



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL  
GENERADA EN COBAYOS INMUNIZADOS CON PÉPTIDOS  
SINTÉTICOS DE PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA EXTERNA  
DE *BRUCELLA SPP.***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:**

**EMILIO VENEGAS CUREÑO**

**ASESORES:**

**DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ  
DR. DANIEL MARTÍNEZ GÓMEZ**



**MÉXICO, D. F.**

**2007**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DEDICATORIAS:**

A mi mamá Magdalena Cureño y mi papá Emilio Venegas por brindarme su apoyo, cariño y por enseñarme que para obtener lo que uno quiere es necesario la dedicación y trabajo. Gracias por alentarme a seguir por un buen camino, por estar conmigo siempre y sobre todo por ser mis padres.

A mis hermanos por su apoyo moral y sus palabras de aliento que me ayudaron a la conclusión de este trabajo.

A mi abuelita Teofi y Gloria, que siempre me dieron todo aunque les fuera casi imposible; gracias por darme su amor y cariño, así como sus enseñanzas, aunque ya no están conmigo sé que estarían compartiendo su felicidad en este momento.

A toda la familia por apoyarme durante todo este tiempo, por sus palabras de aliento y sus consejos que me sirvieron para seguir adelante.

A ti mujercita por estar a mi lado todo este tiempo, compartiendo buenos y malos momentos, por tu apoyo, por soportar mis repentinos cambios de humor y por brindarme tu cariño y comprensión.

## **AGRADECIMIENTOS:**

A Mauricio, Ali, Martín, Palemón, Ulises, Abraham, David, por ser mis amigos y por apoyarme cuando los necesito. “Que la pezuña que nos une perdure para siempre hermanos”.

A mis amigos y compañeros del LMM: Gaby, Emma, Ilane, Mauricio, Adolfo, Luis, Miriam, Alfredo, Edith, Jimena Elvia, Marcela, Sra. Francis y Julio, por alentarme y presionarme para terminar este trabajo, gracias por sus consejos y enseñanzas.

A la bandota de la FMVZ: Helio, Gilberto, Héctor, Lupe, Adriana, Pati, Norma, Carmen, Gerardo, Gustavo, Pit, Gaby y demás, les agradezco su amistad y compañerismo. Y no olviden que los mejores amigos son escasos y que para encontrarlos sólo hace falta mirar a tu lado para saber quién lo es.

Al Dr. Daniel Martínez, por ser amigo y asesor, por enseñarme lo que ahora sé y por compartir conmigo sus conocimientos.

Al Dr. Verdugo, por dejarme formar parte de su grupo de trabajo.

Al Dr. Lourival Possani Postay, Dra. Georgina Gurrola y MVZ. Iliana Possani por su apoyo en la realización de este trabajo.

Al Departamento de Microbiología e Inmunología, que me brindó su apoyo al abrirme las puertas de sus laboratorios.

A Rigo, Cristian, Enrique, Omar, Alejandro, Arturo por sus palabras de apoyo, por ser mis amigos desde la infancia y por estar conmigo en las buenas! y las malas.

A los miembros del jurado por la pronta revisión de este trabajo.

Y a todas las personas que se me pasan en estos momentos y que sé que estuvieron conmigo para lograr este trabajo, les agradezco mucho.

Este trabajo estuvo financiado por los proyectos PAPPIT IN205701, PAPPIT IN222907 y SEP-CONACyT 2003- CO2-45271.

# ÍNDICE

	Páginas
Resumen. ....	1
Introducción. ....	2
Hipótesis. ....	27
Objetivo. ....	27
Materiales y métodos. ....	28
Resultados. ....	32
Discusión. ....	52
Conclusiones. ....	58
Perspectivas. ....	58
Bibliografía. ....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
FIGURA 1. ....	10
FIGURA 2. ....	24
FIGURA 3. ....	32
FIGURA 4. ....	34
FIGURA 5. ....	36
FIGURA 6. ....	37
FIGURA 7. ....	38
FIGURA 8. ....	40
FIGURA 9. ....	42
FIGURA 10. ....	43
FIGURA 11. ....	45
FIGURA 12. ....	46
FIGURA 13. ....	47
FIGURA 14. ....	48
FIGURA 15. ....	49
FIGURA 16. ....	50
FIGURA 17. ....	51

## RESUMEN

Venegas Cureño Emilio. Evaluación de la respuesta inmune humoral generada en cobayos inmunizados con péptidos sintéticos de proteínas de la membrana externa de *Brucella spp.* (Bajo la dirección del: Dr. Antonio Verdugo Rodríguez y Dr. Daniel Martínez Gómez).

*Brucella spp.* es el agente causal de la brucelosis, una zoonosis que afecta animales domésticos y silvestres y que tiene alto impacto económico sobre la producción pecuaria. Un área de gran interés en el control de esta enfermedad es la elaboración de nuevos inmunógenos que prevengan la infección causada por este agente en los animales domésticos o silvestres, además en personal ocupacionalmente expuesto y que no produzcan reacciones que interfieran con el diagnóstico. En este trabajo se evaluó la capacidad de cuatro péptidos sintéticos para generar una respuesta inmune humoral en cobayos, a través de la técnica de ELISA utilizando proteínas de la membrana externa de *Brucella melitensis* (OMP's) como antígeno de captura. Los péptidos sintéticos fueron diseñados a partir de las secuencias de aminoácidos, específicamente de asas expuestas, de las proteínas Omp14, Omp28, Omp31 y Omp2b de *Brucella spp.*, a los cuales se les nombró de acuerdo a la proteína de la cual fueron sintetizados. Los sueros de los animales inoculados tanto por la vía subcutánea como por la vía nasal, desde el cuarto sangrado hasta el quinto, dos semanas después del desafío con *Brucella melitensis*, presentaron anticuerpos específicos a *Brucella* en todos los casos. La respuesta inducida por los cuatro péptidos en los cobayos inmunizados por vía subcutánea fue similar a la respuesta de los animales del grupo control positivo, mientras que los valores del grupo inmunizado por vía nasal, aunque fueron estadísticamente iguales entre si y al control positivo, la media fue ligeramente menor. En este trabajo se evaluó la inducción de la respuesta inmune humoral, por lo cual se requieren más estudios para evaluar la respuesta celular inducida por estos péptidos sintéticos. La utilización de péptidos sintéticos como inmunógenos tiene potencial para su uso en especies donde las vacunas tradicionales no han funcionado, pero primordialmente en humanos.

## Introducción.

La brucelosis es una de las zoonosis bacterianas más importantes a nivel mundial. Según datos de la FAO (*Food and Agriculture Organization*), OMS (*Organización Mundial de la Salud*) y de la OIE (*Office International des Epizooties*), es una de las zoonosis bacterianas de mayor importancia en el mundo, afectando en promedio más de 50,000 personas anualmente, principalmente en países del Medio Oriente, Asia y Centroamérica. Esta enfermedad es causada por microorganismos del género *Brucella* <sup>1</sup>.

El género *Brucella*, está ubicado dentro del grupo alfa, subgrupo 2 de las Proteobacterias dentro de la familia *Rhizobiaceae*. Esta familia incluye bacterias patógenas de plantas y animales como *Agrobacterium*, *Rhodobacter*, *Rickettsia*, *Bartonella* y *Brucella*, bacterias con capacidad para interactuar con células eucarióticas en forma intercelular o intracelular, bacterias endosimbiontes de plantas como *Rhizobium*, y *Phyllobacterium*; habitantes del suelo como *Mycoplasma* y a *Ochrobactrum anthropi* que llegan a causar infecciones oportunistas en el hombre <sup>1, 2, 3, 4, 5</sup>.

El aislamiento del agente etiológico de la brucelosis, también conocida como Fiebre de Malta o fiebre ondulante, se realizó a finales del siglo XIX, por un grupo de investigadores encabezados por David Bruce en 1887 a partir de tejido de bazo de soldados británicos que murieron a causa de esta enfermedad. En un inicio esta bacteria se denominó *Micrococcus melitensis*, basándose en las características coloniales y microscópicas <sup>3, 4, 5, 6</sup>. En un estudio posterior realizado por la Dra. Alice Evans en 1917, se comprobó que el bacilo de Bang (*B. abortus*) descubierto por Bernard Bang y el *Micrococcus melitensis* (*B. melitensis*) estaban

estrechamente relacionados, pero no fue hasta años más tarde y tomando en cuenta los trabajos de Evans, que el Dr. Meyer y colaboradores propusieron la creación del género *Brucella*, en honor a David Bruce <sup>7</sup>.

