a BtaF en sueros provenientes de (A) porcinos y (B) humanos. En cada caso se comparó la señal de anticuerpos capaces de reconocer BtaF en sueros provenientes de individuos sanos o enfermos. Los ensayos realizados en porcinos fueron realizados dos veces, mientras que en el caso de los humanos se realizaron 4 repeticiones, en ambos casos por triplicado. Los datos fueron analizados por test Student, y en ambos hospedadores se vieron diferencias significativas ($p < 0.05$), las cuales no están indicadas en el gráfico por claridad.

Estos resultados sugieren: i) BtaF se expresaría *in vivo*, ii) la proteína sería antigénica y iii) BtaF induciría una respuesta humoral generando producción de anticuerpos.

II.14. Virulencia en ratones

Para evaluar la contribución de BtaF en la virulencia de *B. suis*, se evaluó el efecto de la delección de *btaF* sobre la virulencia en el modelo de ratón, en colaboración con la Dra. Silvia

Estein (U.N.C.PBA., Tandil, Buenos Aires, Argentina). Se inocularon los ratones intragástricamente con las cepas *B. suis* silvestre, la mutante en *btaF* y la cepa complementada (*B. suis* $\Delta btaF$ pBBR*btaF*). A los 7 días p.i la carga bacteriana en bazo de *B. suis* $\Delta btaF$ fue significativamente menor (en un 0.71 log) respecto a la cepa parental, mientras que la complementada mostró un recuento similar al medido para la cepa silvestre (Figura 61A). A los 30 días p.i. la reducción en la infección de la mutante también fue significativamente menor al observado para la cepa silvestre (en 1.22 log), y la cepa complementada recuperó el fenotipo de la cepa silvestre (Figura 61B).

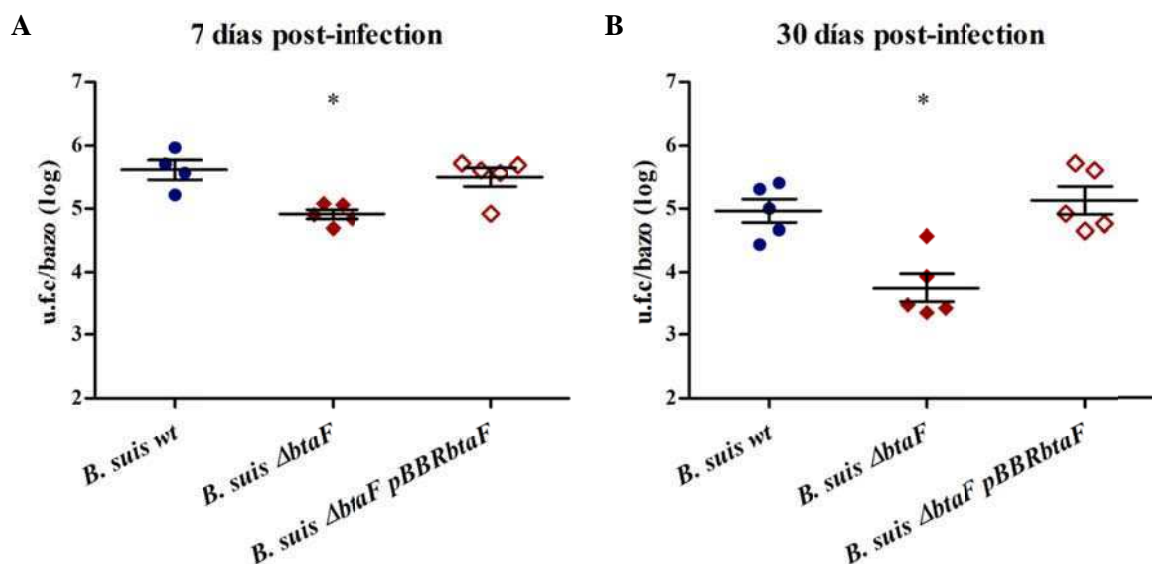


Figura 61. Rol de BtaF en la virulencia de *B. suis*.

Se inocularon intragástricamente ratones BALB/c (10 ratones por grupo) con: *B. suis*, *B. suis* $\Delta btaF$ o la cepa complementada (*B. suis* $\Delta btaF$ pBBR*btaF*). Cinco ratones de cada grupo fueron sacrificados a los (A) 7 y (B) 30 días p.i.. Se determinó la cantidad de bacterias en el bazo. Se plaquearon diluciones del homogenato de bazo por duplicado y se determinaron las u.f.c. Los resultados se expresan como el valor \log_{10} por bazo y se evaluaron mediante ANOVA.

*, significativamente distinto a la cepa silvestre ($p < 0.05$)

Estos resultados indican que, al igual que como se describió para BtaE (sección I.14.), se necesita de BtaF para que *B. suis* presente una virulencia completa en ratones infectados por la vía intragástrica, tanto en etapas tempranas como tardías de la infección.

Al incluir en el experimento además de la simple mutante $\Delta btaF$, a la mutante $\Delta btaE$ y a la doble mutante $\Delta btaE \Delta btaF$; como se esperaba, a los 7 días p.i. tanto las simples mutantes como la doble mutante presentaron una reducción significativa en la infección del bazo respecto a la cepa wt (de 0.81, 0.71 y 1.9 log, respectivamente; ver figura 62A). Interesantemente, la reducción de la

doble mutante fue además significativa respecto a las simples mutantes (Figura 62A). A los 30 días p.i., las simples mutantes presentaron una reducción en la infección de bazo significativa con respecto a la cepa silvestre (de 1.1 y 1.21 log respectivamente), al igual que la doble mutante (1.56 log, ver Figura 62B). Si bien a los 30 días p.i. el recuento de bacterias en bazo de ratones infectados con la doble mutante fue menor que el de las simples mutantes (Figura 62B), esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Esta falta de validez estadística en la diferencia del recuento a los 30 días entre las simples y la doble mutante probablemente se deba a la alta dispersión de los datos correspondientes a la doble mutante.

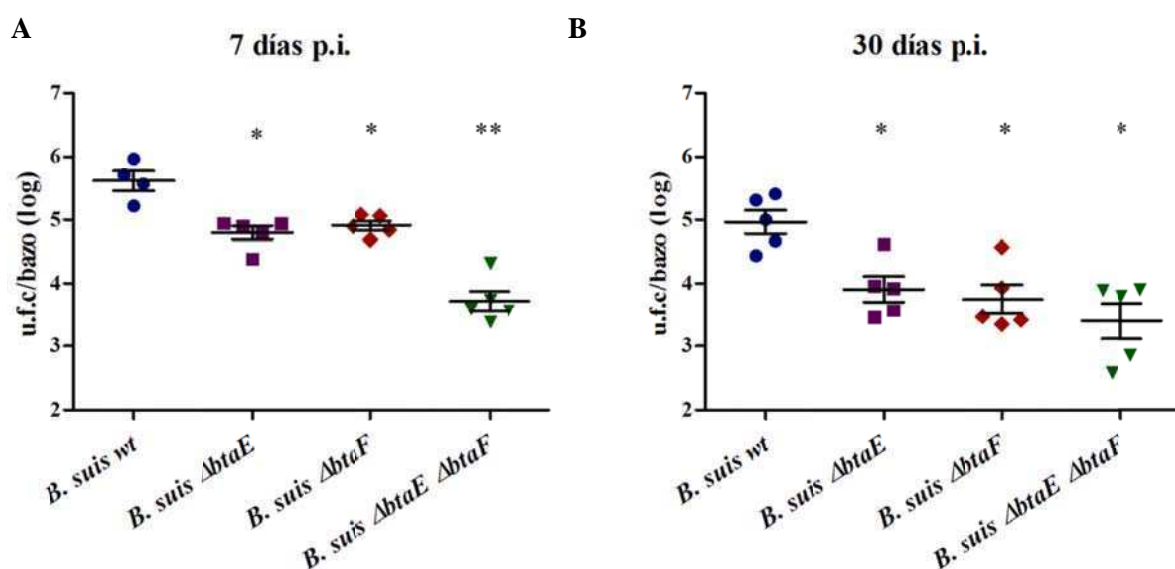


Figura 62. Fenotipo de la doble mutante $\Delta btaE \Delta btaF$.

Se inocularon intragastricamente ratones BALB/c (10 ratones por grupo) con: *B. suis*, *B. suis* $\Delta btaE$, *B. suis* $\Delta btaF$ y la doble mutante (*B. suis* $\Delta btaE \Delta btaF$). Cinco ratones de cada grupo fueron sacrificados a los (A) 7 y (B) 30 días p.i.. Se determinó la cantidad de bacterias en el bazo. Para ello se plaquearon diluciones del homogenato de bazo por duplicado, y se determinaron las u.f.c. Los resultados se expresan como el valor log₁₀ por bazo; y se evaluaron mediante ANOVA.

*, significativamente distinto a la cepa silvestre ($p < 0.05$)

** , significativamente distinto a la cepa silvestre y a las simples mutantes ($p < 0.01$)

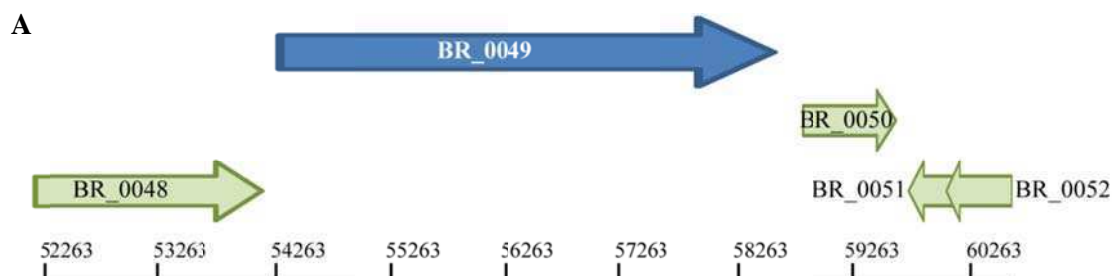
Estos resultados indican que tanto BtaE como BtaF son necesarias para que *B. suis* tenga una virulencia completa en ratones infectados intragástricamente. El fenotipo más atenuado de la doble mutante en comparación con el fenotipo de las simples mutantes sugiere que algunas funciones *in vivo* de las adhesinas serían complementarias o tendrían un efecto aditivo.

Capítulo III: Caracterización de BR_0049

III.1. Análisis de bioinformático de BR_0049

El locus BR_0049 se localiza en el cromosoma I de *B. suis* 1330 entre las posiciones 54264 y 58811, tiene una longitud de 4548 pb y codifica una proteína de 1515 aminoácidos cuyo peso molecular estimado es de 156.6 kDa. La proteína se encuentra anotada como “proteína hipotética conservada”. Río arriba del gen se ubica BR_0048 (Figura 63A), el cual codifica otra proteína conservada hipotética. Predicciones bioinformáticas sugieren que BR_0048 sería una proteína de membrana externa. Además, uno de sus dos dominios (Bac_surface_Ag) está asociado al ensamblado de membrana externa bacteriano y al ensamblado de membrana externa de la mitocondria en eucariotas (SSDB Motif search). Río abajo se ubica el gen BR_0050, el cual codificaría una lipoproteína de la envoltura celular. Río debajo de BR_0050 y en sentido divergente, se encuentran los genes BR_0051 y BR_0052 que codifican proteínas hipotéticas sin función predicha.

Dado que en la búsqueda inicial de putativas adhesinas, esta proteína se agrupó con los AT tipo II (Figura 10, capítulo I de Resultados), se esperaba que perteneciera a la misma familia. Sin embargo, el análisis de la secuencia no mostró la presencia de una secuencia señal característica del sistema Sec (311); tampoco se identificó el dominio C-terminal translocador. Por lo tanto, BR_0049 no pertenece a la familia de los AT. Además, no se identificaron dominios conservados de función conocida. En el C-terminal, entre los aminoácidos 1160 y 1515, se identificó un dominio conservado pero de función desconocida denominado DUF490 (PF04357). Además entre los aminoácidos 581 a 583 se identificó un motivo RGD, el cual se suele asociar a adhesinas bacterianas (Figura 63B).



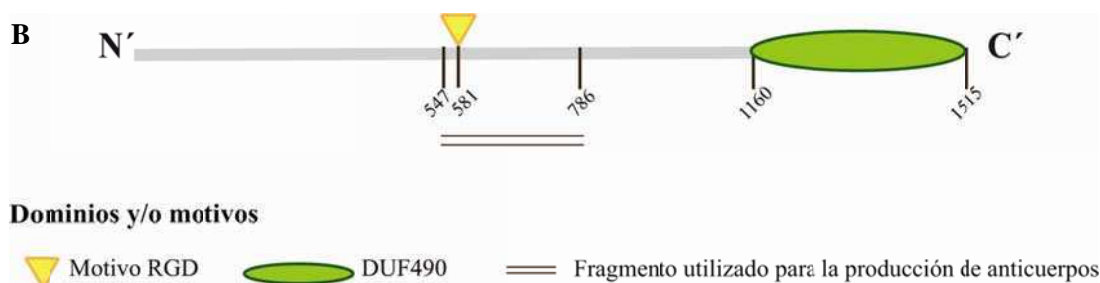


Figura 63. Entorno genético de BR_0049 y dominios de la proteína

(A) Entorno genético de BR_0049, construido en función al gráfico obtenido de TIGR CMR.

(B) Esquema de la proteína codificada por BR_0049; se indican los dominios y motivos que se pueden reconocer a partir del análisis de secuencia.

El análisis de la secuencia de BR_0049, utilizando PRED-TAT predice que la proteína tendría una secuencia señal con sitio de clivaje entre los aminoácidos alanina y treonina de las posiciones 25 y 26, respectivamente, que podría ser reconocida por el sistema TAT. Esto sugiere que la proteína podría ser translocada a través de la membrana interna por este sistema y que por lo tanto podría tener una ubicación en la envoltura celular. Por otro lado, las predicciones de localización sub-celular utilizando diferentes aplicaciones arrojaron distintos resultados sugiriendo que podría ser una proteína citoplasmática (Gneg-PLoc (280)), de membrana externa (SOSUI-GramN (282) y CELLO v.2.5 (283)), e inclusive extracelular (MetaLocGramN (281)). Incluso el análisis por PSORTb (284) sugirió que la proteína podría ser tanto extracelular como de membrana externa. Por otra parte, las predicciones de segmentos transmembrana fueron contradictorias. Algunas aplicaciones predijeron que la proteína no contendría dominios transmembrana (“DAS” (*Transmembrane prediction server*) (287) y TMHMM Server v. 2.0 (285)), mientras que otras sugieren que contendría un dominio transmembrana (SACS MEMSAT (288) y TMPred (286)) e incluso una de ellas predice que se trataría de una hélice transmembrana (entre los aminoácidos 1162 a 1186, TMPred). Por lo tanto, aunque no se puede predecir con confianza la localización de BR_0049, podría tratarse de una proteína de membrana.

Por otro lado, se realizó una búsqueda de genes ortólogos en otras cepas y especies del género *Brucella*. Como se puede observar en la Tabla 17, los ortólogos están muy conservados tanto entre cepas como entre especies. Fuera del género *Brucella*, se identificó una proteína ortóloga de *Ochrobactrum* (el género filogenéticamente más cercano a *Brucella*) con una identidad mayor al 80%. Según KEGG, los ortólogos que siguen en identidad pertenecen a *Chelativorans* sp. BNC1 y *Pelagibacterium halotolerans* (con identidades de 48.0 y 42.3 %, respectivamente). Ambas especies también pertenecen al orden *Rhizobiales*.

| Cepa | Locus | Longitud (aa) | % Identidad |
|----------------------------|---------------|---------------|-------------|
| <i>B. suis</i> 1330 | BR_0049 | 1515 | 100 |
| <i>B. suis</i> VBI22 | BSVBI22_A0049 | 1515 | 100 |
| <i>B. suis</i> 686 | EEY33618 | 1553 | 97.4 |
| <i>B. abortus</i> 2308 | BAB1_0046 | 1515 | 99.7 |
| <i>B. abortus</i> S19 | BAbS19_I00440 | 1579 | 99.7 |
| <i>B. melitensis</i> 16M | BMEI1894 | 1551 | 99.6 |
| <i>B. canis</i> ATCC 23365 | BCAN_A0050 | 1579 | 99.9 |
| <i>B. microti</i> | BMI_I52 | 1515 | 99.9 |
| <i>B. pinnipedialis</i> | BPI_I50 | 1515 | 99.9 |
| <i>B. ovis</i> ATCC 25840 | BOV_0048 | 1510 | 99.3 |
| <i>B. neotomae</i> | WP_004687837 | 1553 | 99.9 |

Tabla 17 Ortólogos de la proteína codificada por BR_0049 en distintas cepas y especies del género *Brucella*.

En cada caso se indica: el nombre del locus, la cantidad de aminoácidos de la proteína y la identidad con respecto a la proteína de *B. suis* 1330.

Si bien la proteína codificada por BR_0049 está anotada como una proteína conservada de función hipotética, los ortólogos en *B. abortus* S19 (BAbS19_I00440) y *B. melitensis* (BMEI1894) se encuentran anotados como putativas *gramicidin S biosynthesis grsT proteins*. Cabe destacar que la identidad de estos ortólogos con respecto a la proteína de *B. suis* 1330 es del 99.7 y 99.6%, respectivamente. La enzima GRST está involucrada en la síntesis de gramicidina S y actúa como hidrolasa sobre uniones éster; particularmente es una *thioester hydrolase (oleoyl-[acyl-carrier-protein] hydrolase)*. Sin embargo el porcentaje de similitud entre BR_0049 y sus ortólogos con la *gramicidin S biosynthesis grsT protein* de *Brevibacillus brevis* (312) es solo del 7.2%. Por otro lado, el alineamiento de secuencias indica que la similitud con GRST se encuentra con el fragmento comprendido entre los aminoácidos 1125 y 1515 de BR_0049.

Por BLASTp o PSI-BLAST, además de proteínas hipotéticas anotadas como “*Gramicidin S biosynthesis GRST protein*” se encontró similitud de BR_0049 con BH00460 de *Bartonella henselae* Houston-1, anotada como una proteína que interviene en la “Biosíntesis y degradación de polisacáridos de superficie y lipopolisacáridos”, dentro de la clasificación de JCVI *Cellular Role Category*. Al realizar un alineamiento global entre la proteína codificada por BR_0049 y ésta proteína de 1548 aminoácidos se obtuvo una identidad del 37% (559/1524) y una similitud del 55% (848/1524). BR_0049 también presentó homología con RL4382 (2033 aminoácidos) de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841, que está anotada como un posible factor de adhesión del tipo filamentoso (*filamentous hemagglutinin adherence factor*). Al realizar un alineamiento global entre la proteína codificada por BR_0049 y RL4382 se obtuvo una identidad del 32% (351/1086) y una

similitud del 48% (529/1086). También se obtuvo cierta similitud con SMC03096 de *Sinorhizobium meliloti* 1021, una proteína de 1869 aminoácidos, cuya función hipotética propuesta es la unión y transporte de aminoácidos, péptidos y aminos. Esta proteína alineó con distintas regiones de BR_0049, que se describen en la Tabla 18.

| Región <i>B. suis</i> | Región <i>S. meliloti</i> | Identidad | Similitud |
|-----------------------|---------------------------|---------------|---------------|
| 1-295 | 47-334 | 26% (78/302) | 47% (142/302) |
| 337-938 | 237-926 | 23% (163/709) | 38% (271/709) |
| 975-1515 | 1333-1869 | 38% (206/546) | 57% (316/546) |

Tabla 18. Alineamiento global entre las proteínas codificadas por BR_0049 de *B. suis* y SMC03096 de *S. meliloti*. El alineamiento global entre ambas proteínas da lugar a tres alineamientos significativos. Para cada uno de ellos se indican los aminoácidos alineados de cada especie (Región *B. suis*/*S. meliloti*), la identidad y similitud observadas en dicho alineamiento

Mediante el uso del Meta Server se comparó la estructura predicha de la proteína con las estructuras de proteínas depositadas en distintas bases de datos. Este análisis indicó similitud con dos estructuras: 1yq2_A (en la región de BR_0049 comprendida entre los aminoácidos 1280 y 1515) y 2vzo_A (en la región 1286-1515 de BR_0049). La estructura 1yq2_A corresponde a una β galactosidasa que forma hexámeros de *Arthrobacter spp.* la cual es activa en frío (313). Esta enzima pertenece a la familia 2 de las glicosil hidrolasas, similar a la β galactosidasa de *E. coli*, la cual requiere de la formación de tetrámeros para ser activa (313). Por otro lado, la estructura 2vzo_A pertenece a una exo- β -D-glucosaminidasa involucrada en la hidrólisis de chitosán de *Amycolatopsis orientalis* (314). Esta enzima también pertenece a la familia 2 de las glicosil hidrolasas (314).

En resumen, los análisis *in silico* descritos sugieren que BR_0049 podría ser una proteína de membrana externa con una función en la biosíntesis de algún componente de membrana formado por lípidos y/o azúcares. En función de los resultados que se describirán a continuación, BR_0049 fue nombrada MapA (por *membrane altering protein*).

III.2. Obtención de la cepa de *B. suis* mutante *mapA* y su complementada

A partir del ADN genómico de *B. suis* 1330 se amplificó un fragmento de 300 pb río arriba de *mapA* y un fragmento de 400 pb río abajo del gen. Ambos productos de PCR fueron ligados entre sí y el producto ligado (de aproximadamente 700 pb) fue amplificado mediante PCR (Figura 64A) y luego clonado en el vector pk18mobsacB, obteniéndose el plásmido p Δ *mapA*. La construcción se confirmó mediante *colony*-PCR, digestión del plásmido (Figura 64B) y por secuenciación. Luego de transferir el plásmido a *B. suis* se aislaron los clones dobles recombinantes

en medio selectivo. Las mutantes se confirmaron mediante *colony*-PCR (Figura 64C), como se explica en Materiales y Métodos. Se eligió al clon 9 para los siguientes estudios.

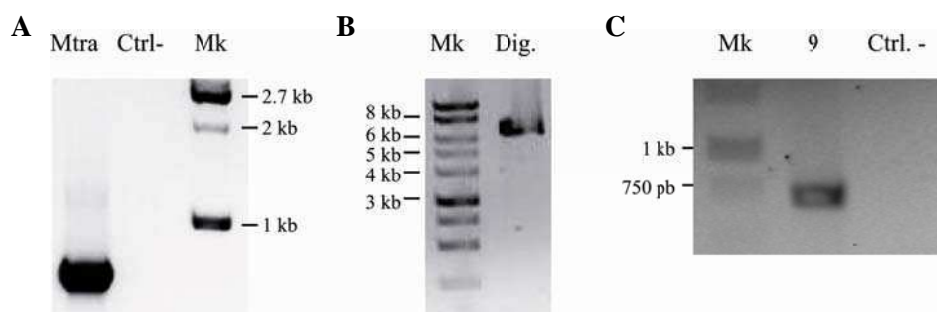


Figura 64. Obtención de *B. suis* $\Delta mapA$

Se amplificó una región río arriba de *mapA* y otra región río abajo, las cuales se ligaron entre sí; obteniendo un producto de aproximadamente 700 pb. (A) Esta construcción fue amplificada mediante PCR, y luego clonada en el vector pK18mobsacB obteniéndose el plásmido p $\Delta mapA$. Se confirmó el correcto ensamblado del plásmido mediante *colony*-PCR, secuenciación y digestión del plásmido. (B) Al digerirlo con la enzima EcoRI se obtuvo la banda esperada de aproximadamente 6.7 kb. Finalmente *B. suis* fue transformada con este plásmido. Se confirmó mediante *colony*-PCR que el clon 9 tuviera *mapA* deletado. (C) Éste clon presentó el gen *mapA* deletado. En cambio, al utilizar un par de oligos que amplifica una banda únicamente en presencia de la versión silvestre del gen, ésta no pudo ser amplificada a partir del clon 9 pero sí a partir de la cepa silvestre (no se muestra). En todos los casos Mk corresponde al marcador de peso molecular, y Ctrl al control.

Con el fin de complementar la mutante, el gen *mapA* completo fue clonado en el vector pBBR1MCS. Para ello se amplificó a partir de ADN genómico de *B. suis* 1330 un fragmento de 5.2 kb correspondiente a *mapA* y sus regiones flanqueantes. El producto de la PCR fue clonado en el vector pBBR1MCS, generando el plásmido pBBR*mapA*, cuyo correcto ensamblado se confirmó por *colony*-PCR y digestión del plásmido (Figura 65A). Se electroporó *B. suis* $\Delta mapA$ con dicho plásmido y mediante *colony*-PCR se confirmó la presencia de las versiones deletada (Figura 65B) y silvestre del gen (no se muestra).

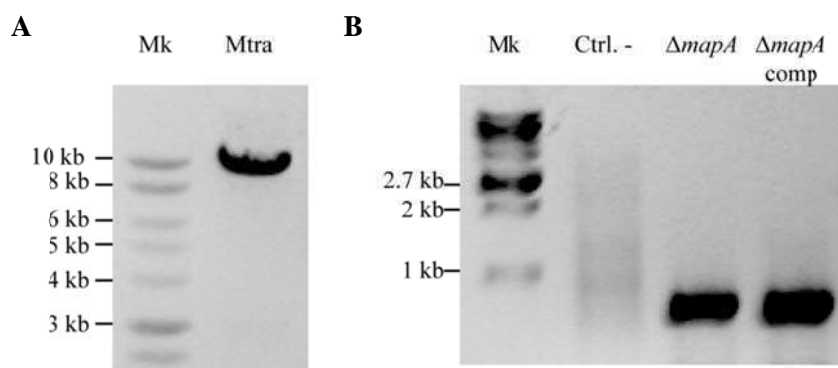


Figura 65. Obtención de *B. suis* $\Delta mapA$ pBBR*mapA*

A partir del ADN genómico se amplificó *mapA* junto con sus regiones flanqueantes y se lo clonó en el vector pBBR1MCS obteniéndose el plásmido pBBR*mapA*. Se confirmó el correcto ensamblado mediante

colony-PCR y digestión con la enzima de restricción KpnI. (A) Como producto de la digestión del plásmido se obtuvo una única banda de aproximadamente 10 kb. Por otro lado se confirmó mediante secuenciación del inserto, que éste no tuviera errores en su secuencia. Finalmente el plásmido se introdujo en *B. suis* $\Delta mapA$. Se confirmó mediante *colony*-PCR que la cepa complementada tuviera tanto (B) la versión deletcionada del gen, como la silvestre provista por el plásmido (no se muestra).

Se analizó la expresión de *mapA* por RT-PCR a partir de ARN extraído de cultivos en TSB de *B. suis*. En estas condiciones se obtuvo una banda amplificada correspondiente a *mapA* tanto en la cepa silvestre como en la complementada ($\Delta mapA$ comp), mientras que dicha banda no estuvo presente en la mutante (Figura 66). Esto sugiere que el gen *mapA* se expresa *in vitro* en las condiciones ensayadas.

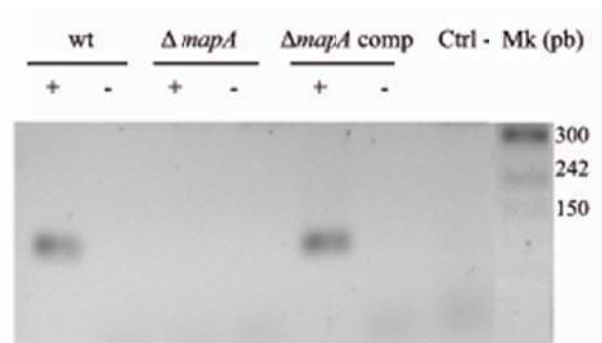


Figura 66. RT-PCR

Se extrajo el ARN de cultivos en TSB de las cepas silvestre (wt), *B. suis* $\Delta mapA$ y *B. suis* $\Delta mapA$ pBBR*mapA* ($\Delta mapA$ comp). El ADN se eliminó por tratamiento con ADNasa y luego se sintetizó el ADNc. A modo de control para cada cepa la reacción de síntesis de ADNc se realizó por duplicado, en presencia (+) o ausencia (-) de la retrotranscriptasa seguida de la reacción de PCR.

III.3. Obtención de anticuerpos policlonales anti-MapA

Con el fin de obtener anticuerpos anti-MapA, se amplificó un fragmento del gen de 720 pb (región subrayada en la figura 63) a partir del ADN genómico de *B. suis* 1330 (Figura 67A). El producto de PCR fue clonado en el vector pET22, obteniéndose el plásmido pAcMapA. La construcción se confirmó por análisis de restricción, *colony*-PCR (Figura 67B) y secuenciación del inserto. El plásmido pAcMapA fue transferido a *E. coli* BL21 y la expresión del péptido se indujo en presencia de 50 μ M, 0.4 mM y 1 mM de IPTG (Figura 67C). La mayor inducción se observó en presencia de 1 mM IPTG. El péptido se encontró principalmente en la fracción citoplasmática (Figura 67D). La identidad del péptido de MapA se confirmó por *Western blot* utilizando anticuerpos anti-HisTag (Figura 67E).

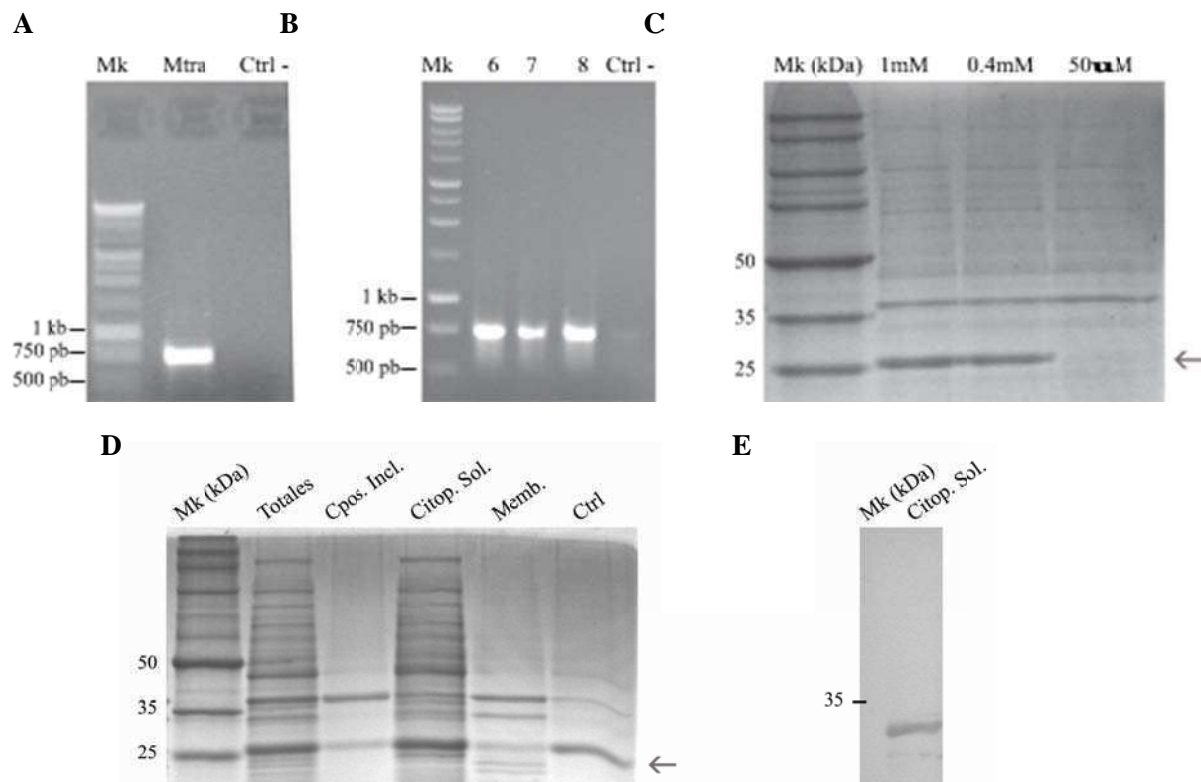


Figura 67. Construcción de pAcMapA y puesta a punto de la inducción del péptido derivado de MapA.

(A) Se amplificó a partir de ADN genómico de *B. suis* 1330 una porción del gen *mapA* y se lo clonó en el vector pET 22. Luego la construcción se confirmó por (B) *colony*-PCR, y secuenciación. Una vez obtenido el plásmido pAcMapA, se transformó *E. coli* BL21 y (C) se evaluó la expresión del péptido, de aproximadamente 25 kDa, a distintas concentraciones de IPTG. (D) Se determinó la localización sub-celular del péptido derivado de MapA, y se confirmó (E) que la banda inducida correspondiera al péptido de interés mediante *Western blot*, aprovechando que el péptido tiene fusionado en su C-terminal un HisTag.

El péptido se purificó mediante HPLC utilizando una columna de níquel (IMAC). Las proteínas de las distintas fracciones se analizaron por SDS-PAGE. El péptido de 25 kDa se encontró principalmente en las fracciones G4 y G5 (indicado con una flecha en la figura 68). La identidad del péptido se confirmó mediante *Western blot* (no se muestra). Luego se mezclaron dichas fracciones y se las sometió a cromatografía en columna S-75. El paso por la columna S-75 no contribuyó a la purificación del péptido. Se decidió seguir con una estrategia similar a la utilizada en el caso del péptido derivado de BtaF: se separaron las proteínas de las fracciones en las que el péptido derivado de MapA era mayoritario mediante SDS-PAGE en un gel de calles anchas y se cortó la porción del gel correspondiente a dicho péptido. Esta fracción de gel fue liofilizada, y conservada a -20°C . Al momento de ser utilizada se resuspendió la cantidad necesaria en PBS

estéril. Esta preparación se utilizó para inocular ratones y generar anticuerpos policlonales como se describe en “Materiales y Métodos”.

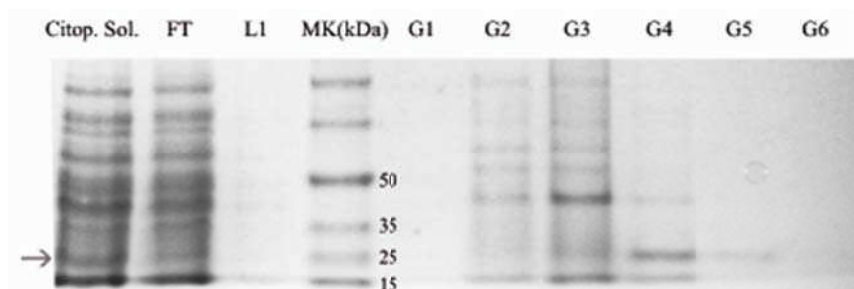


Figura 68. Purificación del péptido derivado de MapA.

Se utilizó una columna de níquel para purificar el péptido a partir de la fracción citoplasmática soluble, el cual se obtuvo como proteína mayoritaria en las fracciones G4 y G5. Luego se separaron las fracciones en un gel de calle ancha y se cortó la porción del gel correspondiente al péptido de interés (no se muestra).

Con el fin de evaluar la especificidad y eficiencia de los anticuerpos anti-MapA, así como la expresión de MapA *in vitro*, las proteínas totales provenientes de bacterias cultivadas en TSB de la cepa silvestre y la mutante $\Delta mapA$ fueron analizadas por *Western blot* utilizando dichos anticuerpos en una dilución 1:8.000. Aunque los anticuerpos parecen reconocer inespecíficamente otras proteínas, en la cepa silvestre se observó una señal correspondiente a una proteína de 150 kDa que correspondería a MapA, la cual estuvo ausente en la cepa mutante (Figura 69, banda indicada con una flecha). Con el fin de obtener una mejor aproximación en cuanto a la localización de la proteína se analizaron las fracciones citoplasmática y de membranas totales tanto de la mutante como de la cepa silvestre. Nuevamente, se observaron varias bandas inespecíficas pero en el caso de la cepa silvestre (y no en la mutante) se obtuvo una señal tenue de una proteína de aproximadamente 150 kDa en la fracción de membranas totales, que estuvo ausente en la fracción citoplasmática (no se muestra). Aunque estas observaciones son preliminares, los resultados obtenidos sugieren que MapA podría ser una proteína de membrana que se expresa en las condiciones de cultivo ensayadas.

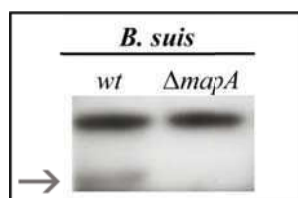


Figura 69. Western blot a partir de proteínas totales de Brucella.

Se obtuvieron proteínas totales de *B. suis* (wt) y *B. suis* $\Delta mapA$ ($\Delta mapA$), las cuales fueron sometidas a *Western blot* utilizando anticuerpos policlonales anti-MapA.

III.4. Análisis de fenotipos asociados a la envoltura celular

Para evaluar la posibilidad que *B. suis* $\Delta mapA$ hubiera sufrido cambios en el antígeno O de su LPS debido a un proceso de disociación, se realizó el control en acriflavina como se describió previamente (secciones I.6 de resultados y 14.1 de Materiales y Métodos). A modo de control se incluyeron *B. suis* silvestre (cepa lisa) y *B. ovis* (cepa rugosa). Como se puede observar en la figura 70, *B. suis* $\Delta mapA$ se comportó como una cepa lisa, al igual que su cepa parental. Este resultado sugiere que no habría alteraciones en el antígeno O del LPS de *B. suis* $\Delta mapA$.

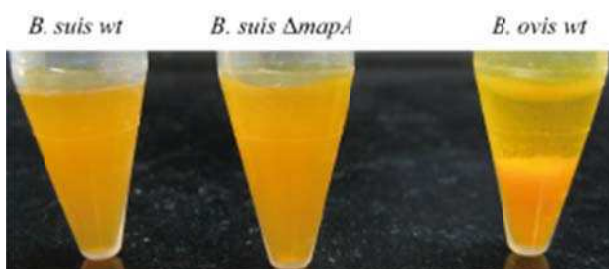
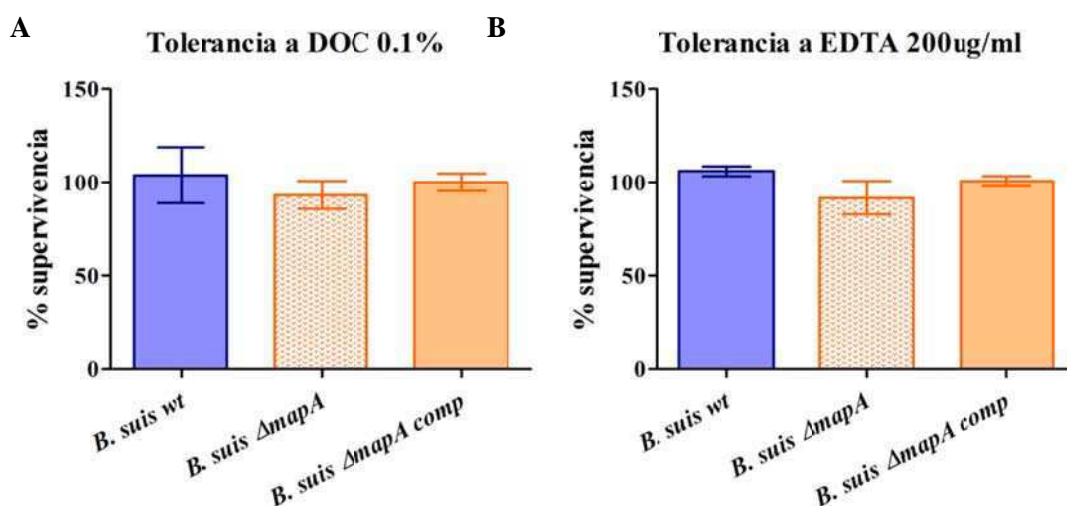


Figura 70. Evaluación de disociación.

Se realizó una suspensión de colonias de *B. suis* wt (control de cepa lisa), *B. ovis* (control de cepa rugosa) y *B. suis* $\Delta mapA$ en acriflavina 0.1 % p/v. Tanto *B. suis* wt como *B. suis* $\Delta mapA$ se emulsionaron fácilmente, mientras que *B. ovis* formó rápidamente un precipitado.

Por otra parte, se evaluó la tolerancia a distintos compuestos. Se comparó la supervivencia de ambas cepas, *B. suis* $\Delta mapA$ y silvestre, luego de ser incubadas con: DOC 0.1%, EDTA 200 μ g/ml, Tritón X-100 0.1%, SDS 0.01%. No se detectaron diferencias significativas en la tolerancia de ambas cepas a DOC, EDTA ni SDS (Figura 71A-C, respectivamente). Sin embargo, la mutante presentó una disminución significativa (del 90%) en la supervivencia en Tritón X-100 0.1% (Figura 71D), la cual se revirtió en la cepa complementada.



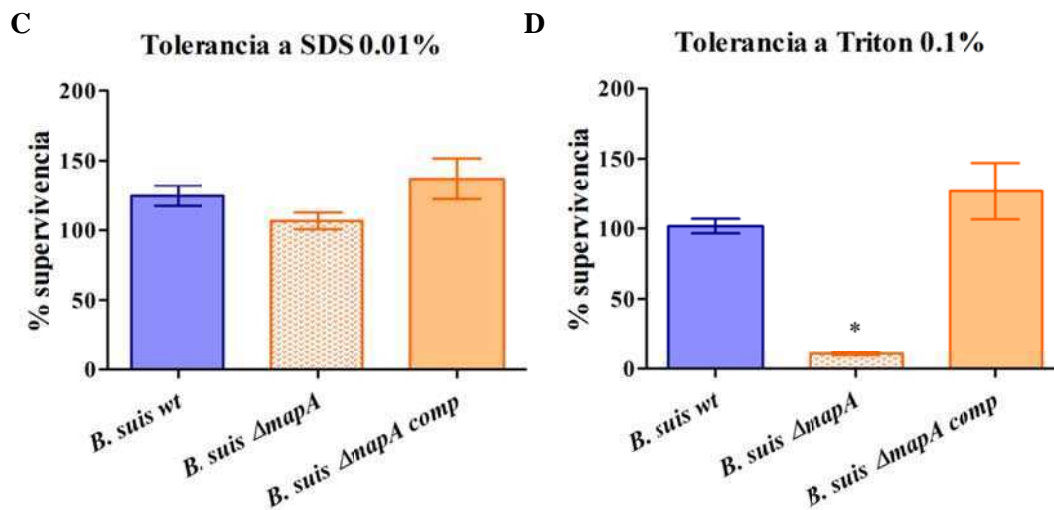


Figura 71. Tolerancia de *B. suis ΔmapA* a DOC, EDTA, SDS y Tritón X-100

A modo de analizar el estado de la envoltura de la mutante *mapA* se comparó la tolerancia de *B. suis ΔmapA*, *B. suis wt* y la complementada a: (A) DOC 0.1%, (B) EDTA 200 $\mu\text{g/ml}$, (C) SDS 0.01% y (D) Tritón X-100 0.1%. En todos los casos se graficó el porcentaje de u.f.c obtenidas luego de la incubación con cada uno de los compuestos, en relación a la cepa silvestre a la cual se le asignó el valor 100%. Los resultados que se muestran corresponden a un experimento representativo de tres realizados por triplicado. Los datos fueron analizados mediante el análisis ANOVA ($p > 0.05$).

*, significativamente distinto al control ($p < 0.05$), con 95% de confianza

Como se describió previamente, *Brucella* es particularmente resistente a polimixinas y polimixina B (sección 2.2.a de la Introducción). Se evaluó la tolerancia a distintas concentraciones de polimixina B, incluyendo a *B. abortus wt* y *E. coli* como un control adicional de cepa tolerante y un control de cepa sensible, respectivamente. La mutante *mapA* presentó una mayor sensibilidad respecto a la cepa silvestre a las distintas concentraciones de polimixina B (Figura 72). Como se esperaba, la cepa complementada mostró un fenotipo restaurado.

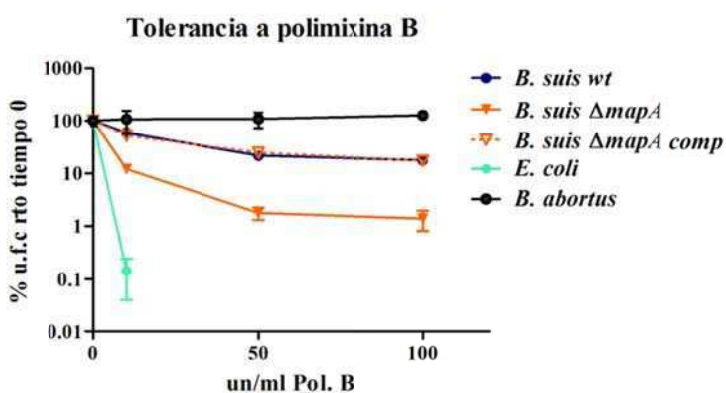


Figura 72. Tolerancia a polimixina B.

Se incubaron *B. suis wt*, *B. suis ΔmapA*, *B. suis ΔmapA comp*, *E. coli* (como control de cepa sensible) y *B. abortus* (como control adicional de cepa resistente) a distintas concentraciones de polimixina B. Para cada cepa y concentración utilizadas, se determinó el porcentaje de u.f.c, adjudicando el valor de 100% a la incubación sin polimixina B. Los resultados que se muestran corresponden a un experimento representativo de tres realizados por triplicado.

El fenotipo de sensibilidad a tritón y polimixina B de $\Delta mapA$ sugieren que la membrana externa podría estar alterada y como consecuencia presentaría mayor permeabilidad a determinados compuestos. Para evaluar esta posibilidad se analizó la sensibilidad de la mutante a lisozima (295). Las diferencias más notables entre *B. suis* $\Delta mapA$ y la cepa parental se observaron cuando los cultivos se encontraban en fase exponencial a una DO_{600nm} de aproximadamente 0.3. En estas condiciones la cepa silvestre no fue afectada por la presencia de lisozima, en cambio la mutante se lisó muy rápidamente (Figura 73).