En México, los primeros reportes de brucelosis humana fueron hechos por Carvajal en 1906, cuando publicó una nota médica en la cual sugería que sus pacientes con fiebre recurrente al parecer estaban afectados por la fiebre de Malta; posteriormente en 1912 el Dr. Résendiz relacionó la aparición de una enfermedad extraña caracterizada por fiebre recurrente con la importación de cabras murcianas en 1910. Finalmente en el año 1921 el Dr. Placeres logró el aislamiento de un microorganismo muy similar al *Micrococcus melitensis* reportado por David Bruce <sup>4, 7, 8, 9</sup>.

Los microorganismos del género *Brucella* afectan una variedad muy amplia de mamíferos incluyendo al hombre, bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, roedores, animales marinos, etc.<sup>2, 3, 5</sup>. Dentro del género *Brucella* tradicionalmente se han incluido seis especies: *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* y *B. neotomae*. Esta clasificación está basada en la patogenicidad y preferencia hacia un hospedador establecida por el hecho de que fue en él, de donde se realizó por primera vez el aislamiento de la especie en cuestión, quedando implícito así que *B. abortus* afectaba principalmente a bovinos, *B. melitensis* a caprinos y ovinos, *B. suis* a suinos, *B. canis* a caninos, *B. ovis* a ovinos específicamente y *B. neotomae* a roedores, aunque infecciones cruzadas ocurren <sup>2, 4, 9, 10</sup>. Sin embargo, el número de especies afectadas por microorganismos de este género podría ampliarse, al incluirse a los mamíferos marinos como especies afectadas. Inicialmente estos aislamientos fueron clasificados dentro de un grupo separado al que de modo no oficial se le denominó *Brucella maris*, sin embargo ahora se propone incluir dentro del género *Brucella*, dos nuevas especies, *B. cetaceae* formado por los

aislamientos a partir de cetáceos y *B. pinnipediae* formado por los aislamientos de fócidos<sup>2, 4, 9,</sup>  
<sup>10</sup>. Verger y colaboradores han propuesto un nuevo esquema de clasificación, el cuál considera a *Brucella melitensis* como única especie y a las otra restantes como biovares, basado en la homología de ADN mayor del 90%, por medio de hibridaciones ADN-ADN y el análisis de las secuencias del gen ARN ribosomal 16S<sup>3, 4</sup>. Por otra parte, análisis genómicos comparativos de *B. suis* y otros miembros de las  $\alpha$ -Proteobacterias en particular los pertenecientes a la familias Rhizobiaceae, ha mostrado similitudes entre estos organismos, en estructura genómica y capacidades metabólicas. De particular interés ha sido la homología entre los sistemas de dos componentes, esenciales para la replicación intracelular (BvrR, BvrS), formación de tumores en plantas (ChvG, ChvI) y establecimiento de endosimbiosis (ExoS, ChvI) para *B. suis*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Sinorhizobium meliloti* respectivamente<sup>3</sup>.

Las especies de *Brucella* y sus diferentes biotipos son distinguidos por pruebas diferenciales basadas en serotipificación, fagotipificación, sensibilidad a tinciones, requerimientos de CO<sub>2</sub>, producción de H<sub>2</sub>S y propiedades metabólicas<sup>9</sup>.

En nuestro país han sido aisladas 5 de las 6 especies de *Brucella*, siendo *B. neotomae* la única que no ha sido aislada. Dentro de las especies aisladas se tiene a: *B. melitensis* biovariedades 1-3; *B. abortus* biovariedades 1, 2, 4-6, siendo el biovar 1 el más frecuente y el biovar 4 el más virulento para el hombre; *B. suis* biovariedad 1, aislado tanto de humanos como de cerdos; *B. canis* y *B. ovis*. Es importante mencionar en este punto que algunos de los aislamientos se han hecho a partir de especies animales que no corresponden a su hospedador, así se tienen aislamientos de *B. suis* a partir de un queso de leche de vaca y una cepa de *B. melitensis* aislada a partir de leche de vaca, lo cual nos sugiere que los microorganismos del género

*Brucella* pueden afectar a varias especies animales favoreciendo la propagación de la enfermedad <sup>4, 8</sup>.

Los microorganismos del género *Brucella* son cocobacilos pequeños Gram negativos (0.6-1.5  $\mu\text{m}$  x 0.5-0.7  $\mu\text{m}$ ), que se comportan como intracelulares facultativos, no móviles, sin cápsula, no esporulados y sin flagelo. Sin embargo recientemente, un estudio realizado por Fretin D. y colaboradores, lograron la identificación de genes que codifican para componentes putativos de un aparato flagelar, el cual podría funcionar bajo condiciones específicas durante el proceso de infección (11). Los microorganismos del género *Brucella* requieren medios enriquecidos para su primoaislamiento, *B. ovis* y algunos biotipos de *B. abortus* necesitan además, de una atmósfera de CO<sub>2</sub> del 5-10% <sup>4, 9, 12</sup>.

El aislamiento de la bacteria es la única evidencia directa, contundente de que se trata de una infección por *Brucella*. Aunque se puede aislar de varios tejidos, la sangre es el material que se emplea con mayor frecuencia para realizar el cultivo bacteriológico.

Los métodos diagnósticos para la brucelosis están basados principalmente en técnicas serológicas que detectan anticuerpos contra el LPS <sup>4</sup>. Uno de los grandes problemas en el diagnóstico por estos métodos resulta de la similitud del antígeno O de la cadena del LPS de *Brucella* con otros microorganismos, en particular con *Yersinia enterocolica* 0:9 (Kittelberger y col. 1995). Esta reacción cruzada entre *Brucella* y otros microorganismos limita la especificidad de muchos métodos de diagnóstico <sup>3</sup>.

Las pruebas de aglutinación en placa y rosa de Bengala son comúnmente utilizadas como pruebas de rutina y muchas veces son las únicas pruebas que están disponibles en áreas

rurales. Las pruebas de Rivanol y 2- mercaptoetanol son utilizadas sólo como ensayos confirmatorios <sup>13</sup>.

Cuando las bacterias del género *Brucella* se cultivan en medios sólidos pueden presentar una morfología colonial lisa o rugosa, la cual se puede evidenciar cuando se tiñen con colorantes como el cristal violeta y se observan con un microscopio con luz oblicua <sup>14</sup>. La morfología lisa o rugosa de las colonias de *Brucella* depende de la composición de las moléculas del lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa de la bacteria <sup>9</sup>. Las especies *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. neotomae* se presentan principalmente como cepas lisas, por tanto expresan la variedad lisa del LPS (S-LPS) aunque existen variantes rugosas expresando la variedad rugosa del LPS (R-LPS) como antígeno de superficie. Las especies *B. canis* y *B. ovis* expresan naturalmente R-LPS como antígeno de superficie, por lo tanto se consideran cepas rugosas. Estas especies son responsables de la epididimitis en carneros y la brucelosis canina respectivamente, *Brucella canis* está también involucrada en casos raros de brucelosis en humanos <sup>9</sup>.

En el medio de cultivo TSA (agar tripticasa soya), las cepas de *Brucella* producen colonias circulares, convexas con bordes regulares, translúcidas y con coloración ámbar. A contraluz estas colonias son brillantes, ligeramente opalescentes y de color gris azulado. En agar gelosa sangre no producen hemólisis y en agar MacConkey crecen poco y no fermentan la lactosa.

Los microorganismos del género *Brucella* son parcialmente ácido-alcohol resistentes, por lo que para su identificación se emplea también la tinción de Zielh-Neelsen modificada, donde las bacterias se tiñen de color rojo y la morfología es la misma que cuando se tiñen con Gram. Las pruebas para identificación de especie y biovariedad con microorganismos del género *Brucella*

incluyen: crecimiento en atmósferas con 5 a 10% de CO<sub>2</sub>, la prueba de urea de Christensen, donde el medio cambia a rosa debido a la producción de ureasas; crecimiento en diferentes concentraciones de colorantes como la tionina y fucsina básica, inhibición a safranina y crecimiento en medio TSA con producción de H<sub>2</sub>S <sup>1,4</sup>.

Una de las pruebas rutinarias de identificación de microorganismos del género *Brucella* es la fagotipificación o prueba de sensibilidad a distintos bacteriófagos, la cual consiste en colocar una gota pequeña de los bacteriófagos Tbilisi (Tb), Weybridge (Wy) y Berkeley (Bk) sobre una capa de cultivo de *Brucella* para observar la existencia de lisis en los sitios en donde se colocaron las gotas <sup>3,4</sup>.

*Brucella* posee una la capacidad para sobrevivir y persistir en el ambiente por períodos considerables, bajo condiciones de baja temperatura, humedad moderada, pH cercano a la neutralidad y protección contra el sol. Estas bacterias son muy sensibles al calor y se destruyen rápidamente cuando son sometidas a la pasteurización o cuando se exponen a temperaturas de 60°C por 30 minutos, también son sensibles a la mayoría de los desinfectantes de uso común a las concentraciones recomendadas, con excepción de los cuaternarios de amonio <sup>4</sup>.