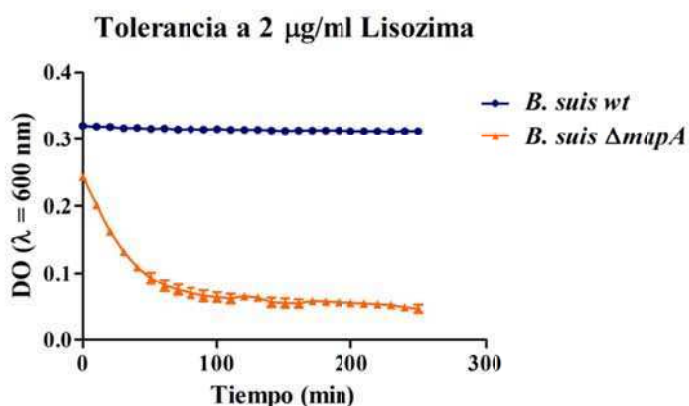


Figura 73. Evaluación de la sensibilidad a lisozima.

Se comparó la tolerancia de la cepa mutante en *mapA* y la cepa silvestre a 2 μ g/ml de Lisozima. Los resultados que se muestran corresponden a un experimento representativo de tres realizados por duplicado.

La rápida lisis celular de la mutante en presencia a lisozima indica que la mutante *mapA* es lo que se denomina una cepa hiperpermeable. Por otro lado, la mayor sensibilidad de $\Delta mapA$ al Tritón, polimixina B y lisozima sugiere que la membrana externa de la mutante se encuentra alterada. Es por eso que la proteína codificada por el BR_0049 fue denominada MapA (por *membrane altering protein*). A pesar de las diferencias en su envoltura, la curva de crecimiento en TSB de la mutante *mapA* no presentó diferencias con la correspondiente a la cepa salvaje (no se muestra), es decir que su capacidad de replicación en medio rico no se encuentra afectada.

Dado que la mutante $\Delta mapA$ tendría una superficie celular alterada, se intentó determinar si estas diferencias son visibles por microscopia de barrido electrónico. Sin embargo, la resolución de las imágenes no fue lo suficientemente alta como para observar detalles de la superficie bacteriana (no se muestra).

III.5. Autoagregación y formación de *biofilms*

La alteración de la superficie de la mutante $\Delta mapA$ podría resultar en un cambio en la autoagregación bacteriana. Sin embargo, no se detectaron diferencias en la cinética de autoagregación de *B. suis* $\Delta mapA$; comparada con la cepa silvestre (Figura 74).

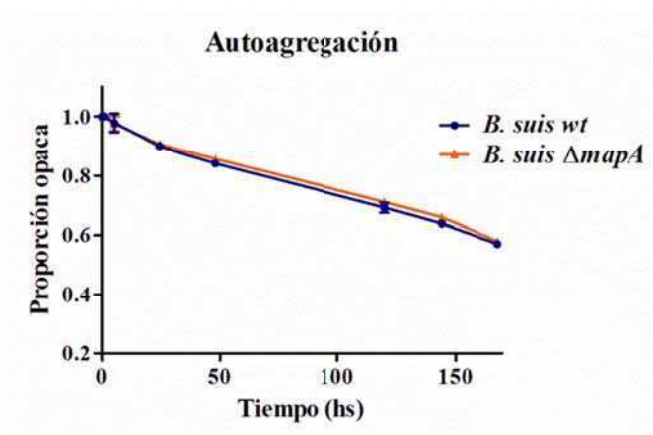


Figura 74. Autoagregación bacteriana. Se analizó la cinética de autoagregación de *B. suis ΔmapA* y la cepa silvestre. Los resultados que se muestran corresponden a un experimento representativo de tres realizados por duplicado.

Como se mencionó anteriormente, el estudio de la formación de *biofilm* involucra entre otros conceptos la adhesión de la bacteria a la superficie sobre la cual se forma y la interacción entre bacterias. Al evaluar la capacidad de formación de *biofilm* sobre una superficie abiótica hidrofóbica de *B. suis ΔmapA* y la cepa parental, no se observaron diferencias entre las cepas (Figura 75).

Formación de *biofilm* sobre soporte hidrofóbico

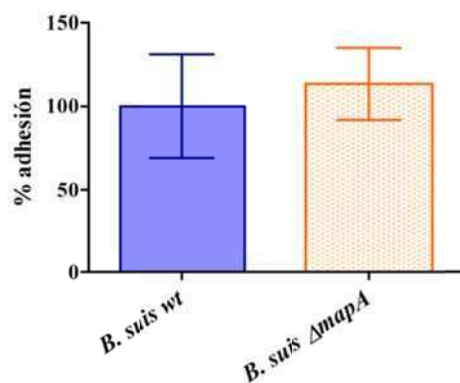


Figura 75. Formación de *biofilm* sobre soporte abióticos.

Se analizó la capacidad de formar *biofilm* sobre poliestireno de *B. suis* y *B. suis ΔmapA*. Los valores corresponden al porcentaje de biomasa adherida, referidos a la cepa parental a la cual se le asignó el valor de 100%. Los resultados que se muestran corresponden a un experimento representativo de tres realizados por octuplicado. Los datos fueron analizados por Test de Student.

*, significativamente distinto al control ($p < 0.05$), con 95% de confianza

Estas observaciones sugieren que, al menos en las condiciones ensayadas, MapA no participaría en la interacción entre bacterias así como tampoco en la interacción de la bacteria con soportes abióticos.

III.6. Adhesión e invasión a células epiteliales

En los ensayos descritos de adhesión e invasión a células, luego de la infección, las células eucariotas se lisan con Tritón X-100 0.1% para luego cuantificar las bacterias por recuento de colonias. Dado que la mutante defectiva en MapA es sensible a este detergente (Figura 71D), no es posible utilizarlo para lisar las células. Por lo tanto, se decidió efectuar la lisis de las células

eucariotas con DOC 0.1% ya que como se mostró previamente, la mutante no presenta diferencias en su tolerancia a este detergente respecto a la cepa parental (Figura 71A). La infección de HeLa por *B. suis* $\Delta mapA$ presentó una reducción en el porcentaje de bacterias asociadas de aproximadamente el 50%, con respecto a la cepa parental (Figura 76), mientras que la cepa complementada mostró un fenotipo restaurado.

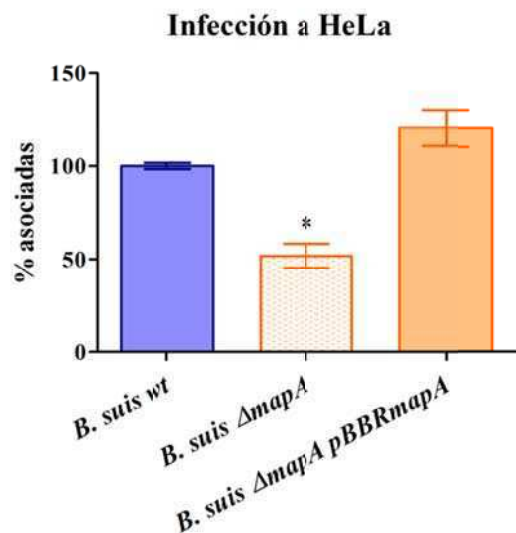


Figura 76. Infección a células HeLa.

Se infectaron células HeLa con *B. suis* wt, *B. suis* $\Delta mapA$ y *B. suis* $\Delta mapA$ pBBRmapA. Se determinó el porcentaje de bacterias totales asociadas (tanto adheridas como invasoras) una hora p.i., el cual se expresa relativo a la cepa control (*B. suis* wt), a la cual se le asignó el 100%. Los datos fueron analizados por ANOVA. Los resultados que se muestran corresponden a un experimento representativo de dos realizados por triplicado.

*, significativamente distinto del control ($p < 0.05$), con un intervalo de confianza del 95%.

Aunque se observa que a tiempos cortos la mutante tiene una menor capacidad de interaccionar con células HeLa comparada con la cepa silvestre, este fenotipo podría deberse a un efecto pleiotrópico de la delección de *mapA* que afecte de manera indirecta factores involucrados en la adhesión e invasión a dichas células.

III.7. Replicación intracelular

Para evaluar la posibilidad que la delección de *mapA* afecte etapas más tardías de la infección, se evaluó la capacidad de la mutante de replicar en macrófagos comparándola con la capacidad de las cepas parental y complementada. El recuento intracelular de la mutante desde tiempos muy cortos estuvo reducido en comparación con el de la cepa silvestre. Sin embargo, la cinética de ambas cepas fue similar (Figura 77). La cepa complementada recuperó el fenotipo de la cepa parental. Esta observación sugiere que MapA podría ser necesaria para la invasión (o infección inicial) a macrófagos pero no se requeriría para la replicación de *B. suis* en el interior del macrófago. Sin embargo, se requieren enfoques experimentales adicionales para confirmar esta hipótesis.

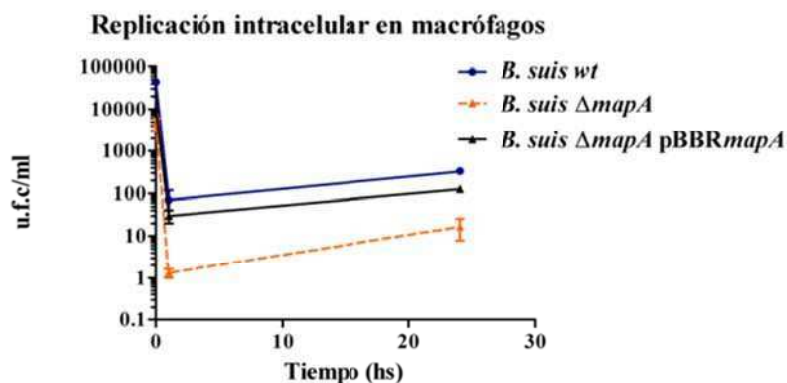


Figura 77. Replicación intracelular

Se midió el número de u.f.c recuperadas de macrófagos murinos infectados a 0, 1, y 24 horas p.i.. Los resultados que se muestran corresponden a un experimento representativo de dos realizados por triplicado.

Conclusiones. Los primeros estudios realizados sobre MapA sugieren que se trataría de una proteína de membrana (externa probablemente) que cumpliría algún rol en la biogénesis de la envoltura celular. La mayor sensibilidad de la mutante defectiva en MapA tanto a Tritón X-100 como a polimixina B y lisozima, el entorno genético y los análisis *in silico* sugieren que MapA podría estar involucrada en la biosíntesis o modificación de algún lípido particular de la membrana de *Brucella*, que como se describió (sección 2 de la Introducción) podría contribuir con el carácter furtivo y resistente de este patógeno. Por otra parte, estudios preliminares sugieren que la actividad de MapA podría ser necesaria para la invasión de la bacteria a macrófagos, lo cual podría estar relacionado con la interacción de la membrana externa bacteriana con componentes de la membrana celular del macrófago.

Discusión

Para los patógenos microbianos, la adhesión a las células del hospedador es un paso clave en la infección, lo cual se refleja por las múltiples adhesinas expresadas en varias bacterias patógenas. Las distintas adhesinas pueden actuar sinérgicamente, reforzando su capacidad adhesiva, o pueden tener funciones con cierto grado de superposición o complementariedad. Las especies pertenecientes al género *Brucella* son patógenos intracelulares facultativos capaces de infectar una gran variedad de tipos celulares (315); por lo tanto, la bacteria debe ser capaz de adherirse e invadir estas células. Su capacidad de replicar intracelularmente se basa en una estrategia única en la que *Brucella* modifica el proceso de maduración de los fagosomas, creando un nuevo nicho intracelular en el que se multiplica (122, 123, 133).

A pesar de la relevancia de la adhesión en la interacción con el hospedador, el impacto de esta etapa en la patogénesis de *Brucella* ha sido poco explorado. Al momento de iniciar la tesis se había identificado en *Brucella* una proteína de membrana externa llamada SP41, la cual contribuiría a la adhesión e invasión a las células del hospedador mediante la interacción con un receptor celular que contendría residuos de ácido siálico (208). Otras evidencias del mismo grupo mostraron que *Brucella* sería capaz de unirse a componentes de la ECM, particularmente a fibronectina y en menor medida a colágeno y vitronectina (253). Además, se había observado que al entrar en contacto con la superficie de células epiteliales, *Brucella* se acumula formando microcolonias. Por último, se había demostrado que el autotransportador monomérico y posible adhesina OmaA sería importante durante la etapa crónica de la infección en ratones inoculados mediante inyecciones intraperitoneales (261). Sin embargo, los autores no demostraron que la proteína funcionara como adhesina.

Durante el transcurso de ésta tesis caracterizamos a la adhesina BmaC (262), perteneciente a la familia de los AT monoméricos y de localización unipolar. Mostramos que BmaC media la unión de *Brucella* a células epiteliales a través de su interacción con fibronectina (262). Por otro lado, recientemente se reportó que una isla de patogenicidad que incluye cuatro genes, contribuye con la eficiencia de adhesión de *B. abortus* tanto a células HeLa como a macrófagos J774. Se propuso que la proteína responsable estaría codificada por Bab1_2009, y contendría un dominio de adhesión llamado *immunoglobulin-like BID_1* (254).

En base a una búsqueda bioinformática en el genoma de *B. suis* 1330 se identificaron 11 proteínas que podrían cumplir un rol de adhesina ya que presentaban algún dominio asociado a la adhesión. El árbol filogenético construido con estas proteínas las agrupó en 4 grupos: los grupos 1

y 2 se encontraron más cercanos entre sí que con los demás. El grupo 1 estuvo formado por los AT monoméricos BmaC, BRA_0173 y BR_2013 (OmaA), mientras que el grupo 2 comprendió a los AT triméricos BtaE, BtaF y un tercer miembro al que hemos denominado MapA. En el marco de esta tesis se han estudiado los tres candidatos pertenecientes al grupo 2.

Funciones de BtaE y BtaF

BtaE es una proteína compuesta por 740 aminoácidos, en cuyo dominio pasajero se pudieron identificar dominios asociados a adhesinas e invasinas bacterianas. En cambio, BtaF es una proteína mucho más pequeña, de tan solo 278 aminoácidos, en cuyo dominio pasajero no se identificaron dominios ni motivos conservados. Las predicciones respecto a la estructura de BtaE sugieren que el trímero tendría la clásica estructura tipo chupetín, compuesta por un cuello, conector y cabeza, además del dominio de anclaje a membrana. En cambio, para BtaF no fue posible predecir dominios correspondientes al conector ni tampoco a la cabeza. De todos modos, BtaF no sería el primer AT II en el cual no se pueden predecir conector ni cabeza. Por ejemplo, para HadA de *Haemophilus influenzae* (biogrupo *aegyptius*) tampoco es posible predecir la presencia de una estructura tipo cabeza (296) y sin embargo, fue funcional al expresarla en una cepa de *E. coli* (296). De la misma manera, se ha observado que algunas de las funciones adhesivas del TA trimérico BadA de *Bartonella henselae* son independientes de la presencia de la cabeza (316).

Con el fin de caracterizar las distintas proteínas, se emplearon dos estrategias: por un lado se estudiaron las mutantes por delección de cada uno de los genes y por otro lado se realizaron ensayos de expresión heteróloga. A modo de control de las cepas mutantes, se realizó un análisis de fenotipos asociados a la envoltura celular. Los resultados obtenidos sugieren que las mutantes no presentan una envoltura celular afectada.

Al evaluar mediante el enfoque heterólogo la capacidad de autoagregar en cultivos *in vitro* de las cepas de *E. coli* que expresan *btaE* o *btaF*, no se observaron diferencias con respecto a la cepa control. Tampoco se detectaron diferencias en la cinética de autoagregación de las simples mutantes con respecto a *B. suis* silvestre. Sin embargo al evaluar la doble mutante se observó que a tiempos tardíos (a partir de los dos días) existiría una disminución leve pero significativa en la velocidad de autoagregación. Este resultado sugiere que BtaE y BtaF podrían compartir funciones redundantes relacionadas con la autoagregación. Sin embargo, dado que estas diferencias se observan a tiempos muy prolongados, no se espera que esto pudiera afectar la rápida formación de microcolonias observada sobre células epiteliales (253).

En cuanto a la formación de *biofilms*, los resultados obtenidos, tanto por ensayos heterólogos como mutacionales, indican que BtaE no estaría involucrada en su formación. En cambio, los mismos enfoques indican que BtaF contribuye a la formación de *biofilms in vitro* sobre soporte hidrofóbico. Como se mencionó previamente, el desarrollo de *biofilms* depende tanto de la adhesión inicial bacteriana a la superficie, así como también de interacciones bacteria-bacteria. Dado que BtaF parece no tener un rol crucial en la autoagregación o interacciones célula-célula, el rol de BtaF en la formación de *biofilm* estaría relacionado con la adhesión a la superficie abiótica. Se ha sugerido que la formación de *biofilms* podría evitar la desecación de las bacterias que sobreviven fuera del hospedador por cortos periodos (317). De hecho, en la naturaleza, la persistencia de las bacterias en determinados nichos muchas veces se asocia con la formación de *biofilms*. Incluso recientemente se ha propuesto que *B. abortus* bajo determinadas condiciones ambientales, produce una matriz extracelular que confiere propiedades de adhesión y resistencia a stress (318). Por último, la capacidad de desarrollar microcolonias o un *biofilm* sobre la superficie del hospedador podría influenciar la invasión celular.

Al momento de iniciar este trabajo existían evidencias que sugerían que *Brucella* sería capaz de unirse a componentes de la matriz extracelular, en particular a fibronectina y también a residuos ricos en ácido siálico (253). Por consiguiente, se evaluó mediante distintas estrategias si las adhesinas estarían involucradas en la adhesión a distintos compuestos de la ECM, como fibronectina, colágeno y AH o fetuína (por ser rica en ácido siálico). Los resultados presentados en esta tesis indican que BtaE estaría involucrada en la adhesión a AH y sugieren que también podría contribuir con la adhesión a fibronectina. En este caso, la ausencia de un fenotipo defectivo de la mutante en su adhesión a fibronectina, se explicaría por redundancia de función con otras adhesinas como BmaC (262). Por otro lado, las observaciones descritas sugieren que BtaF sería un adhesina mas promiscua con capacidad de unirse a colágeno, AH, fetuína, fibronectina y superficies abióticas hidrofóbicas. La capacidad de BtaF de mediar la unión de la bacteria a colágeno podría ser relevante ya que es una proteína abundante en la ECM de la mayoría de los tejidos (319, 320). De manera similar, el AH es otro de los componentes más abundantes de la ECM de muchos tejidos, entre ellos, el tejido articular (típicamente infectado por *B. suis*), epitelial (tejido que la bacteria debe penetrar para poder iniciar la infección), tejido conectivo, cartílagos, tendones y también se encuentra en abundancia en el gel intestinal. La interacción de bacterias patógenas con AH ya ha sido reportada previamente. Por ejemplo, el AH está implicado en la adhesión de *Mycobacterium tuberculosis* a epitelio pulmonar (321), en la adhesión de *Plasmodium falciparum* (protozoo) a eritrocitos (322) y en la invasión de *Escherichia coli* al tracto urinario (323).

Es interesante mencionar que para el AT trimérico BadA de *B. henselae* (una especie filogenéticamente cercana a *Brucella*) existen distintas variantes que se diferencian en la cantidad de repeticiones correspondientes al cuello. Se ha propuesto que a mayor cantidad de segmentos correspondientes al cuello, mayor es la afinidad de la variante de BadA a distintos ligandos (316). Cabe recordar que para BadA, tal como ocurre con BtaF, tampoco fue posible predecir dominios tipo conector o cabeza.

Por otro lado, se presentaron evidencias que indican que tanto BtaE como BtaF serían necesarias para una adhesión eficiente a células de origen epitelial (HeLa y A549). Lo interesante de A549 es que se acerca al tipo de células a las que *Brucella* podría adherirse al inicio de la infección. Al utilizar ambas líneas celulares, la mutante en *btaE* presentó un menor porcentaje de células adheridas e invasoras respecto a la cepa parental. Sin embargo el porcentaje de bacterias invasoras respecto a las adheridas, fue similar. Esto sugiere que dado que la mutante en *btaE* presenta una menor capacidad de adhesión a las células *in vitro*, es menor la cantidad de bacterias que tienen la posibilidad de invadir las células. Como consecuencia, la mutante presenta una menor cantidad de bacterias invasoras a pesar de no tener afectada su capacidad de invadir.

Interesantemente, el AH compitió con la adhesión de *Brucella* a HeLa mientras que casi no tuvo un efecto en la mutante $\Delta btaE$. Es posible que BtaE medie la adhesión a células, al menos en parte, a través del AH celular. Sin embargo, son necesarios otros estudios para evaluar esta posibilidad. En cuanto a los ensayos heterólogos, la expresión de *btaE* no afectó la capacidad de adhesión ni invasión de la cepa de *E. coli*. Esto sugiere que para conferir la capacidad de adhesión a HeLa, BtaE necesita de otros componentes de *Brucella* que no se encuentran en *E. coli*.

Similar a lo ocurrido con BtaE, la mutante en *btaF* presentó una menor capacidad de adhesión a ambas líneas de origen epitelial, mientras que la capacidad de invasión no fue afectada. El hecho de que las simples mutantes *btaE* y *btaF* de *B. suis* presenten una menor adhesión a células indica que las funciones de las proteínas en cuanto a la adhesión no serían (absolutamente) redundantes. Podría ocurrir que ambas adhesinas tuvieran un efecto sinérgico en la adhesión o que tuvieran roles complementarios. Sin embargo, la doble mutante (*B. suis* $\Delta btaE \Delta btaF$) no presentó diferencias en cuanto a la capacidad de adhesión o invasión respecto a las simples mutantes. Una posible interpretación de estos resultados es que ambas proteínas participen en la misma vía o mecanismo de adhesión a cultivos celulares. En este escenario, cada una tendría funciones distintas entre sí pero complementarias. Una observación que estaría en contra de esta hipótesis es que la sola expresión de BtaF en *E. coli* produjo un incremento en su capacidad de adhesión a HeLa. Esto indica que BtaF es capaz de mediar la adhesión a las células o bien *per se*, o bien utilizando otros componentes de la membrana que se encuentran conservados en *E. coli*.

Dada la importancia de la invasión a macrófagos por parte de *Brucella*, se evaluó la posibilidad de que BtaE y/o BtaF estuvieran implicadas en la invasión a fagocitos profesionales. Los resultados obtenidos sugieren que ninguno de los dos AT II afecta la adhesión ni tampoco la replicación intracelular en este tipo celular.