La pared celular de los microorganismos del género *Brucella* está compuesta por una membrana interna y una externa, ubicándose entre ellas el periplasma, el cual contiene peptidoglicano y otros componentes solubles (figura 1) <sup>2</sup>. La membrana citoplásmica es una bicapa constituida de fosfolípidos como la fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, cardiolipina y fosfatidilglicerol <sup>2,15</sup>. La membrana externa, constituye una barrera física y funcional entre el interior de la célula bacteriana y su medio, además de ser la primera estructura, que entra en

contacto con las células del sistema inmunológico del huésped durante los estadios tempranos de la enfermedad, ya que no se han descrito componentes capsulares en *Brucella* <sup>4</sup>. La membrana externa se encuentra fuertemente unida al peptidoglicano ubicado en el periplasma través de distintas lipoproteínas, éstas uniones le proporcionan una mayor estabilidad; un ejemplo de este tipo de uniones es la lipoproteína de *Brucella* con un peso de 19 kDa, la cuál es estructuralmente semejante a la lipoproteína de Braun de *E. coli*, incluso existe una antigenicidad cruzada entre ellas <sup>(4, 16)</sup>. Así mismo se ha reportado que cuando *Brucella abortus* es inactivada por calor, la membrana citoplasmática se colapsa, mientras que la membrana externa mantiene su morfología, a pesar de la liberación de materiales de la membrana externa como el LPS, debido a la interacción membrana externa-peptidoglicano, confiere a la primera una mayor rigidez en *Brucella* en comparación con otras bacteria Gram negativas <sup>2</sup>.

Estudios previos han demostrado que la envoltura celular de microorganismos del género *Brucella* muestran distinta permeabilidad a detergentes y EDTA, en comparación con otras bacterias Gram negativas, con base en esto se ha sugerido la existencia de una relación entre la membrana externa y mecanismos de patogenicidad en microorganismos de este género, como son la resistencia a la polimixina B y péptidos catiónicos bactericidas como lisozima, lactoferrina, defensina NP-2, que están fisiológicamente presentes en los mamíferos <sup>17</sup>. Una posible explicación de esta resistencia es que a diferencia de las enterobacterias, la membrana externa de *Brucella* es rica en fosfatidilcolina y no en fosfatidil etanolamina, además de que la polimixina B no se une al LPS de esta bacteria <sup>17</sup>.

El lipopolisacárido (LPS) conocido también como endotoxina, es de los constituyentes de la membrana externa (ME) de *Brucella* más estudiado, por ser el elemento más abundante y

antigénico. El LPS de *Brucella* tiene propiedades bioquímicas y biológicas diferentes a las del resto de las bacterias Gram negativas, especialmente por el contenido de ácidos grasos en el lípido A, lo cual hace que el LPS de *Brucella* presente baja actividad endotóxica.

El LPS consta de dos partes, la primera parte está constituida del lípido A, formado de diferentes ácidos grasos, una región central (núcleo) que contiene el ácido 2-ceto 3-desoxioctulosónico (KDO), glucosa, manosa y quinovosamina; la segunda parte es la cadena O, dirigida hacia el exterior de la membrana externa, constituida de un homopolímero de alrededor de 100 unidades de 4-formamido-4,6-didesoximanosa (perosamina) <sup>18</sup>.

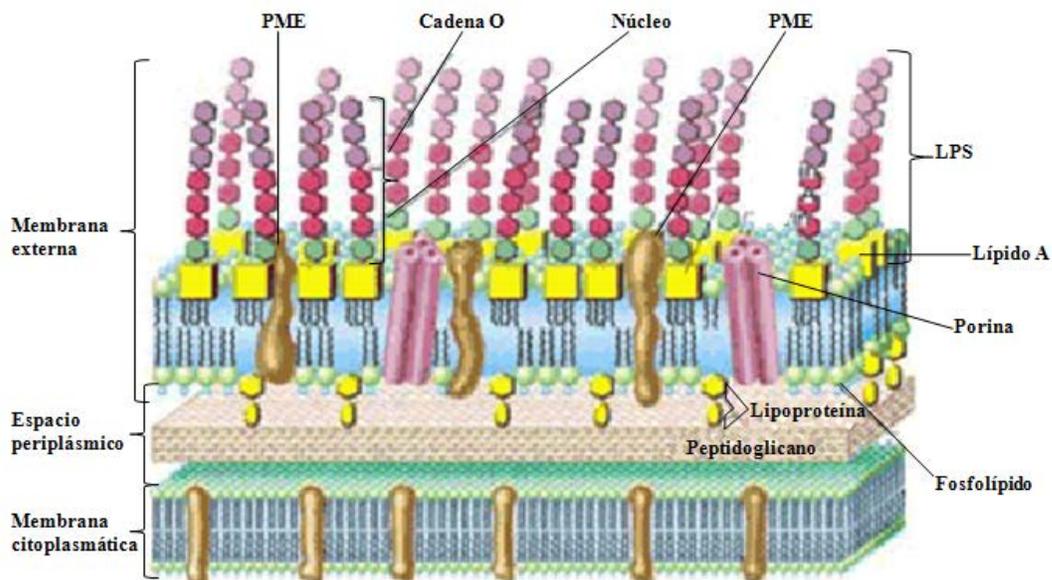
El LPS juega un papel central en el diagnóstico de la brucelosis, ya que es un antígeno inmunodominante que induce una respuesta inmune en muchos animales expuestos a las formas lisas de *Brucella*. La presencia de moléculas de perosamina en el LPS de *Brucella* y en algunas bacterias Gram negativas, es responsable del cruzamiento antigénico que se observa con *Escherichia hermanni* y *E. coli* O:157, *Salmonella* O:30, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Francisella tularensis* *Vibrio cholerae* O:1 y *Yersinia enterocolitica* O:9, que contienen una cadena O casi idéntica a la de *B. abortus* <sup>4, 9, 17</sup>.

Además de la cadena O del LPS, los microorganismos del género *Brucella* contienen un segundo polisacárido llamado Hapteno Nativo (HN). El HN es químicamente idéntico a la cadena O, salvo en la unión al núcleo del lipopolisacárido <sup>2</sup>.

En el LPS de *Brucella* spp los distintos enlaces presentes entre las subunidades de la cadena O permiten la formación de distintos epítomos. Las cepas con epítomo A dominante (*B. abortus* bv. 1) contienen un polímero de cinco perosaminas unidas por ligadura  $\alpha$ -1,2, con una cierta

proporción de unidades ligadas por enlaces  $\alpha$ -1,3, mientras que las cepas que son M dominante (*B. melitensis* bv. 1), presentan unidades repetidas de un pentasacárido constituido de una perosamina unida por ligadura  $\alpha$ -1,3 y cuatro unidades por ligaduras  $\alpha$ -1,2.

Otros componentes abundantes de la membrana externa de *Brucella* son sus proteínas (OMP's), estas son de gran interés porque generalmente se les ha relacionado con mecanismos de protección y patogenicidad <sup>2</sup>. Estudios de moléculas superficiales de la envoltura de *Brucella* llevaron a la caracterización de dos fracciones inmunogénicas involucradas con actividad protectora: la fracción SDS-I de la pared celular y el extracto salino caliente (HS). La fracción SDS-I de *Brucella abortus* mostró estar compuesta mayoritariamente de dos proteínas con pesos moleculares de 25-27 kDa y 36-38 kDa estrechamente asociadas al peptidoglicano, mientras que la fracción HS estaba conformada principalmente por lipoproteínas <sup>10, 19</sup>.



**Figura 1.** Esquema donde se representa la estructura de la envoltura celular de *Brucella* spp.

Las proteínas mayoritarias de la membrana externa de *Brucella* se describieron por primera vez en los años 80's por Dubray y Bézard, en este trabajo estos investigadores empleando distintos métodos de extracción y geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) lograron clasificar las proteínas de la envoltura celular en tres grupos de acuerdo a su peso molecular<sup>2, 20,21</sup>. En esta clasificación, el grupo 1 quedó formado por proteínas con pesos moleculares de 88 a 94 kDa, con una concentración menor a la de otros grupos, las proteínas del grupo 2, identificadas como porinas, con un peso molecular de 36-38 kDa y las proteínas del grupo 3, con pesos moleculares de 25-27 y 31-34 kDa<sup>2,4,10, 22</sup>, a las proteínas de este grupo se les considera equivalentes a OmpA de *E. coli*, con base en la similitud de su composición de aminoácidos y a su relación antigénica<sup>4, 23</sup>. En la actualidad, como resultado de la clonación y secuenciación de los genes que codifican para estas OMP's, así como su peso molecular, se les ha ido asignando otra nomenclatura (Omp28, Omp31 y Omp2b, etc.)<sup>10</sup>.