En el estudio de la interacción entre el patógeno y el hospedador también es importante determinar el o los componente(s) celular(es) de la célula hospedadora que actúa(n) como “receptor” o ligando de la adhesina bacteriana. Como ya se mencionó, los ligandos celulares reconocidos por las adhesinas podrían ser los mismos componentes de la ECM. Sin embargo, no se puede descartar que las adhesinas interaccionen, además, con otros receptores de las células, utilizando (o no) como puente su unión a componentes de la ECM. Mas aún, mediante la comparación de la estructura predicha para BtaE con las bases de datos de estructuras determinadas experimentalmente, utilizando Metaserver (299), observamos que existiría similitud en la estructura de la región comprendida entre los aminoácidos 564 a 620 de BtaE con la estructura del dominio del AT II UspA1 de *M. catarrhalis* responsable de la unión al receptor celular CEACAM1 (300, 324). Se observó que una región de la estructura de ese mismo dominio de UspA1 presentaría también similitud con la estructura predicha para la mayor parte del dominio pasajero de BtaF. La mayoría de las proteínas que se encuentran dentro de las distintas CEACAMs están restringidas a linajes específicos de mamíferos. Se ha sugerido que los distintos tipos de CEACAM se han diversificado independientemente en cada orden de los mamíferos (325-328) y que la fuerza impulsora detrás de la rápida diversificación de estas proteínas en los distintos linajes de mamíferos podría ser la presión de selección de los patógenos (326, 329). En humanos, CEACAM1 es el blanco de varias bacterias Gram negativas, tanto especies comensales como patógenas; las cuales habitan las mucosas nasofaríngeas, intestinales o urogenitales (330). Incluso la línea derivada de epitelio pulmonar A549 expresa CEACAM1 (331). Se propuso que dentro de las especies bacterianas que colonizan e infectan específicamente humanos, aquellas que se adhieren a CEACAM1 reconocen únicamente al ortólogo humano, lo cual refuerza la hipótesis que plantea que las proteínas adhesivas microbianas han co-evolucionado con el receptor de su hospedador (330). Será interesante analizar si *Brucella* utiliza a CEACAM1 como receptor celular, y además, en caso que lo hiciera, si BtaE y/o BtaF están involucradas en dicha interacción.

Tanto los ortólogos de BmaC (262) como aquellos de los otros dos AT tipo I (BR_A0173 y BR_2013) (256) y los ortólogos de los AT triméricos BtaE y BtaF presentan una alta variabilidad de secuencia. Estas diferencias podrían contribuir a las preferencias de hospedador; por ejemplo, podrían resultar en una mayor adhesión a distintas variantes de los receptores celulares de distintos mamíferos (bovino, caprino o porcino), como ocurre con CEACAM1 para otros patógenos. Esto

apoyaría la hipótesis de la supuesta evolución a partir del aislamiento dado por las distintas preferencias de hospedador (26).

Parte del éxito de *Brucella* como patógeno reside en evadir el sistema inmune. Para ello, *Brucella* ha desarrollado distintas estrategias mediante las cuales evade o interfiere la detección del sistema inmune innato, asegurándose el establecimiento de una infección crónica (332, 333). Una de las estrategias adoptadas por *Brucella* es la prevención de la activación del complemento presente en el suero (145, 334, 335). La estructura particular del LPS de *Brucella* es en parte responsable de la tolerancia al complemento (335, 336). Se ha sugerido que habría otras moléculas que contribuyen a la resistencia al complemento (337). La adhesina UspA2 de *M. catharralis* está involucrada en la resistencia al complemento presente en el suero (309). Dado que las predicciones estructurales de ambos AT BtaE y BtaF sugerían cierta similitud estructural con la estructura de las proteínas UspAs se planteó la hipótesis de que BtaE y/o BtaF podrían contribuir con la tolerancia de *Brucella* al complemento. Mientras que la expresión de *btaE* no afectó la tolerancia de *E. coli* ni de *Brucella* a la actividad bactericida del complemento, la expresión de *btaF* aumentó más de 10 veces la tolerancia de *E. coli* al complemento y la mutante $\Delta btaE$ de *B. suis* mostró una reducción significativa en la supervivencia en presencia del complemento. Estos resultados indican que BtaF (pero no BtaE) interviene en la protección de la bacteria que la porta frente a la actividad bactericida del complemento presente en el suero. En el caso de *Bordetella pertusis*, la bacteria expresa varios factores durante su fase virulenta que interactúan con componentes del complemento o reguladores del mismo, tanto de modo directo como indirecto y de este modo media la resistencia al complemento (338). Algunos de estos componentes son los autotransportadores BrkA (339) y Vag8 (338). Para poder comprender el mecanismo por el cual BtaF media la resistencia al complemento, así como la vía de activación con la cual interfiere, se deberán realizar experimentos adicionales.

Para estudiar el rol de BtaE y BtaF en la virulencia de *B. suis*, se realizaron infecciones en ratones mediante inoculación intragástrica. Se utilizó esta vía de administración en lugar de la clásica inyección intraperitoneal, ya que se asemeja más a lo que sería una de las vías de entrada fisiológica de la bacteria. Tanto a los 7 como 30 días p.i., la carga bacteriana en bazo de ratones inoculados con las simples mutantes *B. suis* $\Delta btaE$ o *B. suis* $\Delta btaF$ fue significativamente menor que en aquellos inoculados con la cepa silvestre. Estos resultados indican que tanto BtaE como BtaF son necesarios para que *Brucella* presente una completa infectividad. Al evaluar la virulencia de la doble mutante se observó que a los 7 días p.i. la infección fue estadísticamente menor no solo con respecto a la de la cepa silvestre, sino también con respecto a las simples mutantes. En cambio a los 30 días, si bien el recuento fue menor que el observado para las mutantes simples, la

diferencia no fue estadísticamente significativa. Una posible interpretación del fenotipo diferencial de la doble mutante (a los 7 días p.i.) es que el fenotipo *in vivo* de la doble mutante es una consecuencia del defecto de más de una función de BtaE y BtaF. Como se mencionó anteriormente, es posible que algunos roles de las adhesinas sean redundantes o complementarios, mientras que otros podrían ser exclusivos de BtaE o BtaF, como por ejemplo, la protección frente al complemento de BtaF. Será interesante determinar si SP41, Bab1_2009, OmaA, BmaC, BtaE y BtaF tienen roles redundantes, sinérgicos o complementarios en la interacción de *Brucella* con distintos tipos de tejidos u hospedadores diferentes. Podría también ocurrir que las distintas adhesinas actúen en distintas etapas de la infección. Tanto BmaC, como BtaE y BtaF son necesarias para que la bacteria presente una completa capacidad de adhesión a células epiteliales. La inactivación de *bmaC* redujo la adhesión de *B. suis* a células del hospedador en 2 log (262), mientras que la delección de *btaE* o *btaF* disminuyó la adhesión de *B. suis* en un 50-60%. Esto sugiere que BmaC tendría un rol más crítico en la adhesión a células en cultivo, respecto a las otras dos adhesinas. No se puede descartar que los perfiles de expresión espacio-temporales de BmaC, BtaE y BtaF sean diferentes entre sí, cumpliendo roles alternativos durante el proceso infeccioso. Será necesario realizar más estudios para comprender la interrelación entre las distintas adhesinas y su impacto en la adhesión a células del hospedador.

Para evaluar la relevancia de las adhesinas en el proceso infeccioso era importante comprobar que dichas adhesinas se expresan *in vivo* en hospedadores naturales. Con el fin de tener una primera aproximación se realizaron ensayos de ELISA invertido para evaluar la presencia de anticuerpos anti-BtaE o anti-BtaF presentes en hospedadores sanos o infectados con *B. suis*. Se pudo determinar que el título de anticuerpos capaces de reconocer una porción del dominio pasajero tanto de BtaE como de BtaF proveniente de sueros de chanchos enfermos fue significativamente mayor al de sueros provenientes de chanchos sanos. Estos resultados indican que tanto BtaE como BtaF se expresan *in vivo* cuando *B. suis* infecta a su hospedador de preferencia, lo cual refuerza la importancia de estas adhesinas durante el proceso de infección. Además, sugiere que en los animales enfermos habría algún tipo de respuesta inmune mediada por anticuerpos anti-adhesina. Las observaciones obtenidas al utilizar sueros de humanos, aunque preliminares, van en el mismo sentido. Se requieren más estudios para evaluar la intensidad de la respuesta inmunogénica contra las adhesinas y su potencial uso en el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico o protección.

Cabe destacar que actualmente las estrategias de diagnóstico para porcinos son muy limitadas. Según una comunicación personal con personal del SENASA es importante el desarrollo de una técnica que permita un diagnóstico preciso de brucelosis en porcinos. El desarrollo de dicha

técnica permitirá realizar el monitoreo de la enfermedad en porcinos. Como se mencionó en la sección 1.4. de la Introducción, los *tests* o combinación de pruebas utilizados para diagnosticar brucelosis para porcinos no son eficientes. Incluso la puesta a punto del ensayo de ELISA invertido con suero porcino presentó un considerable grado de dificultad. El desarrollo de una técnica de diagnóstico para porcinos basada en ELISA es prometedora, ya que no solo no se cultiva al patógeno, sino que además no se necesitan equipos sofisticados y los resultados se obtienen en poco tiempo.

Ubicación polar

Como era predecible, se determinó que tanto BtaE como BtaF se localizan sobre la superficie de la bacteria. Curiosamente, ambas adhesinas mostraron localización unipolar. En el caso de BtaF en algunos casos la señal mostró ubicación sub-polar. Hasta nuestro conocimiento, estos serían los primeros reportes de AT triméricos con localización unipolar. En cambio, ya se había descrito AT monoméricos con localización unipolar; estos incluyen, la adhesina BmaC de *B. suis* (262), la proteína que promueve polimerización de actina IcsA de *Shigella flexneri* (340) y la adhesina AIDA-I de *E. coli* (233). Es interesante destacar que algunos de los AT tipo I, incluyendo Aida-A e IcsA, son polares en el citoplasma previo a su secreción, lo cual sugiere que la secreción ocurre en el polo (233, 341). Por otro lado, se observó que el AT monomérico NalP del coco *Neisseria meningitidis* contiene en sí mismo la información molecular que le permite localizarse en un polo al expresarla en *E. coli*. En línea con esta observación, tanto BtaE como BtaF mostraron tener una localización unipolar no solo en *B. suis* sino también al ser expresadas de modo heterólogo en *E. coli*, sugiriendo que el mecanismo que dirige la localización unipolar de los AT (tanto tipo I como tipo II) estaría conservado en varias bacterias.

Tanto BtaE como BtaF fueron detectadas por inmunofluorescencia en una baja proporción de las células. Previamente se había observado un porcentaje similar de expresión para la adhesina unipolar BmaC (262). Es posible que el nivel de transcripción *in vitro* de *bmaC*, *btaE* o *btaF* no sea lo suficientemente alto para ser detectado como *foci* fluorescentes en la mayoría de las células. Si esto fuera cierto, se esperaría que ocurriera un aumento en la expresión génica de alguno(s) de los genes de las adhesinas cuando la bacteria se encuentra en el entorno del hospedador, previamente a la internalización en la célula. Por otro lado, dado que los anticuerpos generados reconocen un péptido correspondiente al dominio pasajero, otra explicación no excluyente de la baja proporción de bacterias marcadas es que estos péptidos no sean accesibles para los anticuerpos en la estructura nativa que adoptan sobre la superficie bacteriana (219). Por último, otra hipótesis interesante es que las adhesinas se expresarían solo en una subpoblación de las bacterias, que dependería de la etapa

del ciclo celular de *Brucella*. Esta hipótesis se basa en que, en *Brucella*, luego de una división asimétrica se generan dos tipos celulares distintos que sufren un proceso de diferenciación (39-41, 342). Para cada una de las células hijas se puede además identificar un polo nuevo y un polo viejo (39). Asimismo, una baja expresión de estas adhesinas en una pequeña subpoblación bacteriana podría ser suficiente para lograr la internalización de *Brucella* y establecer así una infección limitada pero exitosa. Serán necesarios nuevos estudios para explorar estas posibilidades.

Evidencias previas sugieren que cuando *Brucella* interactúa con la superficie de una célula eucariota, lo hace a través de uno de sus polos (262, 343). Mas aún, se ha propuesto que el polo en el cual se localiza BmaC, sería el polo que interactúa con la superficie celular (262). Por inmunofluorescencia se observó que el polo bacteriano que interacciona con la célula también correspondería a aquel en donde se ubica BtaE. Para poder determinar si las adhesinas se localizan en un polo en particular, y en caso de hacerlo, en qué polo se localizan; se analizó la presencia de cada adhesina por inmunofluorescencia de cepas de *B. suis* que portaban fusiones traduccionales de marcadores de polo viejo a proteínas fluorescentes (PdhS (41)) o nuevo (AidB (42)). Los resultados obtenidos indican que en las condiciones estudiadas, tanto BmaC como BtaE y BtaF, se localizan en el polo nuevo de *B. suis*, sugiriendo que éste polo estaría funcionalmente diferenciado para la adhesión. Varios factores de virulencia superficiales, incluyendo estructuras adhesivas de otras α -Proteobacterias cercanas a *Brucella*, han exhibido localización polar. Se ha descrito, por ejemplo, que todas las proteínas VirB de *Agrobacterium tumefaciens* tienen localización polar (344). Incluso *A. tumefaciens* se adhiere a plantas y a superficies abióticas a través de uno de sus polos, en un proceso mediado por distintas estructuras, incluyendo un polisacárido unipolar (UPP) (345). A diferencia de lo observado en *Brucella*, se ha propuesto que *A. tumefaciens* se adhiere a las superficies preferentemente a través del polo viejo (40). Es posible que las características de la asimetría polar dependan del estilo de vida bacteriano. En el caso de *A. tumefaciens*, el modo de vida sésil requeriría la adhesión mediada por adhesinas localizadas en el polo viejo (el cual es relativamente estable) (345). Otro ejemplo de α -Proteobacteria que posee una arquitectura polar es *Caulobacter crescentus*, en cuyo polo viejo generado luego de la división celular se encuentra el polo diferenciado para la adhesión (40, 345, 346). *Caulobacter* también presenta una etapa sésil en su ciclo de vida. En *Brucella*, una hipótesis atractiva es que la adhesión inicial de una única bacteria a la célula del hospedador estaría mediada por adhesinas localizadas en el polo nuevo de una subpoblación bacteriana infectiva. Es posible que la diferencia respecto al polo diferenciado para la adhesión esté relacionada con el estilo de vida sésil de la bacteria (como ocurre en *Agrobacterium* y *Caulobacter*) o una adhesión transitoria a la célula del hospedador como es el caso de *Brucella*.

Adhesinas y especiación

Como se mencionó anteriormente, dentro del género *Brucella* el concepto de especie es particularmente controversial (18), principalmente por la alta conservación de los genomas (11, 19-21). La elevada similitud entre los miembros del género, ha dado lugar a que se planteara que el género sería monoespecífico y que todas las especies pertenecerían a biovariedades o cepas de la misma especie (21, 24, 25). Esta teoría se ha desestimado principalmente porque entra en conflicto con la hipótesis de la evolución a partir del aislamiento dado por las distintas preferencias de hospedador (26, 38). Curiosamente, la comparación de los genomas de *B. melitensis* 16M y *B. suis* 1330 indicó que los genes más variables corresponden en gran parte a genes hipotéticos, muchos de los cuales codificarían proteínas de superficie. Estas diferencias en genes de superficie contribuirían a diferencias en el tropismo a tejidos, hospedador de preferencia y en las manifestaciones de la brucelosis (23).

La comparación de los ortólogos de las adhesinas BmaC, BtaE y BtaF de *B. suis* 1330 muestra una considerable variabilidad. Todos los genomas de las especies/cepas analizadas mostraron la presencia de ortólogos de BtaE y BtaF, aunque algunos de los ortólogos podrían no ser funcionales. Las diferencias se observaron principalmente en el dominio pasajero, tanto a nivel secuencia, como en su longitud y en el número de motivos repetidos. En el caso de BmaC, dentro de las especies clásicas, no fue posible identificar un ortólogo funcional en *B. canis* ya que el gen homólogo sería inactivo debido a mutaciones *nonsense* (262). Dentro de los ortólogos funcionales de BmaC también se observó una alta variabilidad; por ejemplo, la similitud entre BmaC de *B. suis* 1330 con su ortólogo de *B. ovis* es de tan solo el 48% (262). En línea con estas observaciones, los ortólogos de los otros AT tipo I BRA_0173 y BR_2013 (256) también presentaron diferencias de secuencia o funcionalidad. En el caso de BRA_0173, los genomas de *B. canis* y *B. melitensis* no expresarían ortólogos funcionales. Por otro lado, se expresarían ortólogos en *B. abortus* 2308 y *B. ovis*, pero sus identidades con respecto a la proteína de *B. suis* 1330 son sólo de 40 y 55%, respectivamente. En el caso de BR_2013 (OmaA) tampoco se identificaron ortólogos en todas las especies clásicas de *Brucella*, y en los casos en los que están presentes, éstos presentaron una baja identidad con respecto a la proteína de *B. suis*. En resumen, las putativas adhesinas podrían contribuir a las diferencias en cuanto a tropismo de tejido y/o la preferencia de hospedador.

Por último, para comparar el impacto de las distintas adhesinas en el tropismo a determinados tejidos es importante también analizar la regulación de la expresión de las mismas. A través de análisis del transcriptoma se ha observado que la expresión del ortólogo de *btaE* en *B. melitensis* (BMEI1873) se encuentra reducida en una mutante defectiva en el regulador VjbR (347). Este regulador es un homólogo de LuxR que modula la expresión de transcritos requeridos para la

supervivencia intracelular, cuya expresión se incrementa con la acidificación del medio extracelular (348). Por otro lado, mediante análisis de *microarrays* se determinó que la transcripción del ortólogo de *bmaC* en *B. abortus* se encuentra regulada negativamente por el sistema de dos componentes BvrR/BvrS. Este sistema participa en el ajuste de la fisiología de *Brucella* durante la transición que ocurre entre un nicho extracelular y el medio intracelular (349). En función de estas observaciones, una hipótesis es que la expresión de *btaE* y *bmaC* (y probablemente los genes de las otras adhesinas) se induzca por distintos estímulos. Serán necesarios estudios futuros que se focalicen en la regulación de la expresión de los genes de las adhesinas para comprender si éstas actúan en las mismas condiciones ambientales o, si en cambio, actúan bajo distintos estímulos, cumpliendo roles complementarios.

MapA

La tercer proteína perteneciente al grupo 2 de posibles adhesinas fue MapA (Figura 10). MapA claramente no pertenece a la familia de los AT triméricos. Los análisis y predicciones bioinformáticas sugieren que podrían tratarse de una proteína de membrana externa. Sólo se identificó un dominio conservado de función desconocida (DUF490) y una repetición del motivo RGD que se suele asociar a adhesinas bacterianas. Por otra parte, la búsqueda de secuencia señal mediante la vía TAT sugiere que la proteína podría secretarse a través de esta vía. Río arriba de *mapA* se encuentra el gen de una proteína hipotética conservada de membrana externa que estaría involucrada en el ensamblado de la membrana externa. El ORF que se encuentra río debajo de *mapA* codificaría una lipoproteína de la envoltura celular. Por otro lado, se observó que MapA se encuentra en todas las especies del género compartiendo una identidad mayor al 99%. Esta mínima variabilidad sugiere que MapA estaría implicada en alguna etapa del metabolismo central de *Brucella*. Los ortólogos en *B. abortus* S19 y *B. melitensis* 16M están anotados como putativas “*gramicidin S biosynthesis grsT protein*” (GRST). Sin embargo, observamos que la similitud de secuencia entre MapA y la GRST de *Brevibacillus brevis* (312) es de sólo el 7.2%. La enzima GRST está involucrada en la síntesis de gramicidina S y en particular es una hidrolasa que actúa sobre uniones éster. Dentro de la clasificación numérica para las enzimas basada en las reacciones químicas que catalizan, el número EC (*Enzyme Commission numbers*) correspondiente para las GRST es EC 3.1.2, donde “3” indica que es una hidrolasa, “3.1” significa que actúa sobre enlaces éster y “3.1.2” indica que es una tioester hidrolasa (277). Las enzimas pertenecientes a esta clase (incluyendo la GRST) participan en el metabolismo de ácidos grasos (277).

Al realizar la comparación de la estructura predicha para MapA con bases de datos de estructuras, se encontró similitud con dos enzimas de la familia 2 de las glicosil hidrolasas. Esta

familia incluye enzimas con actividad β -galactosidasa (lactasa) o β -glucuronidasa, descritas en bacterias, hongos y animales, pero no en plantas (350). Las glicosil hidrolasas se clasifican como EC 3.2.1, donde “3” indica que es una hidrolasa, “3.2” indica que es una glicosilasa, es decir que actúa sobre enlaces glicosilo (unión entre dos monosacáridos) y “3.2.1” significa que es una glicosidasa capaz de hidrolizar O- o S-glicosidos, liberando azúcares más chicos (277).

Con el fin de caracterizar MapA se realizaron distintos ensayos *in vitro*; y para ello se realizaron al igual que para BtaE y BtaF aproximaciones tanto mediante ensayos heterólogos y mutacionales. En el caso de la expresión heteróloga, no se observaron diferencias en el fenotipo entre la cepa de *E. coli* que expresó MapA y la cepa control. Por otro lado se evaluó si la delección de *mapA* afectaba la estructura de la envoltura celular de *B. suis* y por consiguiente la resistencia a diferentes compuestos. *B. suis* $\Delta mapA$ presentó el típico comportamiento de las cepas lisas en acriflavina, lo cual sugiere que no habría sufrido cambios en su antígeno O. La mutante tampoco presentó diferencias en cuanto a la tolerancia a DOC 0.1%, EDTA 200 $\mu\text{g/ml}$ ni a SDS 0.01%, con respecto a la cepa parental. En cambio, presentó una mayor sensibilidad a Tritón X-100 0.1% y a distintas concentraciones de polimixina B. Estos resultados indican que la superficie de la mutante se encuentra afectada. Para comprender estos resultados, es importante tener en cuenta la naturaleza de cada uno de los compuestos. Como se mencionó en la sección 2.2.a. de la Introducción, *Brucella* normalmente tolera mayores concentraciones de quelantes de calcio como EDTA, que otras bacterias, lo cual está relacionado con la menor exposición de residuos cargados de su LPS (155) y el fuerte anclaje de esta estructura a su membrana particularmente hidrofóbica (143). Como consecuencia de la menor exposición de residuos con carga aniónica del LPS respecto a otras especies, el rol de los cationes divalentes en la estabilización de su estructura es menos importante. Tanto el SDS como el Tritón X-100 son detergentes, con la diferencia que el primero es un detergente aniónico, mientras que el Tritón X-100 es un detergente no iónico. Ambos compuestos son surfactantes y en altas concentraciones podrían emulsionar las membranas de las bacterias. El Tritón X-100 es una molécula anfipática, soluble en agua, compuesta por una cadena hidrofílica de óxido de polietileno y un anillo aromático hidrofóbico. Una posible explicación a la mayor sensibilidad al Tritón X-100 de la mutante, es que ésta presente un cambio en la hidrofobicidad de su membrana que la haga más accesible a este detergente.

La polimixina B es un lipopéptido catiónico con efecto antibiótico en la mayoría de las bacterias Gram negativas, ya que permeabiliza las membranas. Mediante su porción de ácido graso se une a las membranas y altera su estructura permeabilizándola, actuando de modo similar a un detergente. La porción correspondiente al péptido catiónico suele unirse al LPS mediante una atracción electrostática, mediada por la interacción de las cargas positivas del péptido con las

cargas negativas del LPS, y así también altera la permeabilidad de la membrana externa. Mediante estas interacciones electrostáticas la polimixina B desplaza, al menos en parte, iones calcio y magnesio, que en la mayoría de las Gram negativas estabilizan las cargas del LPS. Como se mencionó en la sección 2.2.a. de la introducción, *Brucella* tiene una mayor tolerancia a la polimixina B que otras especies como *E. coli* y *S. enterica*, lo cual se debe principalmente a la menor cantidad de grupos aniónicos expuestos en el LPS de *Brucella* y su fuerte anclaje a la membrana (8, 142, 143, 155). La mayor susceptibilidad a polimixina de la mutante $\Delta mapA$ podría deberse a una reducción en la hidrofobicidad de su membrana la cual podría dar lugar a un anclaje más débil del LPS a la membrana. Otra posibilidad es que un cambio en la estructura del LPS en la mutante resulte en un aumento en las cargas negativas expuestas por el LPS.