Otro grupo de proteínas con pesos moleculares de 10, 16.5, 19 y 89 kDa, las cuales fueron identificadas por medio de anticuerpos, se les ha denominado como proteínas menores o lipoproteínas, actualmente con base en estudios genéticos y de secuencia de aminoácidos, tres de ellas, son conocidas también como Omp10, Omp16 y Omp19, respectivamente<sup>4, 24, 25</sup>.

Las OMP's mayoritarias se encuentran expuestas en la superficie de la membrana externa, sin embargo, están menos accesibles en las cepas lisas que en las rugosas, debido al impedimento estérico que causan las largas y abundantes cadenas O del LPS en las cepas lisas<sup>4</sup>.

Las bacterias Gram negativas poseen una gran cantidad de porinas en su membrana externa, estas crean una permeabilidad controlada de la membrana hacia pequeños solutos hidrofílicos

como azúcares <sup>26</sup>. En el grupo 2 existen dos genes estrechamente relacionados (*Omp2a* y *Omp2b*), los cuales codifican para porinas de 36-38 kDa, con un alto grado de homología entre sí (> 85%). Este par de genes se encuentran orientados en direcciones opuestas en el cromosoma I y están separados por 900 pb <sup>2, 10, 22, 26</sup>.

Las proteínas de *Omp25* y *Omp31*, pertenecientes al grupo 3, muestran sólo 34% de identidad entre sí y además basándose en análisis algorítmicos de predicción, ninguna de estas dos proteínas muestra la hidrofobicidad de *Omp2b* y ambas tienen significativamente más epitopes expuestos hacia la superficie <sup>22</sup>. La proteína *Omp31* es capaz de formar oligómeros resistentes a la desnaturalización por SDS, una propiedad que es compartida por otras porinas <sup>27</sup>. Esta proteína no se expresa en *Brucella abortus*, pero sí en las otras especies del género *Brucella* <sup>28</sup>, una situación que promueve la hipótesis de que *Omp31* pudiera ser una porina que está solo presente en especies de *Brucella* que tienen una expresión reducida de los genes *Omp2b* <sup>2,10, 29, 30</sup>. Por otra parte resulta interesante que mientras *Brucella* expresa muchos tipos de porinas como en el caso de *E. coli*, los genes que codifican para las porinas *OmpC*, *OmpF* y *LambB* muestran una considerable homología, sin embargo en el caso de *Omp2b* y *Omp31* estas son totalmente diferentes entre sí <sup>2</sup>. Finalmente, Cloeckaert y col., han descrito a *Omp31* como un antígeno inmunodominante durante infecciones en carneros por *B. ovis*, considerándola como un candidato interesante para la formación de nuevas vacunas y como un antígeno para el diagnóstico de infecciones causadas por esta bacteria.

La proteína denominada *Omp28*, *CP28* o *BP26*, fue identificada como una proteína independiente de los tres grupos ya descritos, es altamente conservada entre *Brucella abortus*, *B. suis*, *B. melitensis* y *B. ovis* <sup>31</sup> y es considerada como un antígeno inmunodominante en vacas, ovejas, cabras y humanos. El nombre *BP26* fue propuesto por Rossetti y col., quién

hizo la primera publicación de la secuencia de nucleótidos de este gen. Esta proteína se localiza en el periplasma, aunque Lindler y col., reportan su localización en la membrana externa <sup>32</sup>. Anticuerpos contra esta proteína fue detectada en un 90% de ovinos, los cuales eran positivos por pruebas serológicas convencionales. De igual forma, carneros infectados con *B. ovis* mostraron también una respuesta significativa de anticuerpos hacia BP26. Otros resultados señalan a Omp28 como un buen antígeno para el diagnóstico en la detección de la cepa vacunal Rev1 de *B. melitensis* facilitando la diferenciación serológica entre ovinos vacunados e infectados con *B. melitensis* o *B. ovis* <sup>9, 31, 32, 33</sup>. El uso de la proteína Omp28 en el diagnóstico tiene las ventajas de que se encuentra libre de otros antígenos de *Brucella spp.*, que pueden interferir con las pruebas diagnósticas, su extracción es rápida y en buenas cantidades. Debido a que esta proteína es altamente conservada en este género, una proteína Opm28 recombinante de cualquier especie de *Brucella* podría ser utilizada para el diagnóstico serológico de infecciones causadas por esta bacteria, lo que evitaría la manipulación de cepas patógenas <sup>31</sup>.

La virulencia de *Brucella* está relacionada con la capacidad que posee para resistir el efecto bactericida de los componentes del suero normal, adherirse, penetrar y multiplicarse en una gran variedad de células eucarióticas, tanto fagocíticas como no fagocíticas <sup>4, 9</sup>. Su localización intracelular las mantiene protegidas de los antibióticos y de factores bactericidas del plasma como complemento y anticuerpos, lo que determina la naturaleza crónica de la infección.

La capacidad de producir ureasa aparentemente juega un papel en la colonización del huésped, a través de la ruta gastrointestinal. La enzima degrada la urea modificando el pH en el sitio en donde se encuentre la bacteria. Además, la bacteria se adhiere con cierta facilidad a la superficie de las mucosas debido a su gran hidrofobicidad, ya que *Brucella* no posee ni

fimbrias ni cápsula, ambas características favorecerían la colonización y la generación de la enfermedad.

El lipopolisacárido liso (S-LPS) posiblemente juega un papel importante, ya que de forma natural las cepas lisas son más patógenas que las cepas rugosas, las cuales poseen virulencia reducida; sin embargo, existen en la naturaleza cepas rugosas que son patógenas, como *B. ovis* y *B. canis* y cepas lisas con virulencia reducida como *B. neotomae*. Lo anterior sugiere que el LPS no es la única molécula involucrada en la virulencia y que existen otros factores como las proteínas superficiales que pueden participar en la interacción de *Brucella* con su célula huésped <sup>4</sup>.

A la fecha se ha concluido el análisis de las secuencias de los genomas de *B. melitensis* M16, *B. suis* y *B. abortus*. Entre los genes de importancia en la virulencia se tiene el sistema de regulación de los componentes BvrR/BvrS, necesarios para el tránsito intracelular en macrófagos y la virulencia *in vivo*, homólogo al descrito en *Agrobacterium tumefaciens*, que es el ChvG/ChvI requerido para la formación de tumores en plantas y el homólogo ExoS/ChvI de *S. meliloti* que regula la producción de succinoglicana, cruciales para el desarrollo de la endosimbiosis. El sistema también percibe los estímulos intracelulares y una de sus funciones es que la bacteria llegue al autofagosoma <sup>3,4</sup>.

La región VirB de *Brucella* contiene 11 genes muy similares a los de *A. tumefaciens*, es esencial para la multiplicación, sobrevivencia intracelular y la virulencia en el ratón. Los genes VirB codifican para un sistema de secreción tipo IV ambos genes fueron identificados en *B. suis* y *B. abortus*. Los genes VirB son esenciales en *A. tumefaciens* para la formación de tumores en plantas <sup>4,9</sup>.

Muchos trabajos se han dirigido hacia la sobrevivencia de *Brucella* dentro del macrófago donde esta bacteria puede infectar, persistir y replicarse por prolongados periodos dentro del huésped. Hay que recordar que esta bacteria tiene la habilidad para infectar líneas celulares epiteliales, células fagocíticas profesionales y no profesionales, tejido respiratorio, neuronas, tejido reproductivo masculino y femenino, por nombrar algunos. La entrada a la célula huésped se da más fácilmente por la interacción con microdominios de la superficie celular conocidos como "lipid rafts". Estos contienen cantidades significativas de glicosilfosfatidilinositol anclado a proteínas, glicoesfingolípidos y colesterol, y al parecer evitan la fusión fagolisosomal favoreciendo de esta manera que la bacteria se localice finalmente en el retículo endoplásmico, que permite que la bacteria se replique con más facilidad, este mecanismo parece estar regulado por el sistema de secreción tipo IV <sup>3,4</sup>.

La interacción *Brucella* con los trofoblastos placentales sugiere que la habilidad para adquirir hierro es vital en la etapa aguda replicativa resultando en la interrupción placentar y en pérdida fetal o nacimiento de crías débiles e infectadas. Es interesante notar que la adquisición de hierro está alterada por la cepa vacunal Rev1 cuando se compara con la cepa virulenta 16M.

La brucelosis es una de las enfermedades más importantes y serias en nuestro país. La importancia de esta enfermedad radica en las grandes pérdidas económicas que ocasiona; ya que es una barrera para el mercado nacional e internacional de animales y sus productos, impactando seriamente en el desarrollo socioeconómico del sector agropecuario. El impacto económico de la brucelosis también se debe a que la enfermedad socava la salud animal y la productividad incluyendo la producción de leche y carne <sup>8</sup>. De acuerdo a datos de la Comisión Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis y Brucelosis bovina de México (CONETB) las pérdidas por brucelosis ascienden a dos mil millones de pesos al año.

La brucelosis constituye también, uno de los más importantes problemas de salud pública <sup>4, 8, 9</sup>. En los países con alto estándares sanitarios la enfermedad es de carácter casi exclusivamente profesional, mientras que en los menos desarrollados la mayor parte de los casos corresponde a la población general, que adquiere la infección a través de la ingestión de productos lácteos no controlados, principalmente leche y quesos frescos. En nuestro caso, México produce entre 9,000 y 10,000 millones de litros de leche de vaca al año, de este volumen 35% es consumida sin pasteurizar (quesos y leche), y de los 120 millones de litros de leche de cabra producidos, al menos el 85% es consumida como quesos sin pasteurizar <sup>8</sup>.

El número de casos de brucelosis humana está directamente relacionado con el nivel con que se presente en animales domésticos <sup>4, 8, 13</sup>. Por que si bien las personas se pueden infectar al ingerir productos lácteos contaminados, también se pueden infectar al inhalar polvo o pelo contaminado con salpicaduras de secreciones posparto de los animales infectados, a través de la conjuntiva, por ingestión accidental, a través de heridas en piel o por auto inoculación accidental de sangre de animales infectados o de vacunas vivas <sup>4, 34</sup>. Por lo tanto en países con altos niveles de brucelosis, tanto la población rural como la urbana se ven afectadas, la urbana principalmente al adquirir productos lácteos sin control sanitario <sup>4, 8</sup>.

Finalmente, otra forma de infectarse con este microorganismo es en laboratorios de diagnóstico microbiológico, en los que se llega a manipular este patógeno. La CDC recomienda que los cultivos vivos de *Brucella* y organismos sospechosos deban ser manipulados en laboratorios de seguridad clase II <sup>34, 35, 36</sup>.

En los animales domésticos la brucelosis afecta principalmente el sistema reproductor con constantes pérdidas en la productividad, como ya se ha mencionado <sup>3</sup>. En cambio, esta enfermedad en el humano se manifiesta con episodios febriles recurrentes (fiebre ondulante), incapacitante, con severas complicaciones, que pueden progresar hacia una enfermedad crónica <sup>3, 4</sup>. La presentación clínica de brucelosis en el humano incluye además de la fiebre ondulante, también manifestaciones en articulaciones, particularmente espondilitis, complicaciones neurológicas asociadas con cambios de personalidad pronunciados (amnesia, alucinaciones, delirio, fobias e irritabilidad) y prolongados dolores de cabeza (frontal y occipital), anorexia, dolor abdominal y artralgia. El periodo de incubación suele ser variable, aunque generalmente es de 2 a 3 semanas y puede prolongarse hasta algunos meses, ya que depende de la virulencia de la cepa de *Brucella*, la dosis y del estado nutricional e inmune del individuo <sup>1, 3, 9, 34, 37</sup>.

En varios países, muchos de los casos registrados no corresponden con gente relacionada con actividades rurales y al menos 20 muertes al año están relacionadas directamente a la enfermedad <sup>4</sup>.

Erradicación de una infección significa la extinción completa del agente infeccioso de un área o población definida. Esto se logra mediante la implementación de una campaña altamente organizada, para evitar que en un futuro un brote aparezca <sup>38</sup>.

Para la implementación de un programa de erradicación para la brucelosis, es esencial que el ganado esté bajo estricta vigilancia y control de movimiento, que los animales estén identificados individualmente y también contar un servicio veterinario eficiente y bien organizado para la vigilancia y la realización de pruebas de laboratorio en el lugar. Antes de

iniciar una estrategia de erradicación, es necesario asegurar que la situación epidemiológica es favorable, que las facilidades y recursos económicos están disponibles, que exista un fondo de animales sanos para el reemplazo y que los recursos y capacidad para continuar la vigilancia estarán disponibles por un periodo considerable <sup>38</sup>.

Una alternativa, menos radical, es el control de la enfermedad. El control de la brucelosis se puede lograr si la inmunidad de la población a la enfermedad se incrementa por medio de la vacunación. La práctica de la vacunación también elimina la signología de la enfermedad, reduce la contaminación del medio ambiente y la exposición de la población al agente infeccioso disminuye (Nicoletti, 1993).

Las vacunas convencionales están hechas a partir del agente causal completo, las cuales consisten de microorganismos muertos o vivos atenuados que no provocan la enfermedad pero que son capaces de inducir protección. La existencia de estas vacunas ha formado parte de los programas de control y erradicación de un gran número de enfermedades infecciosas. Históricamente las vacunas contra patógenos intracelulares como *Brucella* consisten en cepas vivas atenuadas del microorganismo, debido principalmente a que la respuesta inmune generada por vacunas vivas es eficaz y durable <sup>39</sup>. Este tipo de vacunas si bien son efectivas, baratas y la inmunidad inducida es más duradera, no son muy seguras. Las vacunas vivas ideales deberían tener la característica de no producir la enfermedad en los animales vacunados, prevenir la infección en ambos sexos a cualquier edad, prevenir el aborto y la esterilidad, proporcionar una protección a largo plazo contra la infección y el aborto con una simple vacunación, no estimular la persistencia de anticuerpos que interfieran con un diagnóstico serológico preciso en infecciones de campo, no ser transmitida a otros animales si la cepa vacunal establece una infección latente a largo plazo, ser biológicamente estables, libres de reversión a virulencia *in vitro* e *in vivo*, no ser patógenas para humanos, que no

contamine la carne y la leche y ser fácilmente cultivables bajo ciertas condiciones a gran escala <sup>9</sup>.

La vacunación contra *Brucella* en animales usualmente es llevada a cabo por la administración de cepas vivas atenuadas de microorganismos lisos, como las cepas *Brucella abortus* S19 y *Brucella melitensis* Rev1. Estas dos cepas son efectivas para prevenir la infección por *B. abortus* en vacas y por *B. melitensis* y *B. ovis* en borregos y cabras, respectivamente. Ambas vacunas tienen la desventaja de producir aborto en una proporción de animales gestantes y ser patógenas para los humanos. Una desventaja adicional es la inducción de anticuerpos hacia el polisacárido O que interfiere ampliamente con las pruebas serológicas que emplean LPS como antígeno <sup>5, 40</sup>. Sin embargo para caprinos y ovinos que son manejados generalmente en sistemas extensivos en regiones donde la brucelosis usualmente tiene alta prevalencia, como en muchos países en vías de desarrollo, la vacuna Rev1 se ha considerado hasta ahora como la mejor vacuna disponible para la profilaxis de la brucelosis <sup>9</sup>.

Otra cepa vacunal contra la brucelosis es la cepa *Brucella abortus* RB51, la cual se seleccionó a partir de un cultivo de *B. abortus* cepa 2308 en presencia de rifampicina. Esta cepa está desprovista de la cadena O en el LPS por lo que no induce anticuerpos contra esta estructura, por lo tanto la inmunidad humoral inducida, no interfiere con las pruebas serológicas rutinarias <sup>9</sup>.

Además de las vacunas antes mencionadas, en años anteriores fueron desarrolladas y utilizadas otras a partir de microorganismos vivos como la vacuna M de *B. suis*, la cepa 2 *B. suis*, *B. abortus*104-M, *B. melitensis* M111, etc., así mismo, vacunas hechas de microorganismos muertos como la cepa *B. abortus* 45/20, la cepa H38 y la vacuna Pillet-

Bonneau, sin embargo, estas vacunas mostraron resultados variables por lo que su uso fue descontinuado <sup>9, 41, 42</sup>.

Las vacunas que utilizan preparaciones muertas de *Brucella* o fracciones antigénicas de la bacteria tienen un uso limitado, comparadas con las cepas vivas atenuadas. Si bien estos inmunógenos han demostrado ser protectores (una sola inmunización es insuficiente para generar una protección inmune sostenida), se han presentado algunos problemas adicionales como reacciones locales en el sitio de inoculación y la producción de anticuerpos que interfieren con el serodiagnóstico <sup>3</sup>.