Dentro de la caracterización de los fenotipos asociados a la envoltura celular, el último fenotipo analizado fue la sensibilidad de la cepa mutante *mapA* a la lisozima. La lisozima es una enzima que hidroliza preferentemente las uniones β 1,4 entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina del peptidoglicano de la pared bacteriana (351). Esta actividad enzimática afecta particularmente a las bacterias Gram positivas (352). La hidrólisis del peptidoglicano compromete la integridad de la pared celular y lleva a la lisis de la bacteria. Se considera que esta enzima es parte de un sistema bactericida no inmune de vertebrados, ya que es abundante en numerosas secreciones como la saliva, lágrimas, moco, bazo, pulmones, plasma y cartílago, entre otros (351). Además, los neutrófilos la liberan como parte del mecanismo de defensa del sistema inmune. De todos modos se ha demostrado que el LPS de *Brucella* no estimula la degranulación ni la liberación de lisozima por parte de los neutrófilos (353).

La baja susceptibilidad de la mayoría de las especies Gram negativas a la lisozima se debe a que la membrana externa protege al peptidoglicano (354). La concentración de enzima utilizada en el ensayo (ver sección III.4. de Resultados) (2 $\mu\text{g/ml}$) estuvo dentro del rango de concentraciones que se encuentra en sangre y plasma (varía entre 1.54 y 9.74 $\mu\text{g/ml}$, con una media de 5.64 $\mu\text{g/ml}$ (355)). En estas condiciones la cepa mutante *mapA* mostró ser muy sensible a la lisozima; en menos de 3 minutos se obtuvo una lisis casi total de las bacterias, mientras que la cepa silvestre no fue afectada en los tiempos evaluados. La mayor sensibilidad de la mutante a la lisozima la define como una cepa hiperpermeable. Desde el punto de vista estructural, esta característica indica que su membrana externa se encuentra afectada. Es interesante analizar lo que ocurre en el caso de cepas Gram negativas muy sensibles a la lisozima o “hiperpermeables”, como por ejemplo la cepa DC2 de *E. coli*. Esta cepa, derivada de UB1005 (356) presenta una membrana externa permeable a distintos compuestos (356-358). La causa de la hiperpermeabilidad es que posee un LPS alterado (359,358), particularmente tiene una reducción en la esterificación de

residuos del núcleo polisacárido que dan lugar a un aumento en las cargas negativas del LPS (356, 359). En línea con el aumento de cargas negativas expuestas por su LPS, se ha observado, además, que el LPS de esta cepa tiene una mayor cantidad de iones sodio y magnesio unidos, respecto a la cepa parental (359). Curiosamente, estas diferencias dan lugar a una mayor afinidad del LPS por policationes respecto al de la cepa parental (359), entre ellos la polimixina B, lo cual a su vez confiere mayor sensibilidad a este compuesto (360). Se ha descrito que *E. coli* DC2 es también más susceptible a compuestos hidrofóbicos que la cepa parental (361). En resumen, estas observaciones apoyan la hipótesis que el LPS de $\Delta mapA$, similar a lo que ocurre con el LPS de *E. coli* DC2, podría exponer una mayor carga negativa, lo cual explicaría su mayor sensibilidad a polimixina B y lisozima. Sin embargo, la falta de un fenotipo de la mutante en cuanto a la tolerancia al EDTA sugiere que el LPS no estaría estabilizado por una mayor cantidad de cationes divalentes. Esto estaría en contra de un incremento de cargas negativas expuestas en el LPS. Existe la posibilidad que la estabilización estuviera dada en parte por cationes monovalentes, como ocurre en *E. coli* DC2 (mayor asociación con sodio). Dentro de los cambios que podrían explicar aumentos en la carga negativa, podrían mencionarse modificaciones en el lípido A o en el antígeno O (ver sección 2.2.a. de la Introducción). Aunque su comportamiento en el ensayo de acriflavina fue el esperado para una cepa lisa, se debe mencionar que se han descrito casos en los que cepas rugosas se comportan como lisas en *tests* que se utilizan para discriminar unas de otras (362). Es por esto que no deberían descartarse modificaciones en el antígeno O. Los cambios asociados a la envoltura celular también podrían deberse a alteraciones en la hidrofobicidad de los lípidos de membrana. Ambas posibilidades, tanto las posibles modificaciones en el LPS o en la hidrofobicidad de los lípidos de membrana estarían en línea con las predicciones informáticas que sugieren que MapA podría catalizar la formación de uniones éster (como GRST) y con la función predicha para las proteínas codificadas en el entorno genético. Alternativamente, MapA podría estar involucrada en la biosíntesis de algún polisacárido de superficie. Esta posibilidad estaría apoyada por la predicción de la similitud de la estructura de MapA con estructuras de glicosil hidrolasas y la similitud de secuencia con proteínas involucradas en la biosíntesis y degradación de polisacáridos de superficie y del LPS.

La menor capacidad de la mutante en *mapA* de infectar HeLa con respecto a la cepa parental podría ser una consecuencia indirecta de los cambios en la membrana, o sea, a un efecto pleiotrópico de la delección. Por otro lado, es interesante el comportamiento observado de la mutante en el ensayo de replicación intracelular en macrófagos. A tiempos cortos se observa que la cantidad de bacterias intracelulares correspondientes a la mutante defectiva en MapA es menor. Si bien en los tiempos posteriores hay un menor recuento para la mutante, la cinética de replicación

fue la misma. Esto sugiere que las diferencias en el recuento se deberían a otro factor previo a la estabilización en el nicho intracelular. Una posibilidad es que la mutante sea menos eficiente en evitar la fusión inicial a endosomas o lisosomas tempranos. Se ha descrito que al ingresar a los macrófagos *Brucella* necesita la presencia de *rafts* lipídicos (balsas lipídicas) ricos en GM1 y colesterol (124, 125) y del lipopolisacárido (LPS) de *Brucella* spp. (126). La alteración de estructuras como el LPS o los lípidos de membrana en *mapA* podría resultar en una interacción inicial ineficiente, lo cual, a su vez, provocaría una reducción en el número de bacterias invasoras. En resumen, la función bioquímica de MapA podría contribuir a adquirir las características particulares de la membrana externa de *Brucella* que la hacen resistente a componentes del sistema inmune innato del hospedador. La actividad de MapA también sería necesaria para que la superficie de *Brucella* interactuara eficientemente con el macrófago en las etapas iniciales.

Perspectivas

Será interesante plantear nuevos enfoques experimentales que permitan determinar la relación entre la variabilidad de los ortólogos de las distintas adhesinas y el tropismo a diferentes tejidos y el rango de hospedadores. Además, se evaluará la posibilidad que CEACAM1 funcione como un receptor celular utilizado por *Brucella* en la infección de células epiteliales presentes en las mucosas y si esta interacción está mediada por BtaE, BtaF y/o BmaC. Dado que el receptor CEACAM1 de distintas especies de mamíferos presenta considerables variaciones (330), es interesante la hipótesis que la interacción de CEACAM1 con una de las adhesinas contribuya con la especificidad de la interacción de una determinada especie de *Brucella* con su hospedador de preferencia. También se evaluará si las distintas adhesinas de *B. suis* tienen roles complementarios, sinérgicos o redundantes. El estudio de la regulación de la expresión génica y la caracterización de otras mutantes múltiples ayudarán a contestar estas preguntas.

Por otro lado, se realizarán estudios más rigurosos para explorar la antigenicidad de BtaE y BtaF, tanto en porcinos como en humanos. Dependiendo de estos resultados, se podría evaluar la posibilidad de utilizar a las adhesinas como blancos de diagnóstico en porcinos, utilizando una técnica simple como el ELISA invertido. Surge la pregunta si las adhesinas o péptidos de ellas podrían conferir protección a ratones infectados con *B. suis*. Esta información podría ser utilizada para el desarrollo de una vacuna para proteger a los porcinos de la brucelosis, ya que, si bien existe una vacuna (cepa 2 de *B. suis*), su uso está permitido en pocos países. Otra opción alternativa al desarrollo de vacuna de componentes, podría ser expresar las adhesinas (o versiones truncadas de las mismas) en alguna bacteria que pertenezca al grupo de las GRAS (*generally recognized as*

safe), es decir que sea considerada por la FDA (*American Food and Drug Administration*) como segura. De este modo, la vacuna podría ser administrada por vía oral.

Por otra parte, con respecto a MapA, nos proponemos realizar diversos enfoques bioquímicos, genéticos y moleculares que permitan definir su función bioquímica. La determinación de su función es relevante ya que las observaciones descriptas en este trabajo de tesis sugieren que cumpliría un rol importante en la adquisición de las características particulares de la membrana externa de *Brucella*, que la convierten en un patógeno furtivo. Por otro lado sería interesante estudiar si la cepa es tal como se espera, una cepa atenuada.

Por último, el hecho de que *B. suis* $\Delta mapA$ sea una cepa hiperpermeable da lugar a la utilización de esta cepa para una amplia variedad de aplicaciones. Por ejemplo se la podría utilizar para hacer una búsqueda de alta escala de compuestos con actividad bactericida contra *Brucella*. Se han utilizado cepas bacterianas y de levaduras hiperpermeables para evaluar la sensibilidad a distintos compuestos y combinaciones de drogas (363,364). Incluso se ha aprovechado en otros microorganismos la mayor permeabilidad a distintos compuestos para caracterizar vías metabólicas (365), identificar blancos de acción para nuevos antibióticos (366), entre otros estudios.

Conclusiones

En el marco de esta tesis se han identificado y caracterizado BtaE y BtaF de *B. suis*, dos adhesinas pertenecientes a la familia de los autotransportadores triméricos. Se demostró que una adhesión eficiente de *B. suis* a células del hospedador es dependiente de la expresión de ambas adhesinas. Además, BtaE y BtaF fueron necesarias para una completa virulencia en ratón. Las adhesinas podrían cumplir algunas funciones redundantes, como mediar la adhesión a componentes de la ECM. Otras funciones de las adhesinas podrían ser complementarias, cumpliendo distintos roles en un mismo “mecanismo adhesivo”; un ejemplo de este caso es el rol de BtaE y BtaF en la adhesión a células de origen epitelial. Es posible que otras funciones sean exclusivas de solo una de ellas. Por ejemplo, sólo BtaF contribuye con la tolerancia al complemento presente en el suero.

Si bien aún desconocemos la función de MapA, los resultados obtenidos sugieren que la proteína MapA estaría involucrada en la síntesis o modificación de algún componente de membrana. Esta función podría estar relacionada, por ejemplo, con la biosíntesis de lípidos de la membrana externa, cuya estructura contribuye con la alta hidrofobicidad de dicha membrana. Alternativamente, MapA podría estar involucrada en la modificación de algún componente del LPS, que resulte en una baja cantidad y/o exposición de residuos con carga negativa. Por ejemplo, MapA podría mediar la esterificación de residuos cargados del LPS. La identificación de una nueva proteína/enzima fuertemente ligada a la estructura particular de la membrana externa de *Brucella* es otro modo de acercarse a comprender las características únicas de la patogenicidad de este patógeno.

Bibliografía

1. **Bergey DH, JG.** 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
2. **Gupta RS.** 2005. Protein signatures distinctive of alpha proteobacteria and its subgroups and a model for alpha-proteobacterial evolution. *Crit Rev Microbiol* **31**:101-135.
3. **Williams KP, Sobral BW, Dickerman AW.** 2007. A robust species tree for the alphaproteobacteria. *J Bacteriol* **189**:4578-4586.
4. **Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM, Tiedje JM.** 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* **37**:D141-145.
5. **Batut J, Andersson SG, O'Callaghan D.** 2004. The evolution of chronic infection strategies in the alpha-proteobacteria. *Nat Rev Microbiol* **2**:933-945.
6. **Andersson SG, Zomorodipour A, Andersson JO, Sicheritz-Ponten T, Alsmark UC, Podowski RM, Naslund AK, Eriksson AS, Winkler HH, Kurland CG.** 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**:133-140.
7. **MacLean AM, Finan TM, Sadowsky MJ.** 2007. Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes. *Plant Physiol* **144**:615-622.
8. **Seelke R.** 2007. *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*. Choice: Current Reviews for Academic Libraries **45**:68-68.
9. **González-Cappa S.** 2012. Enfermedades Infecciosas, p. 6, 17-18,27. In *Políticas SdPy* (ed.). Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva
10. **Alton GG, Jones, L.M., Angus, R.D., Verger, J.M.** 1988. *Techniques for the brucellosis laboratory*.
11. **Rajashekara G, Glasner JD, Glover DA, Splitter GA.** 2004. Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. *J Bacteriol* **186**:5040-5051.
12. **Scholz HC, Hubalek Z, Sedlacek I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Melzer F, Kampfer P, Neubauer H, Cloeckaert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Falsen E, Bahn P, Gollner C, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, Nockler K.** 2008. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**:375-382.
13. **Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckaert A.** 2007. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**:2688-2693.
14. **Scholz HC, Nockler K, Gollner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Kampfer P, Cloeckaert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, De BK.** 2010. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**:801-808.
15. **De BK, Stauffer L, Koylass MS, Sharp SE, Gee JE, Helsel LO, Steigerwalt AG, Vega R, Clark TA, Daneshvar MI, Wilkins PP, Whatmore AM.** 2008. Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. *J Clin Microbiol* **46**:43-49.
16. **Cohan FM.** 2002. Sexual isolation and speciation in bacteria. *Genetica* **116**:359-370.
17. **Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PA, Kampfer P, Maiden MC, Nesme X, Rossello-Mora R, Swings J, Truper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB.** 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:1043-1047.
18. **Moreno E, Cloeckaert A, Moriyon I.** 2002. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol* **90**:209-227.

19. **Hoyer BH, McCullough NB.** 1968. Polynucleotide homologies of *Brucella* deoxyribonucleic acids. *J Bacteriol* **95**:444-448.
20. **Hoyer BH, McCullough NB.** 1968. Homologies of deoxyribonucleic acids from *Brucella ovis*, canine abortion organisms, and other *Brucella* species. *J Bacteriol* **96**:1783-1790.
21. **Vergler JMMG.** 1985. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriology* **35**:292-295.
22. **DelVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C, Los T, Ivanova N, Anderson I, Bhattacharyya A, Lykidis A, Reznik G, Jablonski L, Larsen N, D'Souza M, Bernal A, Mazur M, Goltsman E, Selkov E, Elzer PH, Hagius S, O'Callaghan D, Letesson JJ, Haselkorn R, Kyrpides N, Overbeek R.** 2002. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:443-448.
23. **Paulsen IT, Seshadri R, Nelson KE, Eisen JA, Heidelberg JF, Read TD, Dodson RJ, Umayam L, Brinkac LM, Beanan MJ, Daugherty SC, Deboy RT, Durkin AS, Kolonay JF, Madupu R, Nelson WC, Ayodeji B, Kraul M, Shetty J, Malek J, Van Aken SE, Riedmuller S, Tettelin H, Gill SR, White O, Salzberg SL, Hoover DL, Lindler LE, Halling SM, Boyle SM, Fraser CM.** 2002. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:13148-13153.
24. **Gandara B, Merino AL, Rogel MA, Martinez-Romero E.** 2001. Limited genetic diversity of *Brucella* spp. *J Clin Microbiol* **39**:235-240.
25. **Gill MJCKPW.** 1983. Methods for the identification of *Brucella*.
26. **Moreno EMI.** 2001. The prokaryotes: an evolving microbiological resource for the microbiological community. Springer, New York.
27. **Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, Zuerner RL, Qing Z, Li LL, Kapur V, Alt DP, Olsen SC.** 2005. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J Bacteriol* **187**:2715-2726.
28. **Crawford RP, J. D. Huber, and B. S. Adams.** 1990. Epidemiology and surveillance, p. 131–151. *In* Robert NKaD (ed.), *Animal brucellosis*. CRC Press, Boca Raton, FL.
29. **Muma JB, Samui KL, Siamudaala VM, Oloya J, Matop G, Omer MK, Munyeme M, Mubita C, Skjerve E.** 2006. Prevalence of antibodies to *Brucella* spp. and individual risk factors of infection in traditional cattle, goats and sheep reared in livestock-wildlife interface areas of Zambia. *Trop Anim Health Prod* **38**:195-206.
30. **Kreeger TJ, Cook WE, Edwards WH, Cornish T.** 2004. Brucellosis in captive Rocky Mountain bighorn sheep (*Ovis canadensis*) caused by *Brucella abortus* biovar 4. *J Wildl Dis* **40**:311-315.
31. **Arimi SM, Koroti E, Kang'ethe EK, Omoro AO, McDermott JJ.** 2005. Risk of infection with *Brucella abortus* and *Escherichia coli* O157:H7 associated with marketing of unpasteurized milk in Kenya. *Acta Trop* **96**:1-8.
32. **Swai ES, Schoonman L.** 2009. Human brucellosis: seroprevalence and risk factors related to high risk occupational groups in Tanga Municipality, Tanzania. *Zoonoses Public Health* **56**:183-187.
33. **Godfroid J, Kasbohrer A.** 2002. Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. *Vet Microbiol* **90**:135-145.
34. **Olsen S.** 2004. Brucellosis Porcina. *In* (OIE) Omdsa (ed.), *Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas)*, vol. II. Office International des Epizooties, Paris.
35. **Young EJ.** 1995. An overview of human brucellosis. *Clin Infect Dis* **21**:283-289; quiz 290.
36. **Lucero NE, Ayala SM, Escobar GI, Jacob NR.** 2008. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiol Infect* **136**:496-503.

37. **Verger JM, Duee JP, Grayon M.** 1982. [*Brucella* isolates in France: evaluation of 10 years of typing]. *Ann Microbiol (Paris)* **133**:433-447.
38. **Chain PS, Comerci DJ, Tolmasky ME, Larimer FW, Malfatti SA, Vergez LM, Agüero F, Land ML, Ugalde RA, Garcia E.** 2005. Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*. *Infect Immun* **73**:8353-8361.
39. **Hallez R, Bellefontaine AF, Letesson JJ, De Bolle X.** 2004. Morphological and functional asymmetry in alpha-proteobacteria. *Trends Microbiol* **12**:361-365.
40. **Brown PJ, de Pedro MA, Kysela DT, Van der Henst C, Kim J, De Bolle X, Fuqua C, Brun YV.** 2012. Polar growth in the Alphaproteobacterial order Rhizobiales. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:1697-1701.
41. **Hallez R, Mignolet J, Van Mullem V, Wery M, Vandenhoute J, Letesson JJ, Jacobs-Wagner C, De Bolle X.** 2007. The asymmetric distribution of the essential histidine kinase PdhS indicates a differentiation event in *Brucella abortus*. *Embo J* **26**:1444-1455.
42. **Dotreppe D, Mullier C, Letesson JJ, De Bolle X.** 2011. The alkylation response protein AidB is localized at the new poles and constriction sites in *Brucella abortus*. *BMC Microbiol* **11**:257.
43. **SENASA,** posting date. Brucellosis. [Online.]
44. **Ray WC.** 1977. The epidemiology of *Brucella abortus*, p. 102–115. In Hidalgo RPCaRJ (ed.), *Bovine Brucellosis*. Texas A&M University Press, Texas.
45. **Corbel MJ.** 1997. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* **3**:213-221.
46. **Office International des Epizooties WAHO,** posting date. Annual reports. 1996–2004. [Online.]
47. **Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV.** 2006. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis* **6**:91-99.
48. **Castro H.A. GSR, Prat M.I.** 2005. Brucellosis: una revisión práctica *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* **39**:203-216.
49. **Thorne ET.** 2001. Brucellosis., p. 372–395. In Williams ES, Barker, I.K (ed.), *Infectious Diseases of Wild Mammals*, 3rd ed. Manson Publishing.
50. **Forbes LB, Tessaro SV.** 2003. Evaluation of cattle for experimental infection with and transmission of *Brucella suis* biovar 4. *J Am Vet Med Assoc* **222**:1252-1256.
51. **Cook WE, Williams ES, Thorne ET, Kreeger TJ, Stout G, Bardsley K, Edwards H, Schurig G, Colby LA, Enright F, Elzer PH.** 2002. *Brucella abortus* strain RB51 vaccination in elk. I. Efficacy of reduced dosage. *J Wildl Dis* **38**:18-26.
52. **Elzer PH, Hagius SD, Davis DS, DelVecchio VG, Enright FM.** 2002. Characterization of the caprine model for ruminant brucellosis. *Vet Microbiol* **90**:425-431.
53. **Sreevatsan S, Bookout JB, Ringpis F, Perumaalla VS, Ficht TA, Adams LG, Hagius SD, Elzer PH, Bricker BJ, Kumar GK, Rajasekhar M, Isloor S, Barathur RR.** 2000. A multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *J Clin Microbiol* **38**:2602-2610.
54. **Godfroid J, Cloeckaert A, Liautard JP, Kohler S, Fretin D, Walravens K, Garin-Bastuji B, Letesson JJ.** 2005. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet Res* **36**:313-326.
55. **Meyer KF, Shaw, E.B.** 1920. A comparison of the morphological, cultural and biochemical characteristics of *B. abortus* and *B. melitensis*. *Studies on the genus Brucella nov. gen.* *J Infect Dis*:173–184.
56. **Huddleson IFaHET.** 1929. The differentiation of the species of genus *Brucella*. Michigan State College Agricultural Experimental Station Technical Bulletin 100:1–16.