El uso de proteínas recombinantes o péptidos sintéticos como vacunas es mas seguro que utilizar el microorganismo atenuado, además su producción puede hacerse a gran escala y con altos grados de reproducibilidad, debido a que son molecularmente definidos. Vacunas de este tipo no requieren de una cadena fría para su almacenamiento <sup>43</sup>. Un inconveniente que tienen este tipo de vacunas subunitarias es que son menos inmunogénicas comparadas con las atenuadas, este problema podría ser reducido con el uso de adyuvantes específicos y sistemas liberadores que pueden emplearse para mejorar la respuesta inmune al antígeno de acuerdo al tipo de antígeno utilizado, especie que va ser inoculada, tipo de respuesta inmune y ruta de inoculación <sup>3, 44, 45</sup>. Otra ventaja de los adyuvantes es que pueden permitir una reducción de la dosis o de la concentración antigénica <sup>44</sup>. En el caso de *Brucella* el desarrollo de una vacuna subcelular que no contenga LPS podría resolver la problemática en la detección de animales latentemente infectados.

Las proteínas de la membrana externa son particularmente atractivas como candidatos para el desarrollo de nuevas vacunas. Por esta razón, algunas OMP's de *Brucella* han sido clonadas, expresadas e identificadas a partir de diferentes especies, como son las proteínas de 20, 28 y

31 kDa de *Brucella melitensis* y las de 16.5, 17, 22, 25 y 36 kDa de *Brucella abortus*<sup>46</sup>. Aunque estas proteínas bajo investigación, son constituyentes estructurales de la bacteria y es improbable que desempeñen una función primaria como factores de virulencia, podrían inducir una respuesta inmune que confiera protección y ser utilizadas en el diagnóstico<sup>12</sup>. Yang y col., proponen el uso de Bp26 como un candidato vacunal, pues esta proteína demostró conferir cierta protección en ratones, también sugieren que ésta puede tener eficiencia protectora contra otras serovariedades de *Brucella*<sup>47</sup>.

Varias fracciones de *Brucella* han sido estudiadas como vacunas potenciales para los humanos, pero su eficacia es un tanto incierta. Estas incluyen las fracciones SDS- fenol insolubles de *Brucella abortus* o de *B. melitensis*, compuestas en su mayoría por peptidoglicano, proteínas y LPS. Éstas confieren protección contra *Brucella* en modelos murinos, pero inducen una respuesta de anticuerpos sustancial contra el LPS por lo que interfieren con las pruebas diagnósticas<sup>9</sup>. Debido a las desventajas que existen en el desarrollo de vacunas convencionales, han sido consideradas nuevas rutas en las que no se involucran el uso del microorganismo completo para la elaboración de nuevas vacunas, estas incluyen, el uso de ADN recombinante para la producción de antígenos proteicos protectores en bacterias, levaduras, plantas o células animales, el uso de técnicas de ADN recombinante para la producción de vacunas vivas por la introducción de genes relevantes dentro del genoma de un vector específico, vacunas de ADN desnudo mediante el uso plásmidos, la utilización de péptidos sintéticos que tienen epitopes protectores relevantes, de bacterias, virus o parásitos, para inducir una respuesta inmune hacia el agente causal de la enfermedad y las vacunas recombinantes sintéticas, basadas en oligonucleótidos sintéticos que son insertados en un vector para la expresión del epitope externo, estas vacunas permiten incluir mas de un epitope<sup>39</sup>.

Una vacuna ADN ofrece la posibilidad de inducir una respuesta inmune celular y humoral adecuada<sup>3</sup>, con ciertas ventajas sobre vacunas basadas en proteínas como el fácil desarrollo de la vacuna, la inducción de una inmunidad duradera y mínimos costos para su preparación<sup>47</sup>. La selección de antígenos protectores específicos como candidatos ha sido considerada mediante la evaluación de bibliotecas genómicas de *B. abortus* y el análisis del genoma de *Brucella melitensis*<sup>3,47</sup>, en las cuales se han identificado genes que están involucrados en la virulencia y patogenicidad de este microorganismo y que han sido evaluados para determinar qué niveles de protección producen en modelos murinos<sup>48</sup>.

La inmunidad protectora contra la infección por *Brucella* ha sido estudiada mayormente en el modelo murino (principalmente BALB/C y CD-1). El criterio utilizado para medir la protección en ratones inmunizados es la reducción en la mortalidad a un tiempo específico, y el número de unidades formadoras de colonias (CFU) de *Brucella* recuperadas del bazo e hígado después un desafío virulento. La inmunidad protectora contra *Brucella spp.*, en el ratón ha sido demostrada por inmunizaciones experimentales pasivas o activas y esta basada en anticuerpos, así como también por la respuesta inmune mediada por células.

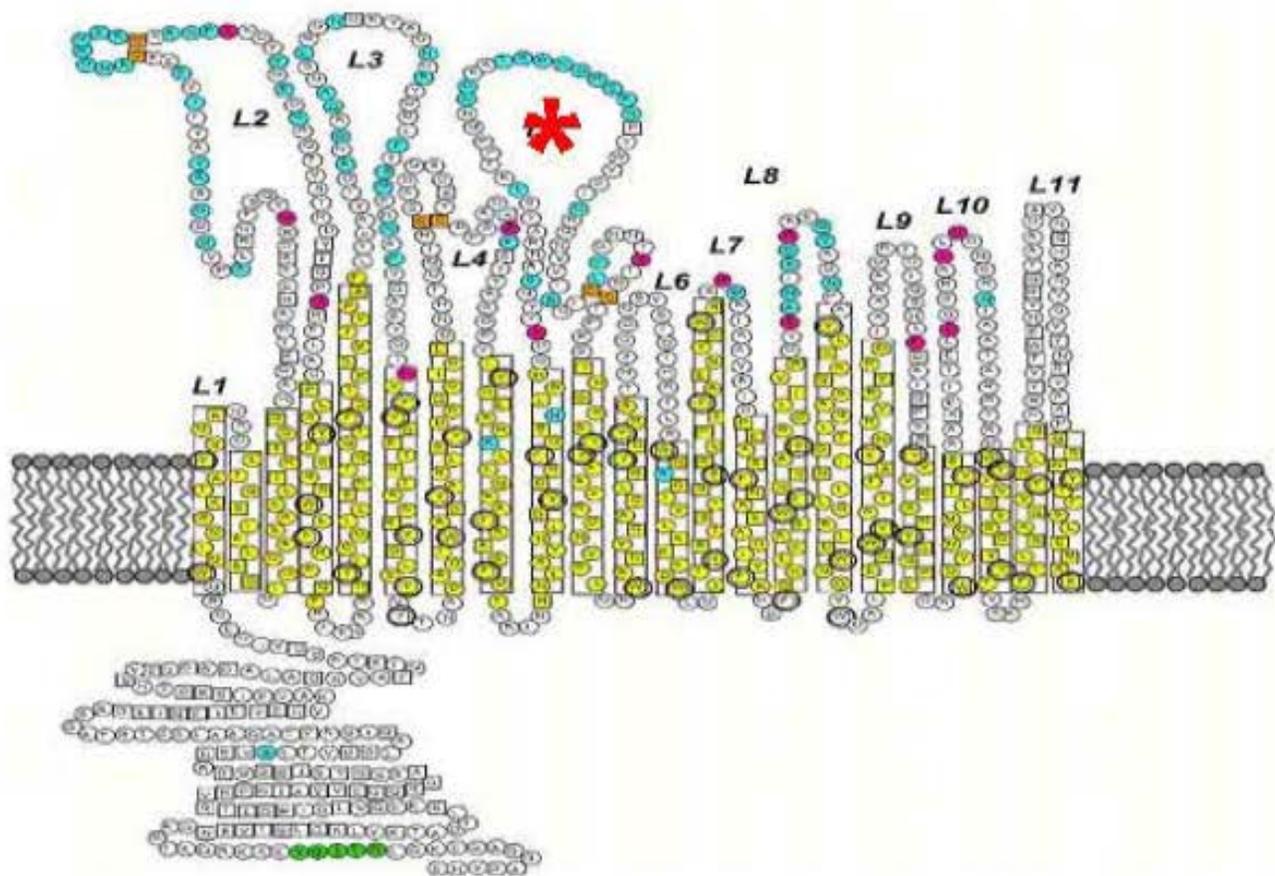
El primer antígeno que ha sido claramente identificado como protector contra *Brucella abortus* es el LPS. El LPS y la cadena O son las estructuras antigénicas más expuestas en la superficie de cepas lisas de *Brucella* seguidas de las OMP's. Los anticuerpos específicos contra el LPS y mas precisamente la cadena O juegan un papel importante en la inmunidad protectora contra brucelosis causada por este tipo de cepas, otros antígenos probablemente proteínas, pueden estar involucrados en la protección contra *Brucella*.

Análisis bioquímicos de la fracción SDS-I CW muestra que contiene una gran cantidad de péptidoglicano y OMP's mayoritarias <sup>4, 9</sup>. El uso de proteínas recombinantes completamente desprovistas de LPS-S ha confirmado que las OMP's mayoritarias de *Brucella* contenidas en la fracción SDS-I CW, ahora llamada Omp25 (25 kDa), Omp31 (31 kDa) y Omp2b (36 kDa,) muestran ser de poca o baja relevancia en la protección contra cepas lisas de *B. abortus* o *B. melitensis* <sup>9</sup>.

Esta fracción tiende a inducir altos niveles de anticuerpos contra LPS, al analizarse con LPS purificado. Además, las fracciones de SDS-I CW aisladas de cepas rugosas inducen una pobre protección contra cepas lisas de *Brucella*, indicando que las OMP's contenidas en esta fracción probablemente tienen una contribución para esta actividad <sup>9</sup>.

## **ANTECEDENTES.**

Actualmente, nuestro grupo en colaboración con el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, evalúa el uso de péptidos sintéticos diseñados a partir de proteínas inmunogénicas de *Brucella spp.*, lo que podría significar una vacuna potencial que evitaría reacciones secundarias producidas por contaminación con LPS. Para ésta evaluación se seleccionaron proteínas de la membrana externa. Las Omps seleccionadas fueron Omp14, Omp28, Omp31 y Omp36 (Omp2b). El diseño de los péptidos se basó, primeramente, en la capacidad inmunogénica de estas proteínas; posteriormente, en estudios de predicción de asas expuestas (figura 2), mediante el uso de perfiles hidropáticos (método Kyte- Doolittle), finalmente se consideró la estructura tridimensional.



**Figura 2.** Esquema donde se representan las asas expuestas que posee la envoltura celular de una bacteria (asterisco).

Los péptidos fueron sintetizados en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM por la Dr. Georgina Gurrola y la MVZ. Iliana Possani, las secuencias completas de las proteínas se obtuvieron del Gen Bank con las claves de acceso: Omp28 (AAB17713), Omp31 (AAB36693), Omp2b (AAA67790) y Omp14 (BA14k acc. No.U62541). Los segmentos sintetizados fueron los siguientes: Omp31 (63-77), Omp14 (40-57), Omp28 (99-115) y Omp2b (281-297).

Para la evaluación de estos péptidos se diseñó un experimento en el cual se ocuparon 60 cobayos hembras de 300g de la cepa Hartley, los cuales fueron alojados en una unidad de

aislamiento del CENID de Microbiología del INIFAP. Estos 60 animales se dividieron en 12 grupos de 5 animales cada uno, los grupos se identificaron de la siguiente forma:

- 1) 1s (Omp14 vía subcutánea (s.c))
- 2) 1n (Omp14 vía nasal)
- 3) 2s (Omp28 vía s.c)
- 4) 2n (Omp28 vía nasal)
- 5) 3s (Omp2b vía s.c)
- 6) 3n (Omp2b vía nasal)
- 7) 4s (Omp31 vía s.c)
- 8) 4n (Omp31 vía nasal)
- 9) 5s (Omps 14, 28, 2b y 31 vía s.c)
- 10) 5n (Omps 14, 28, 2b y 31 vía nasal)
- 11) Cn y Cs (control nasal y subcutáneo)
- 12) REV (grupo inmunizado con la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 inactivada)

Cada grupo recibió tres inmunizaciones en periodos de 21 días antes del desafío, el cual se realizó con la cepa 133 de *B. melintesis* en las instalaciones del CENID de Microbiología de Palo Alto.

Para las inoculaciones por vía subcutánea se utilizó adyuvante de Freund's a una proporción de 1:1, se utilizaron 50 µg de péptido para los grupos 1 al 8, y 25 µg de cada uno de los péptidos para los grupos 9 y 10. Las inmunizaciones nasales se hicieron con 50 µg de péptido sin adyuvante.

El esquema de inmunizaciones y de toma de muestras (vía cardiaca) fue el siguiente:

- Sangrado inicial (basal): diciembre de 2001.
- Inoculación (s.c y nasal): 31 de enero de 2002.
- 1er. Sangrado: 14-15 de febrero de 2002.

- Inoculación (s.c y nasal): 20-21 de febrero de 2002.
- 2do. Sangrado: 07 de marzo de 2002.
- Inoculación (s.c. y nasal): 12-13 de marzo de 2002.
- 3er. Sangrado: 28 de marzo de 2002.
- Inmunización con Rev1 dosis reducida: 03 de abril de 2002.
- Refuerzo de Rev1: 02 de mayo de 2002.
- 4to. Sangrado: 22 de mayo de 2002.
- Desafío: 10 de junio de 2002.
- 5to. Sangrado (en blanco) y colecta de órganos: julio de 2002.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta inmune humoral generada por la inoculación de los péptidos sintéticos, a través de pruebas de ELISA, empleando proteínas de la membrana externa y péptidos sintéticos como antígenos de captura. Los resultados obtenidos forman parte de una línea de investigación, la cual tiene como objetivo principal, el desarrollo de una vacuna subcelular segura para su uso en humanos.

## **HIPÓTESIS.**

Los péptidos sintéticos diseñados a partir de secuencias de PME inoculados en cobayos inducirán una respuesta inmune humoral significativa en comparación con los animales no inoculados.

## **OBJETIVO.**

Evaluar mediante la técnica de ELISA, la respuesta inmune humoral hacia proteínas de la membrana externa de *Brucella melitensis*, desarrollada en los cobayos como resultado de la inoculación de los péptidos sintéticos.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

**Sueros.** Se utilizaron 380 muestras de suero obtenidas a partir de 60 cobayos de la cepa Hartley que fueron inoculados con los péptidos sintéticos diseñados para este trabajo. Los sueros fueron obtenidos por la MVZ. Iliana Possani, en un trabajo realizado previamente.

**Antígeno.** Para la obtención del antígeno empleado en la técnica de ELISA se utilizó una cepa de *Brucella melitensis* biotipo 1, ésta fue sembrada en agar *Brucella* e incubadas a 37°C por 48 horas en la unidad de Bioseguridad del Departamento de Microbiología e Inmunología, posteriormente las bacterias fueron colectadas, inactivadas y llevadas al laboratorio de Microbiología Molecular.

**Obtención de Proteínas de la Membrana Externa (PME).** Los cultivos de *Brucella melitensis* fueron recolectados en 500 ml de una solución amortiguadora de fosfatos (1.9 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 154 mM NaCl). La solución obtenida fue inactivada a 65°C durante 60 minutos en baño María, posteriormente se centrifugó a 4960 x g durante 30 minutos y la pastilla se resuspendió en 20 ml de una solución con inhibidores de proteasas (SIP) (300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM PMSF, 0.1 mM TLCK). Esta suspensión fue sonicada (Homogenizador ultrasonico, Cole parmer®) 3 ciclos de 9 seg. por 9 seg. de descanso a una amplitud del 40% y un tono del 35 %, dejando enfriar la suspensión en hielo entre ciclos, para después centrifugar a 4960 x g a 4°C durante 15 min. (Centrífuga Beckman® L8-80), el sobrenadante se decantó a otro tubo y se le adicionó 2 % de Triton X100 e incubó a 37°C durante 1 hora en agitación. Al finalizar el tiempo de incubación se centrifugó a 4960 x g a 4°C durante 15 min., recuperando el sobrenadante para centrifugarlo a 31,000 x g a 4 °C durante

30 min. La pastilla obtenida fue suspendida en 100  $\mu$ l. de PBS pH 7.2 y almacenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso <sup>49</sup>.

**Cuantificación de proteínas.** La determinación de la concentración de proteínas, se realizó mediante el método de Bradford <sup>50</sup> utilizando un espectrofotómetro (Pharmacia Biotech, Ultrospec 3000) a una longitud de onda de 595 nm. En primer lugar se realizó una curva de calibración con albúmina sérica bovina al 1%, quedando a 2, 4, 6, 8, 10 y 12  $\mu\text{g/ml}$  de concentración, que sirvió como referencia para calcular la concentración de la muestra cuantificada que se utilizó para este trabajo <sup>49</sup>.