57. **Szyfres PNAB.** 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales Tercera edición ed, vol. I. Bacteriosis y Micosis. Organización Panamericana de la Salud; OMS.
58. **Anon.** 2003. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 12th ed. Office International des Epizooties, Paris.
59. **Carrillo CG.** 1990. Animal and human brucellosis in the Americas. Office International des Epizooties.
60. **Moreno E.** 2002. Brucellosis in Central America. *Vet Microbiol* **90**:31-38.
61. **Baumgarten D.** 2002. Brucellosis: a short review of the disease situation in Paraguay. *Vet Microbiol* **90**:63-69.
62. **Luna-Martinez JE, Mejia-Teran C.** 2002. Brucellosis in Mexico: current status and trends. *Vet Microbiol* **90**:19-30.
63. **Poester FP, Goncalves VS, Lage AP.** 2002. Brucellosis in Brazil. *Vet Microbiol* **90**:55-62.
64. **Rivera SA, Ramirez MC, Lopetegui IP.** 2002. Eradication of bovine brucellosis in the 10th Region de Los Lagos, Chile. *Vet Microbiol* **90**:45-53.
65. **Francisco J, Vargas O.** 2002. Brucellosis in Venezuela. *Vet Microbiol* **90**:39-44.
66. **Samartino LE.** 2002. Brucellosis in Argentina. *Vet Microbiol* **90**:71-80.
67. **Wallach JC, Samartino LE, Efron A, Baldi PC.** 1997. Human infection by *Brucella melitensis*: an outbreak attributed to contact with infected goats. *FEMS Immunol Med Microbiol* **19**:315-321.
68. **Boeri E, Escobar GI, Ayala SM, Sosa-Estani S, Lucero NE.** 2008. [Canine brucellosis in dogs in the city of Buenos Aires]. *Medicina (B Aires)* **68**:291-297.
69. **Acha BSP.** 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales., 2nd. ed. Organización Panamericana de la Salud, Washington.
70. **Ko J, Splitter GA.** 2003. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev* **16**:65-78.
71. **Georgios Pappas MD, Nikolaos Akritidis, M.D., Mile Bosilkovski, M.D., and Epameinondas Tsianos, M.D.** 2005. Brucellosis. *New England Journal of Medicine* **Volume 352**:2325-2336.
72. **Xin X.** 1986. Orally administrable brucellosis vaccine: *Brucella suis* strain 2 vaccine. *Vaccine* **4**:212-216.
73. **Verger JM, Grayon M, Zundel E, Lechopier P, Olivier-Bernardin V.** 1995. Comparison of the efficacy of *Brucella suis* strain 2 and *Brucella melitensis* Rev. 1 live vaccines against a *Brucella melitensis* experimental infection in pregnant ewes. *Vaccine* **13**:191-196.
74. **Garin-Bastuji B, Blasco, J.M.** 2008. Caprine and ovine brucellosis (excluding *Brucella ovis*), p. 974–982, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals., 6th ed, Paris.
75. **Nielsen KE, D.R.** 2008. Bovine Brucellosis, p. 624–660, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Paris.
76. **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**:407-442.
77. **Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Jacob N.** 2005. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. *J Med Microbiol* **54**:457-461.
78. **Sohn AH, Probert WS, Glaser CA, Gupta N, Bollen AW, Wong JD, Grace EM, McDonald WC.** 2003. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerg Infect Dis* **9**:485-488.
79. **Young EJ.** 2005. Elsevier, Philadelphia.
80. **Manddell G.** 1995. Infectología, 4th. ed. Editorial Medica Panamericana, Madrid.

81. **Giannacopoulos I, Eliopoulou MI, Ziambaras T, Papanastasiou DA.** 2002. Transplacentally transmitted congenital brucellosis due to *Brucella abortus*. *J Infect* **45**:209-210.
82. **Mesner O, Riesenberk K, Biliar N, Borstein E, Bouhnik L, Peled N, Yagupsky P.** 2007. The many faces of human-to-human transmission of brucellosis: congenital infection and outbreak of nosocomial disease related to an unrecognized clinical case. *Clin Infect Dis* **45**:e135-140.
83. **Ruben B, Band JD, Wong P, Colville J.** 1991. Person-to-person transmission of *Brucella melitensis*. *Lancet* **337**:14-15.
84. **OMS.** 2000. Definiciones de caso:Brucelosis, Carbunco (Ántrax) y Rabia, Boletín Epidemiológico, vol. 21.
85. **Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL.** 2007. Human brucellosis. *Lancet Infect Dis* **7**:775-786.
86. **Lopez-Merino A.** 1989. Brucellosis in Latin America, p. 151-161. *In* Young EJ CM (ed.), *Brucellosis; clinical and laboratory aspects*. CRC Press Inc., Boca Raton.
87. **PANAFTOSA/OPS/OMS.** 2000, Rio de Janeiro, Brasil.
88. **Rivera-Salcedo F.** 2001. Seroprevalencia de *Brucella* en donantes de sangre. *Revista Peruana de Enfermedades Infecciosas y Tropicales* **1**.
89. **Atluri VL, Xavier MN, de Jong MF, den Hartigh AB, Tsolis RM.** 2011. Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts. *Annu Rev Microbiol* **65**:523-541.
90. **Spera JM, Ugalde JE, Mucci J, Comerci DJ, Ugalde RA.** 2006. A B lymphocyte mitogen is a *Brucella abortus* virulence factor required for persistent infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:16514-16519.
91. **Madkour MM.** 2001. *Madkour's Brucellosis*, 2 nd ed. ed. Springer-Verlag.
92. **Akritidis N, Tzivras M, Delladetsima I, Stefanaki S, Moutsopoulos HM, Pappas G.** 2007. The liver in brucellosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* **5**:1109-1112.
93. **Corbel MJ, Banai, M.** 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2 (part C), vol. 2. Springer.
94. **Baldi PC, Giambartolomei GH.** 2013. Immunopathology of *Brucella* infection. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* **8**:18-26.
95. **Nusrat H.** 2004. Disease specific diagnostic methods and lymphokines in human brucellosis. University of Karachi.
96. **Bossi P, Tegnell A, Baka A, Van Loock F, Hendriks J, Werner A, Maidhof H, Gouvras G.** 2004. Bichat guidelines for the clinical management of brucellosis and bioterrorism-related brucellosis. *Euro Surveill* **9**:E15-16.
97. **Pappas G, Panagopoulou P, Christou L, Akritidis N.** 2006. *Brucella* as a biological weapon. *Cell Mol Life Sci* **63**:2229-2236.
98. **Kaufmann AF, Meltzer MI, Schmid GP.** 1997. The economic impact of a bioterrorist attack: are prevention and postattack intervention programs justifiable? *Emerg Infect Dis* **3**:83-94.
99. **Canada PHA**o 2011, posting date. *Brucella* spp. (*B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. suis*) - Material Safety Data Sheets (MSDS) Public Health Agency of Canada. [Online.]
100. **Gorvel JP.** 2008. *Brucella*: a Mr "Hide" converted into Dr Jekyll. *Microbes Infect* **10**:1010-1013.
101. **Kohler S, Foulongne, V., Ouahrani-Bettache, S., Bourg, G., Teyssier, J., Ramuz, M., Liautard, J.P.** 2002. The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

102. **Kohler S, Michaux-Charachon S, Porte F, Ramuz M, Liautard JP.** 2003. What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named *Brucella*? Trends Microbiol **11**:215-219.
103. **Roop RM, 2nd, Bellaire BH, Valderas MW, Cardelli JA.** 2004. Adaptation of the Brucellae to their intracellular niche. Mol Microbiol **52**:621-630.
104. **Anon.** 1986. Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis. World Health Organisation.
105. **Ersoy Y, Sonmez E, Tevfik MR, But AD.** 2005. Comparison of three different combination therapies in the treatment of human brucellosis. Trop Doct **35**:210-212.
106. **Detilleux PG, Deyoe BL, Cheville NF.** 1990. Entry and intracellular localization of *Brucella* spp. in Vero cells: fluorescence and electron microscopy. Vet Pathol **27**:317-328.
107. **Solera J, Beato JL, Martinez-Alfaro E, Segura JC, de Tomas E.** 2001. Azithromycin and gentamicin therapy for the treatment of humans with brucellosis. Clin Infect Dis **32**:506-509.
108. **Nora VR, Santiago, S.V., Jauma, V.M., Elisa, E.S.D.V., Maria Jose, B.P., David, G.F., Edurne, I.I.** 2009. Use of ionic complex of gentamicin: AOT for the treatment of brucellosis.
109. **Estein SM, Fiorentino MA, Paolicchi FA, Clausse M, Manazza J, Cassataro J, Giambartolomei GH, Coria LM, Zylberman V, Fossati CA, Kjekken R, Goldbaum FA.** 2009. The polymeric antigen BLSOmp31 confers protection against *Brucella ovis* infection in rams. Vaccine **27**:6704-6711.
110. **Cassataro J, Pasquevich KA, Estein SM, Laplagne DA, Velikovsky CA, de la Barrera S, Bowden R, Fossati CA, Giambartolomei GH, Goldbaum FA.** 2007. A recombinant subunit vaccine based on the insertion of 27 amino acids from Omp31 to the N-terminus of BLS induced a similar degree of protection against *B. ovis* than Rev.1 vaccination. Vaccine **25**:4437-4446.
111. **Goldbaum FA.** 2005. Isolated chimeric proteins of modifies lumazine synthase.
112. **Jenner DC, Atkins, H.S.** 2011. Vaccine for brucellosis.
113. **Lucero NE, Foglia L, Ayala SM, Gall D, Nielsen K.** 1999. Competitive enzyme immunoassay for diagnosis of human brucellosis. J Clin Microbiol **37**:3245-3248.
114. **Margni RA GM, Miranda SE.** 2002. Los anticuerpos ¿beneficiosos o perjudiciales para el huésped? Importancia de su identificación y dosaje. Acta Bioquím Clín Latinoam **36**:113-121.
115. **Rajashekara G, Glover DA, Krepps M, Splitter GA.** 2005. Temporal analysis of pathogenic events in virulent and avirulent *Brucella melitensis* infections. Cell Microbiol **7**:1459-1473.
116. **Baldwin CL, Winter AJ.** 1994. Macrophages and *Brucella*. Immunol Ser **60**:363-380.
117. **Detilleux PG, Deyoe BL, Cheville NF.** 1990. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells *in vitro*. Infect Immun **58**:2320-2328.
118. **Roop RM, 2nd, Gaines JM, Anderson ES, Caswell CC, Martin DW.** 2009. Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. Med Microbiol Immunol **198**:221-238.
119. **Billard E, Cazevielle C, Dornand J, Gross A.** 2005. High susceptibility of human dendritic cells to invasion by the intracellular pathogens *Brucella suis*, *B. abortus*, and *B. melitensis*. Infect Immun **73**:8418-8424.
120. **Pizarro-Cerda J, Meresse S, Parton RG, van der Goot G, Sola-Landa A, Lopez-Goni 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.
121. **Sangari FJ, Aguero J.** 1996. Molecular basis of *Brucella* pathogenicity: an update. Microbiologia **12**:207-218.
122. **Pizarro-Cerda J, Moreno E, Sanguedolce V, Mege JL, Gorvel JP.** 1998. Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. Infect Immun **66**:2387-2392.

123. Arenas GN, Staskevich AS, Aballay A, Mayorga LS. 2000. Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. *Infect Immun* **68**:4255-4263.
124. Watarai M, Makino S, Fujii Y, Okamoto K, Shirahata T. 2002. Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell Microbiol* **4**:341-355.
125. Naroeni A, Porte F. 2002. Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry and short-term survival of *Brucella suis* in murine macrophages. *Infect Immun* **70**:1640-1644.
126. Lapaque N, Moriyon I, Moreno E, Gorvel JP. 2005. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol* **8**:60-66.
127. Naroeni A, Jouy N, Ouahrani-Bettache S, Liautard JP, Porte F. 2001. *Brucella suis*-impaired specific recognition of phagosomes by lysosomes due to phagosomal membrane modifications. *Infect Immun* **69**:486-493.
128. Celli J, de Chastellier C, Franchini DM, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel JP. 2003. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* **198**:545-556.
129. Celli J, Gorvel JP. 2004. Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Microbiol* **7**:93-97.
130. Porte F, Liautard JP, Kohler S. 1999. Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect Immun* **67**:4041-4047.
131. Arellano-Reynoso B, Lapaque N, Salcedo S, Briones G, Ciocchini AE, Ugalde R, Moreno E, Moriyon I, Gorvel JP. 2005. Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol* **6**:618-625.
132. Comerci DJ, Martinez-Lorenzo MJ, Sieira R, Gorvel JP, Ugalde RA. 2001. Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell Microbiol* **3**:159-168.
133. Starr T, Ng TW, Wehrly TD, Knodler LA, Celli J. 2008. *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic* **9**:678-694.
134. Peterson JW. 1996. In Baron S (ed.), *Medical Microbiology*, 4th edition, Texas.
135. Moreno E, Moriyon I. 2002. *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:1-3.
136. Moreno E, and I. Moriyón. 2002. Genus *Brucella* In Dworkin M (ed.), *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. Springer, Nueva York.
137. Moriyon I, Lopez-Goni I. 1998. Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Int Microbiol* **1**:19-26.
138. Perry MB, and D. R. Bundle. 1990. Lipopolysaccharide antigens and carbohydrates of *Brucella*, p. 76–88. In Adams LG (ed.), *Advances in brucellosis research*. Texas A&M University Press.
139. Bundle DR, Cherwonogrodzky JW, Perry MB. 1987. The structure of the lipopolysaccharide O-chain (M antigen) and polysaccharide B produced by *Brucella melitensis* 16M. *FEBS Lett* **216**:261-264.
140. Meikle PJ, Perry MB, Cherwonogrodzky JW, Bundle DR. 1989. Fine structure of A and M antigens from *Brucella* biovars. *Infect Immun* **57**:2820-2828.
141. Haag AF, Myka KK, Arnold MF, Caro-Hernandez P, Ferguson GP. 2010. Importance of Lipopolysaccharide and Cyclic beta-1,2-Glucans in *Brucella*-Mammalian Infections. *Int J Microbiol* **2010**:124509.
142. Freer E, Moreno E, Moriyon I, Pizarro-Cerda J, Weintraub A, Gorvel JP. 1996. *Brucella-Salmonella* lipopolysaccharide chimeras are less permeable to hydrophobic probes and more sensitive to cationic peptides and EDTA than are their native *Brucella* sp. counterparts. *J Bacteriol* **178**:5867-5876.

143. **Velasco J, Bengoechea JA, Brandenburg K, Lindner B, Seydel U, Gonzalez D, Zahringer U, Moreno E, Moriyon I.** 2000. *Brucella abortus* and its closest phylogenetic relative, *Ochrobactrum* spp., differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance. *Infect Immun* **68**:3210-3218.
144. **Berman DT, Kurtz RS.** 1987. Relationship of biological activities to structures of *Brucella abortus* endotoxin and LPS. *Ann Inst Pasteur Microbiol* **138**:98-101.
145. **Moreno E, Berman DT, Boettcher LA.** 1981. Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infect Immun* **31**:362-370.
146. **Cardoso PG, Macedo GC, Azevedo V, Oliveira SC.** 2006. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb Cell Fact* **5**:13.
147. **Goldstein J, Hoffman T, Frasch C, Lizzio EF, Beining PR, Hochstein D, Lee YL, Angus RD, Golding B.** 1992. Lipopolysaccharide (LPS) from *Brucella abortus* is less toxic than that from *Escherichia coli*, suggesting the possible use of *B. abortus* or LPS from *B. abortus* as a carrier in vaccines. *Infect Immun* **60**:1385-1389.
148. **Giambartolomei GH, Zwerdling A, Cassataro J, Bruno L, Fossati CA, Philipp MT.** 2004. Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. *J Immunol* **173**:4635-4642.
149. **Iwasaki A, Medzhitov R.** 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* **5**:987-995.
150. **Lapaque N, Takeuchi O, Corrales F, Akira S, Moriyon I, Howard JC, Gorvel JP.** 2006. Differential inductions of TNF-alpha and IGTP, IIGP by structurally diverse classic and non-classic lipopolysaccharides. *Cell Microbiol* **8**:401-413.
151. **Fernandez-Prada CM, Zelazowska EB, Nikolich M, Hadfield TL, Roop RM, 2nd, Robertson GL, Hoover DL.** 2003. Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O-Polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. *Infect Immun* **71**:2110-2119.
152. **Porte F, Naroeni A, Ouahrani-Bettache S, Liautard JP.** 2003. Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect Immun* **71**:1481-1490.
153. **Ugalde JE, Czibener C, Feldman MF, Ugalde RA.** 2000. Identification and characterization of the *Brucella abortus* phosphoglucomutase gene: role of lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication. *Infect Immun* **68**:5716-5723.
154. **Wanke MM.** 2004. Canine brucellosis. *Anim Reprod Sci* **82-83**:195-207.
155. **Martinez de Tejada G, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Moriyon I.** 1995. The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infect Immun* **63**:3054-3061.
156. **Schurig GG, Pringle AT, Breese SS, Jr.** 1981. Localization of *brucella* antigens that elicit a humoral immune response in *Brucella abortus*-infected cells. *Infect Immun* **34**:1000-1007.
157. **Weber A, Schiefer HG, Krauss H.** 1978. [Electron microscope differentiation of S and R variants of *Brucella* by treatment with polycationic ferritin]. *Zentralbl Veterinarmed B* **25**:324-328.
158. **Freer E, Pizarro-Cerda J, Weintraub A, Bengoechea JA, Moriyon I, Hultenby K, Gorvel JP, Moreno E.** 1999. The outer membrane of *Brucella ovis* shows increased permeability to hydrophobic probes and is more susceptible to cationic peptides than are the outer membranes of mutant rough *Brucella abortus* strains. *Infect Immun* **67**:6181-6186.
159. **Martinez-Morales F, Schobert M, Lopez-Lara IM, Geiger O.** 2003. Pathways for phosphatidylcholine biosynthesis in bacteria. *Microbiology* **149**:3461-3471.
160. **Comerci DJ, Altabe S, de Mendoza D, Ugalde RA.** 2006. *Brucella abortus* synthesizes phosphatidylcholine from choline provided by the host. *J Bacteriol* **188**:1929-1934.

161. **Martinez de Tejada G, Moriyon I.** 1993. The outer membranes of *Brucella* spp. are not barriers to hydrophobic permeants. *J Bacteriol* **175**:5273-5275.
162. **Moriyon I, Berman DT.** 1982. Effects of nonionic, ionic, and dipolar ionic detergents and EDTA on the *Brucella* cell envelope. *J Bacteriol* **152**:822-828.
163. **Tibor A, Weynants V, Denoel P, Lichtfouse B, De Bolle X, Saman E, Limet JN, Letesson JJ.** 1994. Molecular cloning, nucleotide sequence, and occurrence of a 16.5-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus* with similarity to pal lipoproteins. *Infect Immun* **62**:3633-3639.
164. **Tibor A, Saman E, de Wergifosse P, Cloeckert A, Limet JN, Letesson JJ.** 1996. Molecular characterization, occurrence, and immunogenicity in infected sheep and cattle of two minor outer membrane proteins of *Brucella abortus*. *Infect Immun* **64**:100-107.
165. **Tibor A, Wansard V, Bielartz V, Delrue RM, Danese I, Michel P, Walravens K, Godfroid J, Letesson JJ.** 2002. Effect of omp10 or omp19 deletion on *Brucella abortus* outer membrane properties and virulence in mice. *Infect Immun* **70**:5540-5546.
166. **Tatum FM, Detilleux PG, Sacks JM, Halling SM.** 1992. Construction of Cu-Zn superoxide dismutase deletion mutants of *Brucella abortus*: analysis of survival in vitro in epithelial and phagocytic cells and in vivo in mice. *Infect Immun* **60**:2863-2869.
167. **Sha Z, Stabel TJ, Mayfield JE.** 1994. *Brucella abortus* catalase is a periplasmic protein lacking a standard signal sequence. *J Bacteriol* **176**:7375-7377.
168. **Haine V, Dozot M, Dornand J, Letesson JJ, De Bolle X.** 2006. NnrA is required for full virulence and regulates several *Brucella melitensis* denitrification genes. *J Bacteriol* **188**:1615-1619.
169. **Delpino MV, Marchesini MI, Estein SM, Comerci DJ, Cassataro J, Fossati CA, Baldi PC.** 2007. A bile salt hydrolase of *Brucella abortus* contributes to the establishment of a successful infection through the oral route in mice. *Infect Immun* **75**:299-305.
170. **Zorreguieta A, Ugalde RA.** 1986. Formation in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. of a 235-kilodalton protein intermediate in beta-D(1-2) glucan synthesis. *J Bacteriol* **167**:947-951.
171. **Ugalde RA.** 1999. Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. Common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts. *Microbes Infect* **1**:1211-1219.
172. **Guidolin LS, Ciochini AE, Inon de Iannino N, Ugalde RA.** 2009. Functional mapping of *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan synthase: identification of the protein domain required for cyclization. *J Bacteriol* **191**:1230-1238.
173. **Geremia RA, Cavaignac S, Zorreguieta A, Toro N, Olivares J, Ugalde RA.** 1987. A *Rhizobium meliloti* mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharide but fails to form beta-(1----2) glucan. *J Bacteriol* **169**:880-884.
174. **Briones G, Inon de Iannino N, Roset M, Vigliocco A, Paulo PS, Ugalde RA.** 2001. *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. *Infect Immun* **69**:4528-4535.
175. **Martirosyan A, Perez-Gutierrez C, Banchereau R, Dutartre H, Lecine P, Dullaers M, Mello M, Salcedo SP, Muller A, Leserman L, Levy Y, Zurawski G, Zurawski S, Moreno E, Moriyon I, Klechevsky E, Banchereau J, Oh S, Gorvel JP.** 2012. *Brucella* beta 1,2 cyclic glucan is an activator of human and mouse dendritic cells. *PLoS Pathog* **8**:e1002983.
176. **Cascales E, Christie PJ.** 2003. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* **1**:137-149.
177. **Christie PJ, Vogel JP.** 2000. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol* **8**:354-360.
178. **Delrue RM, Martinez-Lorenzo M, Lestrade P, Danese I, Bielartz V, Mertens P, De Bolle X, Tibor A, Gorvel JP, Letesson JJ.** 2001. Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol* **3**:487-497.

179. **O'Callaghan D, Cazevieille C, Allardet-Servent A, Boschioli ML, Bourg G, Foulongne V, Frutos P, Kulakov Y, Ramuz M.** 1999. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol Microbiol* **33**:1210-1220.
180. **Sieira R, Comerci DJ, Sanchez DO, Ugalde RA.** 2000. A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *J Bacteriol* **182**:4849-4855.
181. **de Jong MF, Starr T, Winter MG, den Hartigh AB, Child R, Knodler LA, van Dijnl JM, Celli J, Tsolis RM.** 2013. Sensing of bacterial type IV secretion via the unfolded protein response. *MBio* **4**:e00418-00412.
182. **Christie PJ.** 2001. Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol Microbiol* **40**:294-305.
183. **Marchesini MI, Herrmann CK, Salcedo SP, Gorvel JP, Comerci DJ.** 2011. In search of *Brucella abortus* type IV secretion substrates: screening and identification of four proteins translocated into host cells through VirB system. *Cell Microbiol* **13**:1261-1274.
184. **de Jong MF, Sun YH, den Hartigh AB, van Dijnl JM, Tsolis RM.** 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.
185. **de Bary M, Jamet A, Filopon D, Nicolas C, Laloux G, Rual JF, Muller A, Twizere JC, Nkengfac B, Vandenhoute J, Hill DE, Salcedo SP, Gorvel JP, Letesson JJ, De Bolle X.** 2011. Identification of a *Brucella* spp. secreted effector specifically interacting with human small GTPase Rab2. *Cell Microbiol* **13**:1044-1058.
186. **Dohmer PH, Valguarnera E, Czibener C, Ugalde JE.** 2013. Identification of a type IV secretion substrate of *Brucella abortus* that participates in the early stages of intracellular survival. *Cell Microbiol*.
187. **Myeni S, Child R, Ng TW, Kupko JJ, 3rd, Wehrly TD, Porcella SF, Knodler LA, Celli J.** 2013. *Brucella* modulates secretory trafficking via multiple type IV secretion effector proteins. *PLoS Pathog* **9**:e1003556.
188. **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**:12375-12380.
189. **Lamontagne J, Butler H, Chaves-Olarte E, Hunter J, Schirm M, Paquet C, Tian M, Kearney P, Hamaidi L, Chelsky D, Moriyon I, Moreno E, Paramithiotis E.** 2007. Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*. *J Proteome Res* **6**:1519-1529.
190. **Manterola L, Moriyon I, Moreno E, Sola-Landa A, Weiss DS, Koch MH, Howe J, Brandenburg K, Lopez-Goni I.** 2005. The lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR mutants contains lipid A modifications and has higher affinity for bactericidal cationic peptides. *J Bacteriol* **187**:5631-5639.
191. **Sola-Landa A, Pizarro-Cerda J, Grillo MJ, Moreno E, Moriyon I, Blasco JM, Gorvel JP, Lopez-Goni I.** 1998. A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol Microbiol* **29**:125-138.
192. **Martinez-Nunez C, Altamirano-Silva P, Alvarado-Guillen F, Moreno E, Guzman-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*. *J Bacteriol* **192**:5603-5608.

193. **Braibant M, Guilloteau L, Zygmunt MS.** 2002. Functional characterization of *Brucella melitensis* NorMI, an efflux pump belonging to the multidrug and toxic compound extrusion family. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:3050-3053.
194. **Posadas DM, Martin FA, Sabio y Garcia JV, Spera JM, Delpino MV, Baldi P, Campos E, Cravero SL, Zorreguieta A.** 2007. The TolC homologue of *Brucella suis* is involved in resistance to antimicrobial compounds and virulence. *Infect Immun* **75**:379-389.
195. **Martin FA, Posadas DM, Carrica MC, Cravero SL, O'Callaghan D, Zorreguieta A.** 2009. Interplay between two RND systems mediating antimicrobial resistance in *Brucella suis*. *J Bacteriol* **191**:2530-2540.
196. **Finlay BB, Cossart P.** 1997. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* **276**:718-725.
197. **Lyskowski A, Leo JC, Goldman A.** 2011. Structure and biology of trimeric autotransporter adhesins. *Adv Exp Med Biol* **715**:143-158.
198. **Klemm P, Vejborg RM, Hancock V.** 2010. Prevention of bacterial adhesion. *Appl Microbiol Biotechnol* **88**:451-459.
199. **Dersch P.** 2003. *Host Response Mechanisms in Infectious Diseases*, vol. 10.
200. **Finlay BB, Falkow S.** 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**:136-169.
201. **Pizarro-Cerda J, Cossart P.** 2006. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* **124**:715-727.
202. **Bliska JB, Copass MC, Falkow S.** 1993. The *Yersinia pseudotuberculosis* adhesin YadA mediates intimate bacterial attachment to and entry into HEp-2 cells. *Infect Immun* **61**:3914-3921.
203. **Isberg RR.** 1991. Discrimination between intracellular uptake and surface adhesion of bacterial pathogens. *Science* **252**:934-938.
204. **Moulder JW.** 1985. Comparative biology of intracellular parasitism. *Microbiol Rev* **49**:298-337.
205. **Grutzkau A, Hanski C, Hahn H, Riecken EO.** 1990. Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut* **31**:1011-1015.
206. **Dersch P.** 2003. Molecular and Cellular Mechanisms of Bacterial Entry into Host Cells, p. 183-209. *In* H H (ed.), *Host Response Mechanisms in Infectious Diseases*, vol. 10.
207. **Falkow S, Isberg RR, Portnoy DA.** 1992. The interaction of bacteria with mammalian cells. *Annu Rev Cell Biol* **8**:333-363.
208. **Castaneda-Roldan EI, Ouahrani-Bettache S, Saldana Z, Avelino F, Rendon MA, Dornand J, Giron JA.** 2006. Characterization of SP41, a surface protein of *Brucella* associated with adherence and invasion of host epithelial cells. *Cell Microbiol* **8**:1877-1887.
209. **Eitel J, Dersch P.** 2002. The YadA protein of *Yersinia pseudotuberculosis* mediates high-efficiency uptake into human cells under environmental conditions in which invasin is repressed. *Infect Immun* **70**:4880-4891.
210. **Kline KA, Falker S, Dahlberg S, Normark S, Henriques-Normark B.** 2009. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe* **5**:580-592.
211. **Friberg N, Carlson P, Kentala E, Mattila PS, Kuusela P, Meri S, Jarva H.** 2008. Factor H binding as a complement evasion mechanism for an anaerobic pathogen, *Fusobacterium necrophorum*. *J Immunol* **181**:8624-8632.
212. **Frick IM, Akesson P, Herwald H, Morgelin M, Malmsten M, Nagler DK, Bjorck L.** 2006. The contact system--a novel branch of innate immunity generating antibacterial peptides. *Embo J* **25**:5569-5578.

213. **Schilling JD, Mulvey MA, Hultgren SJ.** 2001. Structure and function of *Escherichia coli* type 1 pili: new insight into the pathogenesis of urinary tract infections. *J Infect Dis* **183 Suppl 1**:S36-40.
214. **Economou A.** 1999. Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends Microbiol* **7**:315-320.
215. **Mori H, Ito K.** 2001. The Sec protein-translocation pathway. *Trends Microbiol* **9**:494-500.
216. **Herskovits AA, Bochkareva ES, Bibi E.** 2000. New prospects in studying the bacterial signal recognition particle pathway. *Mol Microbiol* **38**:927-939.
217. **Robinson C, Bolhuis A.** 2001. Protein targeting by the twin-arginine translocation pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:350-356.
218. **Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D.** 2004. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**:692-744.
219. **Dautin N, Bernstein HD.** 2007. Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu Rev Microbiol* **61**:89-112.
220. **Klauser T, Pohlner J, Meyer TF.** 1992. Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by *Escherichia coli*: dissection of Neisseria Iga beta-mediated outer membrane transport. *Embo J* **11**:2327-2335.
221. **Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP.** 1998. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol* **6**:370-378.
222. **Yen MR, Peabody CR, Partovi SM, Zhai Y, Tseng YH, Saier MH.** 2002. Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1562**:6-31.
223. **Henderson IR, Nataro JP.** 2001. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* **69**:1231-1243.
224. **Cotter SE, Surana NK, St Geme JW, 3rd.** 2005. Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins. *Trends Microbiol* **13**:199-205.
225. **Desvaux M, Parham NJ, Henderson IR.** 2004. Type V protein secretion: simplicity gone awry? *Curr Issues Mol Biol* **6**:111-124.
226. **Surana NK, Cutter D, Barenkamp SJ, St Geme JW, 3rd.** 2004. The *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter contains an unusually short trimeric translocator domain. *J Biol Chem* **279**:14679-14685.
227. **Oomen CJ, van Ulsen P, van Gelder P, Feijen M, Tommassen J, Gros P.** 2004. Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *Embo J* **23**:1257-1266.
228. **Sherlock O, Vejborg RM, Klemm P.** 2005. The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. *Infect Immun* **73**:1954-1963.
229. **Lindenthal C, Elsinghorst EA.** 2001. Enterotoxigenic *Escherichia coli* TibA glycoprotein adheres to human intestine epithelial cells. *Infect Immun* **69**:52-57.
230. **Elsinghorst EA, Weitz JA.** 1994. Epithelial cell invasion and adherence directed by the enterotoxigenic *Escherichia coli* tib locus is associated with a 104-kilodalton outer membrane protein. *Infect Immun* **62**:3463-3471.
231. **Berge A, Kihlberg BM, Sjöholm AG, Björck L.** 1997. Streptococcal protein H forms soluble complement-activating complexes with IgG, but inhibits complement activation by IgG-coated targets. *J Biol Chem* **272**:20774-20781.
232. **Ochiai K, Kurita-Ochiai T, Kamino Y, Ikeda T.** 1993. Effect of co-aggregation on the pathogenicity of oral bacteria. *J Med Microbiol* **39**:183-190.
233. **Jain S, van Ulsen P, Benz I, Schmidt MA, Fernandez R, Tommassen J, Goldberg MB.** 2006. Polar localization of the autotransporter family of large bacterial virulence proteins. *J Bacteriol* **188**:4841-4850.

234. **Brandon LD, Goehring N, Janakiraman A, Yan AW, Wu T, Beckwith J, Goldberg MB.** 2003. IcsA, a polarly localized autotransporter with an atypical signal peptide, uses the Sec apparatus for secretion, although the Sec apparatus is circumferentially distributed. *Mol Microbiol* **50**:45-60.
235. **Charles M, Perez M, Kobil JH, Goldberg MB.** 2001. Polar targeting of Shigella virulence factor IcsA in *Enterobacteriaceae* and *Vibrio*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:9871-9876.
236. **Cotter SE, Surana NK, Grass S, St Geme JW, 3rd.** 2006. Trimeric autotransporters require trimerization of the passenger domain for stability and adhesive activity. *J Bacteriol* **188**:5400-5407.
237. **Linke D, Riess T, Autenrieth IB, Lupas A, Kempf VA.** 2006. Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. *Trends Microbiol* **14**:264-270.
238. **Roggenkamp A, Ackermann N, Jacobi CA, Truelzsch K, Hoffmann H, Heesemann J.** 2003. Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. *J Bacteriol* **185**:3735-3744.
239. **Meng G, Surana NK, St Geme JW, 3rd, Waksman G.** 2006. Structure of the outer membrane translocator domain of the *Haemophilus influenzae* Hia trimeric autotransporter. *Embo J* **25**:2297-2304.
240. **Meng G, St Geme JW, 3rd, Waksman G.** 2008. Repetitive architecture of the *Haemophilus influenzae* Hia trimeric autotransporter. *J Mol Biol* **384**:824-836.
241. **Nummelin H, Merckel MC, Leo JC, Lankinen H, Skurnik M, Goldman A.** 2004. The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll. *Embo J* **23**:701-711.
242. **Yeo HJ, Cotter SE, Laarmann S, Juehne T, St Geme JW, 3rd, Waksman G.** 2004. Structural basis for host recognition by the *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter. *Embo J* **23**:1245-1256.
243. **Kirjavainen V, Jarva H, Biedzka-Sarek M, Blom AM, Skurnik M, Meri S.** 2008. *Yersinia enterocolitica* serum resistance proteins YadA and ail bind the complement regulator C4b-binding protein. *PLoS Pathog* **4**:e1000140.
244. **El Tahir Y, Skurnik M.** 2001. YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. *Int J Med Microbiol* **291**:209-218.
245. **Koretke KK, Szczesny P, Gruber M, Lupas AN.** 2006. Model structure of the prototypical non-fimbrial adhesin YadA of *Yersinia enterocolitica*. *J Struct Biol* **155**:154-161.
246. **St Geme JW, 3rd, Cutter D.** 2000. The *Haemophilus influenzae* Hia adhesin is an autotransporter protein that remains uncleaved at the C terminus and fully cell associated. *J Bacteriol* **182**:6005-6013.
247. **Roggenkamp A, Neuberger HR, Flugel A, Schmoll T, Heesemann J.** 1995. Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Mol Microbiol* **16**:1207-1219.
248. **Tamm A, Tarkkanen AM, Korhonen TK, Kuusela P, Toivanen P, Skurnik M.** 1993. Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the YadA protein of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **10**:995-1011.
249. **Visser LG, Hiemstra PS, van den Barselaar MT, Ballieux PA, van Furth R.** 1996. Role of YadA in resistance to killing of *Yersinia enterocolitica* by antimicrobial polypeptides of human granulocytes. *Infect Immun* **64**:1653-1658.
250. **Hoiczuk E, Roggenkamp A, Reichenbecher M, Lupas A, Heesemann J.** 2000. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *Embo J* **19**:5989-5999.
251. **Szczesny P, Lupas A.** 2008. Domain annotation of trimeric autotransporter adhesins--daTAA. *Bioinformatics* **24**:1251-1256.

252. **Lortat-Jacob H, Chouin E, Cusack S, van Raaij MJ.** 2001. Kinetic analysis of adenovirus fiber binding to its receptor reveals an avidity mechanism for trimeric receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* **276**:9009-9015.
253. **Castaneda-Roldan EI, Avelino-Flores F, Dall'Agnol M, Freer E, Cedillo L, Dornand J, Giron JA.** 2004. Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. *Cell Microbiol* **6**:435-445.
254. **Czibener C, Ugalde JE.** 2012. Identification of a unique gene cluster of *Brucella* spp. that mediates adhesion to host cells. *Microbes Infect* **14**:79-85.
255. **Hernandez-Castro R, Verdugo-Rodriguez A, Puente JL, Suarez-Guemes F.** 2008. The BMEI0216 gene of *Brucella melitensis* is required for internalization in HeLa cells. *Microb Pathog* **44**:28-33.
256. **Posadas DM.** 2010. Transporte y adhesión en *B. suis*: rol de una proteína de la familia TolC en el eflujo de compuestos tóxicos y de tres posibles adhesinas en la colonización del hospedador. Universidad de Buenos Aires, C.A.B.A.
257. **Godefroid M, Svensson MV, Cambier P, Uzureau S, Mirabella A, De Bolle X, Van Cutsem P, Widmalm G, Letesson JJ.** 2010. *Brucella melitensis* 16M produces a mannan and other extracellular matrix components typical of a biofilm. *FEMS Immunol Med Microbiol* **59**:364-377.
258. **Enright FM.** 1990. The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals, p. 301-320, *Animal brucellosis*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
259. **Rocha-Gracia R. del C, Castaneda-Roldan EI, Giono-Cerezo S, Giron JA.** 2002. *Brucella* sp. bind to sialic acid residues on human and animal red blood cells. *FEMS Microbiol Lett* **213**:219-224.
260. **Rocha-Gracia R. C, Castaneda-Roldan EI, Giono-Cerezo S, Giron JA.** 2002. *Brucella* sp. bind to sialic acid residues on human and animal red blood cells. *FEMS Microbiol Lett* **213**:219-224.
261. **Bandara AB, Sriranganathan N, Schurig GG, Boyle SM.** 2005. Putative outer membrane autotransporter protein influences survival of *Brucella suis* in BALB/c mice. *Vet Microbiol* **109**:95-104.
262. **Posadas DM, Ruiz-Ranwez V, Bonomi HR, Martin FA, Zorreguieta A.** 2012. BmaC, a novel autotransporter of *Brucella suis*, is involved in bacterial adhesion to host cells. *Cell Microbiol* **14**:965-982.
263. **Ficht T.** 2010. *Brucella* taxonomy and evolution. *Future Microbiol* **5**:859-866.
264. **Parkhill J, Wren BW, Thomson NR, Titball RW, Holden MT, Prentice MB, Sebahia M, James KD, Churcher C, Mungall KL, Baker S, Basham D, Bentley SD, Brooks K, Cerdano-Tarraga AM, Chillingworth T, Cronin A, Davies RM, Davis P, Dougan G, Feltwell T, Hamlin N, Holroyd S, Jagels K, Karlyshev AV, Leather S, Moule S, Oyston PC, Quail M, Rutherford K, Simmonds M, Skelton J, Stevens K, Whitehead S, Barrell BG.** 2001. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* **413**:523-527.
265. **Parkhill J, Sebahia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, Holden MT, Churcher CM, Bentley SD, Mungall KL, Cerdano-Tarraga AM, Temple L, James K, Harris B, Quail MA, Achtman M, Atkin R, Baker S, Basham D, Bason N, Cherevach I, Chillingworth T, Collins M, Cronin A, Davis P, Doggett J, Feltwell T, Goble A, Hamlin N, Hauser H, Holroyd S, Jagels K, Leather S, Moule S, Norberczak H, O'Neil S, Ormond D, Price C, Rabinowitsch E, Rutter S, Sanders M, Saunders D, Seeger K, Sharp S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Unwin L, Whitehead S, Barrell BG, Maskell DJ.** 2003. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet* **35**:32-40.

266. **Delpino MV, Fossati CA, Baldi PC.** 2009. Proinflammatory response of human osteoblastic cell lines and osteoblast-monocyte interaction upon infection with *Brucella* spp. *Infect Immun* **77**:984-995.
267. **Scian R, Barrionuevo P, Giambartolomei GH, De Simone EA, Vanzulli SI, Fossati CA, Baldi PC, Delpino MV.** 2011. Potential role of fibroblast-like synoviocytes in joint damage induced by *Brucella abortus* infection through production and induction of matrix metalloproteinases. *Infect Immun* **79**:3619-3632.
268. **Schafer A, Tauch A, Jager W, Kalinowski J, Thierbach G, Puhler A.** 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**:69-73.
269. **Cheng HP, Walker GC.** 1998. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **180**:5183-5191.
270. **Kovach ME, Phillips RW, Elzer PH, Roop RM, 2nd, Peterson KM.** 1994. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* **16**:800-802.
271. **Sambrook J, Russell DW.** 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
272. **Jacobsson K, Rosander A, Bjerketorp J, Frykberg L.** 2003. Shotgun Phage Display - Selection for Bacterial Receptors or other Exported Proteins. *Biol Proced Online* **5**:123-135.
273. **Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG.** 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**:2947-2948.
274. **EMBL-EBI**, posting date. EMBOSS Needle. [Online.]
275. **Punta M, Coghill PC, Eberhardt RY, Mistry J, Tate J, Boursnell C, Pang N, Forslund K, Ceric G, Clements J, Heger A, Holm L, Sonnhammer EL, Eddy SR, Bateman A, Finn RD.** 2012. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **40**:D290-301.
276. **Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**:3389-3402.
277. **Kanehisa M, Goto S.** 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* **28**:27-30.
278. **Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S.** 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**:783-795.
279. **Bagos PG, Nikolaou EP, Liakopoulos TD, Tsirigos KD.** 2010. Combined prediction of Tat and Sec signal peptides with hidden Markov models. *Bioinformatics* **26**:2811-2817.
280. **Chou KC, Shen HB.** 2006. Large-scale predictions of gram-negative bacterial protein subcellular locations. *J Proteome Res* **5**:3420-3428.
281. **Magnus M, Pawlowski M, Bujnicki JM.** 2012. MetaLocGramN: A meta-predictor of protein subcellular localization for Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1824**:1425-1433.
282. **Imai K, Asakawa N, Tsuji T, Akazawa F, Ino A, Sonoyama M, Mitaku S.** 2008. SOSUI-GramN: high performance prediction for sub-cellular localization of proteins in gram-negative bacteria. *Bioinformatics* **2**:417-421.
283. **Yu CS, Lin CJ, Hwang JK.** 2004. Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. *Protein Sci* **13**:1402-1406.
284. **Yu NY, Wagner JR, Laird MR, Melli G, Rey S, Lo R, Dao P, Sahinalp SC, Ester M, Foster LJ, Brinkman FS.** 2010. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* **26**:1608-1615.

285. **Moller S, Croning MD, Apweiler R.** 2001. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics* **17**:646-653.
286. **Stoffel KHW.** 1993. TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*
287. **Cserzo M, Wallin E, Simon I, von Heijne G, Elofsson A.** 1997. Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng* **10**:673-676.
288. **Jones DT, Taylor WR, Thornton JM.** 1994. A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology. *Biochemistry* **33**:3038-3049.
289. **Klingman KL, Murphy TF.** 1994. Purification and characterization of a high-molecular-weight outer membrane protein of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. *Infect Immun* **62**:1150-1155.
290. **Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
291. **Schagger H, von Jagow G.** 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**:368-379.
292. **Amero SA JT, Elgin SC.** 1988. Production of antibodies using proteins in gel bands., p. 355-362. *In* Walker JM (ed.), *Methods in Molecular Biology*. Department of Biology, Washington University, St. Louis, Missouri. , St. Louis, Missouri. .
293. **Bugler B, Caizergues-Ferrer M, Bouche G, Bourbon H, Amalric F.** 1982. Detection and localization of a class of proteins immunologically related to a 100-kDa nucleolar protein. *Eur J Biochem* **128**:475-480.
294. **Corbel M.J. GKPW, and Thomas E.I.** 1983. *Methods for the identification of Brucella*, p. 29, *Methods for the identification of Brucella*, London.
295. **Sekiguchi M, Iida S.** 1967. Mutants of *Escherichia coli* permeable to actinomycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**:2315-2320.
296. **Serruto D, Spadafina T, Scarselli M, Bambini S, Comanducci M, Hohle S, Kilian M, Veiga E, Cossart P, Oggioni MR, Savino S, Ferlenghi I, Taddei AR, Rappuoli R, Pizza M, Maignani V, Arico B.** 2009. HadA is an atypical new multifunctional trimeric coiled-coil adhesin of *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius*, which promotes entry into host cells. *Cell Microbiol* **11**:1044-1063.
297. **Heesemann J, Keller C, Morawa R, Schmidt N, Siemens HJ, Laufs R.** 1983. Plasmids of human strains of *Yersinia enterocolitica*: molecular relatedness and possible importance for pathogenesis. *J Infect Dis* **147**:107-115.
298. **Fine DP.** 1974. Activation of the classic and alternate complement pathways by endotoxin. *J Immunol* **112**:763-769.
299. **BioInfoBank_Institute**, posting date. Meta Server. [Online.]
300. **Conners R, Hill DJ, Borodina E, Agnew C, Daniell SJ, Burton NM, Sessions RB, Clarke AR, Catto LE, Lammie D, Wess T, Brady RL, Virji M.** 2008. The *Moraxella* adhesin UspA1 binds to its human CEACAM1 receptor by a deformable trimeric coiled-coil. *Embo J* **27**:1779-1789.
301. **Edwards TE, Phan I, Abendroth J, Dieterich SH, Masoudi A, Guo W, Hewitt SN, Kelley A, Leibly D, Brittnacher MJ, Staker BL, Miller SI, Van Voorhis WC, Myler PJ, Stewart LJ.** 2010. Structure of a *Burkholderia pseudomallei* trimeric autotransporter adhesin head. *PLoS One* **5**.
302. **Szczesny P, Linke D, Ursinus A, Bar K, Schwarz H, Riess TM, Kempf VA, Lupas AN, Martin J, Zeth K.** 2008. Structure of the head of the *Bartonella* adhesin BadA. *PLoS Pathog* **4**:e1000119.

303. **Crasta OR, Folkerts O, Fei Z, Mane SP, Evans C, Martino-Catt S, Bricker B, Yu G, Du L, Sobral BW.** 2008. Genome sequence of *Brucella abortus* vaccine strain S19 compared to virulent strains yields candidate virulence genes. *PLoS One* **3**:e2193.
304. **Hancock RE.** 1997. Peptide antibiotics. *Lancet* **349**:418-422.
305. **Hermesen ED, Sullivan CJ, Rotschafer JC.** 2003. Polymyxins: pharmacology, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical applications. *Infect Dis Clin North Am* **17**:545-562.
306. **Ferrero MC, Fossati CA, Baldi PC.** 2009. Smooth *Brucella* strains invade and replicate in human lung epithelial cells without inducing cell death. *Microbes Infect* **11**:476-483.
307. **Moreno E, Speth SL, Jones LM, Berman DT.** 1981. Immunochemical characterization of *Brucella* lipopolysaccharides and polysaccharides. *Infect Immun* **31**:214-222.
308. **Biedzka-Sarek M, Venho R, Skurnik M.** 2005. Role of YadA, Ail, and Lipopolysaccharide in Serum Resistance of *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3. *Infect Immun* **73**:2232-2244.
309. **Attia AS, Lafontaine ER, Latimer JL, Aebi C, Syrogiannopoulos GA, Hansen EJ.** 2005. The UspA2 protein of *Moraxella catarrhalis* is directly involved in the expression of serum resistance. *Infect Immun* **73**:2400-2410.
310. **Paixao TA, Roux CM, den Hartigh AB, Sankaran-Walters S, Dandekar S, Santos RL, Tsolis RM.** 2009. Establishment of systemic *Brucella melitensis* infection through the digestive tract requires urease, the type IV secretion system, and lipopolysaccharide O antigen. *Infect Immun* **77**:4197-4208.
311. **Bendtsen JD, Nielsen H, Widdick D, Palmer T, Brunak S.** 2005. Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC Bioinformatics* **6**:167.
312. **Kratzschmar J, Krause M, Marahiel MA.** 1989. Gramicidin S biosynthesis operon containing the structural genes *grsA* and *grsB* has an open reading frame encoding a protein homologous to fatty acid thioesterases. *J Bacteriol* **171**:5422-5429.
313. **Skalova T, Dohnalek J, Spiwok V, Lipovova P, Vondrackova E, Petrokova H, Duskova J, Strnad H, Kralova B, Hasek J.** 2005. Cold-active beta-galactosidase from *Arthrobacter* sp. C2-2 forms compact 660 kDa hexamers: crystal structure at 1.9A resolution. *J Mol Biol* **353**:282-294.
314. **van Bueren AL, Ghinet MG, Gregg K, Fleury A, Brzezinski R, Boraston AB.** 2009. The structural basis of substrate recognition in an exo-beta-D-glucosaminidase involved in chitosan hydrolysis. *J Mol Biol* **385**:131-139.
315. **Liautard JP, Gross A, Dornand J, Kohler S.** 1996. Interactions between professional phagocytes and *Brucella* spp. *Microbiologia* **12**:197-206.
316. **Kaiser PO, Linke D, Schwarz H, Leo JC, Kempf VA.** 2012. Analysis of the BadA stalk from *Bartonella henselae* reveals domain-specific and domain-overlapping functions in the host cell infection process. *Cell Microbiol* **14**:198-209.
317. **Dwight C. Hirsh NJM, Richard L. Walker.** 2004. *Veterinary Microbiology*, 2nd. ed. Blackwell Publishing, Iowa.
318. **Almiron MA, Roset MS, Sanjuan N.** 2013. The Aggregation of *Brucella abortus* Occurs Under Microaerobic Conditions and Promotes Desiccation Tolerance and Biofilm Formation. *Open Microbiol J* **7**:87-91.
319. **Di Lullo GA, Sweeney SM, Korkko J, Ala-Kokko L, San Antonio JD.** 2002. Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen. *J Biol Chem* **277**:4223-4231.
320. **Karsenty G, Park RW.** 1995. Regulation of type I collagen genes expression. *Int Rev Immunol* **12**:177-185.
321. **Aoki K, Matsumoto S, Hirayama Y, Wada T, Ozeki Y, Niki M, Domenech P, Umemori K, Yamamoto S, Mineda A, Matsumoto M, Kobayashi K.** 2004. Extracellular

- mycobacterial DNA-binding protein 1 participates in mycobacterium-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. *J Biol Chem* **279**:39798-39806.
322. **Beeson JG, Rogerson SJ, Brown GV.** 2002. Evaluating specific adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to immobilised hyaluronic acid with comparison to binding of mammalian cells. *Int J Parasitol* **32**:1245-1252.
323. **Rouschop KM, Sylva M, Teske GJ, Hoedemaeker I, Pals ST, Weening JJ, van der Poll T, Florquin S.** 2006. Urothelial CD44 facilitates *Escherichia coli* infection of the murine urinary tract. *J Immunol* **177**:7225-7232.
324. **Hill DJ, Virji M.** 2003. A novel cell-binding mechanism of *Moraxella catarrhalis* ubiquitous surface protein UspA: specific targeting of the N-domain of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules by UspA1. *Mol Microbiol* **48**:117-129.
325. **Zebhauser R, Kammerer R, Eisenried A, McLellan A, Moore T, Zimmermann W.** 2005. Identification of a novel group of evolutionarily conserved members within the rapidly diverging murine Cea family. *Genomics* **86**:566-580.
326. **Kammerer R, Popp T, Hartle S, Singer BB, Zimmermann W.** 2007. Species-specific evolution of immune receptor tyrosine based activation motif-containing CEACAM1-related immune receptors in the dog. *BMC Evol Biol* **7**:196.
327. **Kammerer R, Zimmermann W.** 2010. Coevolution of activating and inhibitory receptors within mammalian carcinoembryonic antigen families. *BMC Biol* **8**:12.
328. **Kammerer R, Popp T, Singer BB, Schlender J, Zimmermann W.** 2004. Identification of allelic variants of the bovine immune regulatory molecule CEACAM1 implies a pathogen-driven evolution. *Gene* **339**:99-109.
329. **Hammarstrom S, Baranov V.** 2001. Is there a role for CEA in innate immunity in the colon? *Trends Microbiol* **9**:119-125.
330. **Voges M, Bachmann V, Kammerer R, Gophna U, Hauck CR.** 2010. CEACAM1 recognition by bacterial pathogens is species-specific. *BMC Microbiol* **10**:117.
331. **Virji M, Makepeace K, Ferguson DJ, Watt SM.** 1996. Carcinoembryonic antigens (CD66) on epithelial cells and neutrophils are receptors for Opa proteins of pathogenic *neisseriae*. *Mol Microbiol* **22**:941-950.
332. **Martirosyan A, Gorvel JP.** 2013. *Brucella* evasion of adaptive immunity. *Future Microbiol* **8**:147-154.
333. **de Jong MF, Rolan HG, Tsolis RM.** 2010. Innate immune encounters of the (Type) 4th kind: *Brucella*. *Cell Microbiol* **12**:1195-1202.
334. **Rautemaa R, Meri S.** 1999. Complement-resistance mechanisms of bacteria. *Microbes Infect* **1**:785-794.
335. **Barquero-Calvo E, Chaves-Olarte E, Weiss DS, Guzman-Verri C, Chacon-Diaz C, Rucavado A, Moriyon I, Moreno E.** 2007. *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS One* **2**:e631.
336. **Hoffmann EM, Houle JJ.** 1983. Failure of *Brucella abortus* lipopolysaccharide (LPS) to activate the alternative pathway of complement. *Vet Immunol Immunopathol* **5**:65-76.
337. **Fernandez-Prada CM, Nikolich M, Vemulapalli R, Sriranganathan N, Boyle SM, Schurig GG, Hadfield TL, Hoover DL.** 2001. Deletion of *wboA* enhances activation of the lectin pathway of complement in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Infect Immun* **69**:4407-4416.
338. **Marr N, Shah NR, Lee R, Kim EJ, Fernandez RC.** 2011. *Bordetella pertussis* autotransporter Vag8 binds human C1 esterase inhibitor and confers serum resistance. *PLoS One* **6**:e20585.
339. **Fernandez RC, Weiss AA.** 1994. Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infect Immun* **62**:4727-4738.

340. **Goldberg MB, Barzu O, Parsot C, Sansonetti PJ.** 1993. Unipolar localization and ATPase activity of IcsA, a *Shigella flexneri* protein involved in intracellular movement. *J Bacteriol* **175**:2189-2196.
341. **Steinhauer J, Agha R, Pham T, Varga AW, Goldberg MB.** 1999. The unipolar *Shigella* surface protein IcsA is targeted directly to the bacterial old pole: IcsP cleavage of IcsA occurs over the entire bacterial surface. *Mol Microbiol* **32**:367-377.
342. **Van der Henst C, Beaufay F, Mignolet J, Didembourg C, Colinet J, Hallet B, Letesson JJ, De Bolle X.** 2012. The Histidine Kinase PdhS Controls Cell Cycle Progression of the Pathogenic Alphaproteobacterium *Brucella abortus*. *J Bacteriol* **194**:5305-5314.
343. **Pizarro-Cerdá J, Moreno, E., and Gorvel, J.P.** 1999. *Brucella abortus*: invasion and survival within professional and non-professional phagocytes., vol. 6. Jai Press Inc, Greenwich.
344. **Judd PK, Kumar RB, Das A.** 2005. The type IV secretion apparatus protein VirB6 of *Agrobacterium tumefaciens* localizes to a cell pole. *Mol Microbiol* **55**:115-124.
345. **Tomlinson AD, Fuqua C.** 2009. Mechanisms and regulation of polar surface attachment in *Agrobacterium tumefaciens*. *Curr Opin Microbiol* **12**:708-714.
346. **Skerker JM, Laub MT.** 2004. Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Nat Rev Microbiol* **2**:325-337.
347. **Weeks JN, Galindo CL, Drake KL, Adams GL, Garner HR, Ficht TA.** 2010. *Brucella melitensis* VjbR and C12-HSL regulons: contributions of the N-dodecanoyl homoserine lactone signaling molecule and LuxR homologue VjbR to gene expression. *BMC Microbiol* **10**:167.
348. **Delrue RM, Deschamps C, Leonard S, Nijskens C, Danese I, Schaus JM, Bonnot S, Ferooz J, Tibor A, De Bolle X, Letesson JJ.** 2005. A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. *Cell Microbiol* **7**:1151-1161.
349. **Viadas C, Rodriguez MC, Sangari FJ, Gorvel JP, Garcia-Lobo JM, Lopez-Goni I.** 2010. Transcriptome analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS two-component regulatory system. *PLoS One* **5**:e10216.
350. **Polaina J.** 2004. Estructura, función e ingeniería molecular de enzimas implicadas en la digestión de Carbohidratos. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.
351. **Mc Kenzie H WF.** 1991. Lysozyme and aLactalbumin: Structure, Function and interrelationships, *Advances in Protein Chemistry*.
352. **Jolles P, Jolles J.** 1984. What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. *Mol Cell Biochem* **63**:165-189.
353. **Rasool O, Freer E, Moreno E, Jarstrand C.** 1992. Effect of *Brucella abortus* lipopolysaccharide on oxidative metabolism and lysozyme release by human neutrophils. *Infect Immun* **60**:1699-1702.
354. **Wiesner J, Vilcinskas A.** 2010. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence* **1**:440-464.
355. **Fogelson SJ, Ross A, Lobstein OE.** 1954. A method for the quantitative determination of lysozyme activity in blood. *Am J Dig Dis* **21**:327-331.
356. **Richmond MH, Clark DC, Wotton S.** 1976. Indirect method for assessing the penetration of beta-lactamase-nonsusceptible penicillins and cephalosporins in *Escherichia coli* strains. *Antimicrob Agents Chemother* **10**:215-218.
357. **Clark D.** 1981. Permeability and susceptibility of *Escherichia coli* to beta-lactam compounds. *Antimicrob Agents Chemother* **19**:369-370.

358. **Farmer S, Li ZS, Hancock RE.** 1992. Influence of outer membrane mutations on susceptibility of *Escherichia coli* to the dibasic macrolide azithromycin. *J Antimicrob Chemother* **29**:27-33.
359. **Rocque WJ, Fesik SW, Haug A, McGroarty EJ.** 1988. Polycation binding to isolated lipopolysaccharide from antibiotic-hypersusceptible mutant strains of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **32**:308-313.
360. **Piers KL, Brown MH, Hancock RE.** 1994. Improvement of outer membrane-permeabilizing and lipopolysaccharide-binding activities of an antimicrobial cationic peptide by C-terminal modification. *Antimicrob Agents Chemother* **38**:2311-2316.
361. **Clark D.** 1984. Novel antibiotic hypersensitive mutants of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* **21**:189-195.
362. **Vemulapalli TH, Vemulapalli R, Schurig GG, Boyle SM, Sriranganathan N.** 2006. Role in virulence of a *Brucella abortus* protein exhibiting lectin-like activity. *Infect Immun* **74**:183-191.
363. **Ejim L, Farha MA, Falconer SB, Wildenhain J, Coombes BK, Tyers M, Brown ED, Wright GD.** 2011. Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. *Nat Chem Biol* **7**:348-350.
364. **Sung C K, YKDB, Falck J and Zhao Y.** 2006. A Tagging-via-Substrate Technology for Genome-Wide Detection and Identification of Farnesylated Proteins, p. 615-617. *In* A. BWDCH (ed.), *Regulators and Effectors of Small GTPases: Ras Family*, vol. 407. Academic Press of Elsevier.
365. **Liu M, Douthwaite S.** 2002. Activity of the ketolide telithromycin is refractory to Erm monomethylation of bacterial rRNA. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:1629-1633.
366. **Apfel CM, Locher H, Evers S, Takacs B, Hubschwerlen C, Pirson W, Page MG, Keck W.** 2001. Peptide deformylase as an antibacterial drug target: target validation and resistance development. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1058-1064.

Índice de figuras y tablas

Índice de figuras

Introducción

| | | |
|---|--|----|
| 1 | Árbol filogenético | 2 |
| 2 | División asimétrica de Rhizobiales | 4 |
| 3 | Modelo de replicación intracelular de <i>Brucella</i> spp. | 16 |
| 4 | Esquema de la envoltura de <i>Brucella</i> spp. | 18 |
| 5 | Esquema de reconocimiento celular directo e indirecto | 24 |
| 6 | Secreción y estructura de ATs I | 29 |
| 7 | Secreción y estructura de ATs II | 31 |
| 8 | Estructura modular de los AT triméricos | 33 |
| 9 | Múltiples <i>pockets</i> de unión aumentan la avidéz de la interacción bacteria-patógeno | 34 |

Resultados

| | | |
|----|--|----|
| 10 | Árbol filogenético de posibles adhesinas codificadas en el genoma de <i>B. suis</i> 1330 | 75 |
| 11 | Esquema de obtención de plásmidos para la generación de cepas mutante y complementada | 77 |
| 12 | Entorno genético de <i>btaE</i> y dominios de la proteína | 79 |
| 13 | Obtención de <i>B. suis</i> $\Delta btaE$ | 82 |
| 14 | Obtención de <i>B. suis</i> $\Delta btaE$ pBBR <i>btaE</i> | 83 |
| 15 | RT-PCR | 83 |
| 16 | Construcción de pAcBtaE y puesta a punto de la inducción del péptido derivado de BtaE | 84 |
| 17 | Purificación del péptido derivado de BtaE | 85 |
| 18 | <i>Western blot</i> de membranas totales de <i>Brucella suis</i> 1330 | 86 |
| 19 | <i>Western blot</i> de membranas totales de <i>E. coli</i> pBBR <i>btaE</i> | 87 |
| 20 | Evaluación de disociación | 87 |
| 21 | Tolerancia de <i>B. suis</i> $\Delta btaE$ a DOC, EDTA, SDS y Tritón X-100 | 88 |
| 22 | Tolerancia a polimixina B | 89 |
| 23 | Rol de BtaE en la autoagregación bacteriana | 90 |
| 24 | Formación de <i>biofilm</i> sobre soportes abióticos | 90 |
| 25 | Adhesión a componentes de la ECM | 92 |
| 26 | Adhesión e invasión a células HeLa | 93 |
| 27 | Ensayos de competencia en la adhesión e invasión a HeLa | 94 |
| 28 | Adhesión e invasión a células epiteliales de pulmón, línea A549 | 95 |
| 29 | Replicación intracelular | 96 |
| 30 | Localización superficial de BtaE en <i>Brucella</i> y <i>E. coli</i> | 97 |

| | | |
|----|---|-----|
| 31 | Inmunofluorescencia de bacterias adheridas a HeLa | 98 |
| 32 | BtaE y BmaC se localizan en el polo nuevo de <i>B. suis</i> | 99 |
| 33 | Tolerancia a la actividad bactericida del complemento presente en suero porcino | 101 |
| 34 | Anticuerpos anti-BtaE | 103 |
| 35 | Rol de BtaE en la virulencia de <i>B. suis</i> | 104 |
| 36 | Entorno genético de <i>btaF</i> y dominios de la proteína | 106 |
| 37 | Obtención de <i>B. suis</i> $\Delta btaF$ | 108 |
| 38 | Obtención de <i>B. suis</i> $\Delta btaF$ pBBR <i>btaF</i> | 109 |
| 39 | Obtención de <i>B. suis</i> $\Delta btaE \Delta btaF$ | 110 |
| 40 | Construcción de pAcBtaF y puesta a punto de la inducción del péptido derivado de BtaF | 111 |
| 41 | Purificación del péptido derivado de BtaF | 112 |
| 42 | <i>Western blot</i> a partir de proteínas totales de <i>Brucella</i> | 112 |
| 43 | <i>Western blot</i> a partir de proteínas totales de <i>E. coli</i> | 113 |
| 44 | Evaluación de disociación | 113 |
| 45 | Tolerancia de <i>B. suis</i> $\Delta btaF$ a DOC, EDTA, SDS y Tritón X-100 | 114 |
| 46 | Tolerancia a polimixina B | 115 |
| 47 | Rol de BtaF en la autoagregación bacteriana | 115 |
| 48 | Autoagregación bacteriana en la doble mutante | 116 |
| 49 | Formación de <i>biofilm</i> sobre soporte abiótico | 117 |
| 50 | Formación de <i>biofilm</i> de la doble mutante sobre soporte hidrofóbico | 118 |
| 51 | Adhesión a componentes de la ECM | 118 |
| 52 | Adhesión a componentes de la ECM de la doble mutante | 119 |
| 53 | Adhesión e invasión a células HeLa | 120 |
| 54 | Adhesión e invasión a células epiteliales de pulmón, línea A549 | 121 |
| 55 | Adhesión e invasión a células HeLa y A549, de la doble mutante | 122 |
| 56 | Replicación intracelular | 123 |
| 57 | Localización superficial de BtaF en <i>B. suis</i> y <i>E. coli</i> | 124 |
| 58 | Localización de BtaF | 125 |
| 59 | Tolerancia a la actividad bactericida del complemento, presente en suero | 126 |
| 60 | Anticuerpos anti-BtaF | 127 |
| 61 | Rol de BtaF en la virulencia de <i>B. suis</i> | 128 |
| 62 | Fenotipo de la doble mutante $\Delta btaE \Delta btaF$ | 129 |
| 63 | Entorno genético de BR_0049 y dominios de la proteína | 130 |
| 64 | Obtención de <i>B. suis</i> $\Delta mapA$ | 134 |
| 65 | Obtención de <i>B. suis</i> $\Delta mapA$ pBBR <i>mapA</i> | 134 |
| 66 | RT-PCR | 135 |
| 67 | Construcción de pAcMapA y puesta a punto de la inducción del péptido derivado de MapA | 136 |
| 68 | Purificación del péptido derivado de MapA | 137 |
| 69 | <i>Western blot</i> a partir de proteínas totales de <i>Brucella</i> | 137 |
| 70 | Evaluación de disociación | 138 |

| | |
|---|-----|
| 71 Tolerancia de <i>B. suis</i> $\Delta mapA$ a DOC, EDTA, SDS y Tritón X-100 | 138 |
| 72 Tolerancia a polimixina B | 139 |
| 73 Evaluación de la sensibilidad a lisozima | 140 |
| 74 Autoagregación bacteriana | 141 |
| 75 Formación de <i>biofilm</i> sobre soporte abiótico | 141 |
| 76 Infección a células HeLa | 142 |
| 77 Replicación intracelular | 143 |

Índice de tablas

Introducción

| | |
|---|---|
| 1 Resultado del muestreo de brucelosis bovina durante los años 2004 y 2005, en 20 provincias de la República Argentina. | 7 |
|---|---|

Materiales y Métodos

| | |
|--|----|
| 2 Cepas bacterianas utilizadas | 39 |
| 3 Plásmidos utilizados | 40 |
| 4 Composición de los medios de cultivo LB y 2xYT | 41 |
| 5 Concentraciones de los antibióticos utilizados | 41 |
| 6 Oligonucleótidos utilizados | 48 |
| 7 Composición de geles discontinuos desnaturalizantes de poliacrilamida | 53 |
| 8 Composición de geles discontinuos desnaturalizantes de poliacrilamida con Tricina | 54 |
| 9 Composición de geles discontinuos semi-nativos de poliacrilamida | 54 |
| 10 Construcciones utilizadas para generar péptidos utilizados en la obtención de anticuerpos | 55 |
| 11 Detalles de la construcción de los plásmidos utilizados para la obtención de mutantes por delección | 59 |
| 12 Oligonucleótidos utilizados para discernir entre dobles recombinantes con el gen deletado o silvestre | 60 |
| 13 Oligonucleótidos utilizados para confirmar las mutaciones mediante RT-PCR | 60 |
| 14 Construcción de los plásmidos utilizados para obtener las cepas complementadas | 60 |

Resultados

| | |
|---|-----|
| 15 Ortólogos de BtaE en distintas cepas y especies del género <i>Brucella</i> | 81 |
| 16 Ortólogos de BtaF en distintas cepas y especies del género <i>Brucella</i> | 107 |
| 17 Ortólogos de la proteína codificada por BR_0049 en distintas cepas y especies del género <i>Brucella</i> | 132 |
| 18 Alineamiento global entre las proteínas codificadas por BR_0049 de <i>B. suis</i> y SMc03096 de <i>S. meliloti</i> | 133 |

Listado de Abreviaturas

| | |
|-------------------|---|
| °C | Grados Celsius |
| µg | Microgramo |
| µl | Microlitro |
| µm | Micrómetro |
| µM | Micromolar |
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico |
| ADNc | Ácido Desoxirribonucleico copia |
| ANLIS | Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud |
| ARN | Ácido Ribonucleico |
| AT | Autotransportador |
| AT I | Autotransportador de tipo I o monomérico |
| AT II | Autotransportador de tipo II o trimérico |
| ATP | Adenosina Trifosfato |
| ATs | Autotransportadores |
| BCV | Vacuola contenedora de <i>Brucella</i> |
| BLS | Lumazina sintasa |
| BSA | Seroalbumina bovina |
| daTaa | Server Domain Annotation in Trimeric Autotransporter Adhesins |
| DO ₆₀₀ | Densidad óptica determinada a 600 nanómetros |
| DOC | Deoxicolato de Sodio |
| ECM | Matriz Extracelular |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| FIL | Fundación Instituto Leloir |
| GFP | Proteína verde fluorescente |
| h | Hora |
| HisTag | Tag de Histidina |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta eficiencia |
| IFN-γ | Interferón -γ |
| IMAC | Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados |
| INTA | Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria |
| IPTG | Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido |
| kb | Kilo bases |
| kDa | Kilo Dalton |
| LB | Medio Luria Bertani |
| LPS | Lipopolisacárido |
| Mb | Megabases |
| ME | Membrana Externa |
| MI | Membrana Interna |

| | |
|--------|--|
| min | Minuto |
| ml | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| MOI | Multiplicidad de infección |
| nm | Nanómetro |
| OMPs | Proteínas de Membrana Externa |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| ORF | <i>Open reading frame</i> |
| pb | Pares de bases |
| PBS-T | PBS-Tween 20 0.05% |
| p.i. | Post-infección |
| p/v | Peso en volumen |
| PDB | Protein Data Bank |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| SENASA | Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria |
| SN | Sobrenadante |
| TSA | Medio <i>Tryptic Soy Broth</i> sólido |
| TSB | Medio <i>Tryptic Soy Broth</i> |
| u.f.c | Unidades formadoras de colonias |