**Hidrólisis de Proteínas de Membrana Externa de *Brucella melitensis*.** Previo a su cuantificación las proteínas fueron descongeladas y se tomaron 30  $\mu$ l a los que se les agregó 1 ml. de ácido tricloroacético al 5% y se incubaron durante 10 m en hielo. Después se centrifugaron a 13,800 x g durante 15 min., el sobrenadante se desechó y se resuspendió la pastilla en 1 ml. de hidróxido de sodio 0.4 N homogenizándolo en un agitador, procurando no hacer espuma. Posteriormente se tomaron 30  $\mu$ l de esta suspensión que fue incorporada en 70  $\mu$ l de agua bidestilada, finalmente ésta fue colocada en la cubeta del espectrofotómetro, adicionándole 1 ml de reactivo de Bradford (100 mg de Azul de Coomassie, 50 ml de Etanol de 95%, 100 ml de Ácido Fosfórico al 85%) y se realizó la lectura a los 5 minutos, como control se utilizó 1 ml de reactivo de Bradford. Una vez obtenida la lectura se calculó la concentración de proteínas de la suspensión de PME <sup>51</sup>.

**Geles de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS).** Se utilizó una cámara de electroforesis (Mini-PROTEAN II, BIO-RAD®), para preparar geles de poliacrilamida; los geles separadores fueron utilizados al 12% en 0.375 M Tris, pH 8.8 y los geles concentradores

fueron al 4% 0.125 M Tris, pH 6.8. Las proteínas se desnaturalizaron previo a su separación electroforética, se colocaron en ebullición por 5 minutos con amortiguador de muestra (25 mM Tris, pH 6.8, 10% SDS, 1% 2β-mercapto-etanol, 15% glicerol, 0.005% azul de bromofenol). La cantidad de proteínas utilizada por pozo fue aproximadamente de 11 µg. Las PME de *Brucella melitensis* fueron separadas por electroforesis a 60 volts durante 6 hrs., los geles se tiñeron con azul de Coomasie <sup>49</sup>.

**Unión del antígeno a la fase sólida.** Para la fijación del antígeno a la fase sólida, se utilizaron microplacas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Nunc-Immuno Plate Polysorp), para lectura colorimétrica. Las PME (antígeno), fueron diluidas con PBS pH 7.2 para obtener una concentración final de antígeno a 2 µg/ml. El antígeno se sometió a un tratamiento de desnaturalización parcial previo a su fijación en las microplacas. Para tener menos variación la periferia de las placas no fue utilizada. A cada pozo se le colocó 100 µl de la solución de antígeno y se tapó la microplaca con plástico autoadherible dejándose incubar a temperatura ambiente durante 24 h. Al término de éste tiempo la placa se lavó por tres ocasiones con 250 µl/pozo de PBS-Tween (10 mM PBS pH 7.2, 0.05% de Tween 20) en un lavador de placas (Immunowash 1250 BIO-RAD®). Para bloquear las placas se utilizó una solución de albúmina sérica bovina al 1% (ASB), se agregaron 150 µl a cada pozo y se incubó a temperatura ambiente durante 2 hrs. Posteriormente las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween, se les quitó el exceso de líquido sacudiéndolas en papel absorbente y después fueron puestas en refrigeración hasta su uso <sup>49</sup>. Para la fijación de los péptidos sintéticos como antígeno, el procedimiento fue el mismo, solo que no se desnaturalizó previo a su fijación y la solución empleada para diluir el antígeno fue buffer de carbonatos pH 9.0.

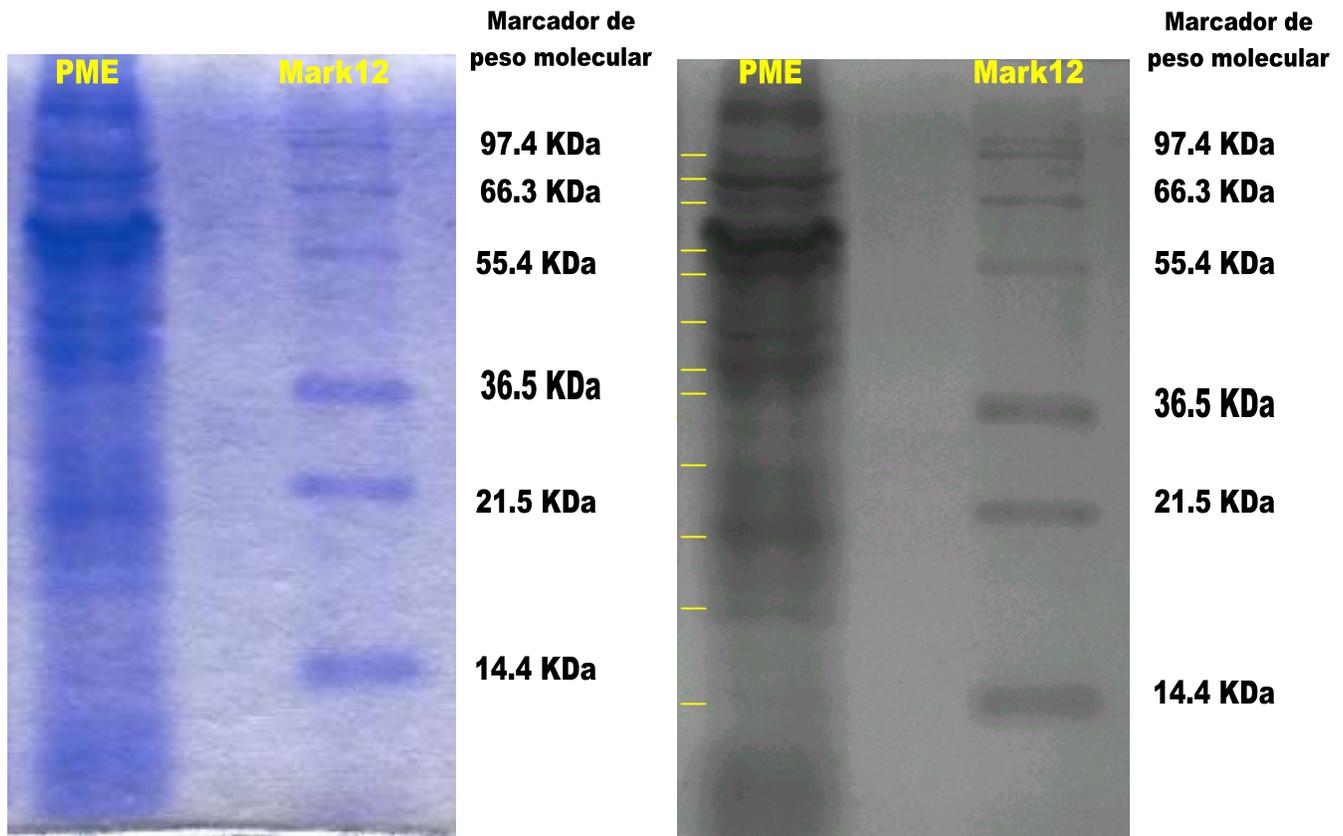
**Desnaturalización parcial del antígeno.** Para realizar este proceso se tomó en cuenta la concentración de PME, la concentración a la que se fijarían las placas (2 µg/ml) y el volumen de PBS pH 7.2 por placa. Para cada placa se utilizaron 3.6 µl de PME, adicionándole 1 µl de β mercapto-etanol, 10 µl de SDS 10% y 85.4 µl de PBS pH 7.2, y se puso en ebullición por 5 minutos y después se incorporó a 8 ml de PBS pH 7.2 <sup>53</sup>.

**Técnica de ELISA (ELISA-PME).** En cada placa se realizaron diluciones triples seriadas de los sueros a partir de 1/50 y hasta 1/12150 con un volumen final de 100 µl. La placa se cubrió y se incubó a 37°C durante 1.5 hrs. La placa se lavó tres veces con 250 µl/pozo de PBS-Tween en un lavador de microplacas. El conjugado utilizado fue Anti IgG de cobayo marcado con peroxidasa a una dilución 1/1000. La placa se puso a incubar a 37 °C durante 1.5 hrs. Las placas se lavaron por tres ciclos con 250 µl por pozo de PBS-Tween. Al término del lavado se preparó la solución sustrato-cromógeno con 10 ml de solución de citratos (0.2 M Fosfato de sodio, 0.1 M ácido cítrico), 1.2 mg de cromógeno (ácido 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic-ABTS-) (SIGMA) ,1 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se adicionaron 100 µl de solución sustrato-cromógeno por pozo con una micropipeta multicanal, se incubó a temperatura ambiente en oscuridad, durante 10, 20 y 30 minutos y se determinó la absorbancia con un lector de microplacas (BIO-RAD® 3550) a una longitud de onda de 405 nm, en cada tiempo de incubación, cada placa contó con su control positivo, control negativo y blanco <sup>49, 54</sup>.

**Análisis de resultados.** Las lecturas de D.O. obtenidas en las pruebas ELISA se evaluaron por medio de análisis de varianza y prueba de comparación múltiple (Tukey) para comprobar diferencias entre medias de las poblaciones. Finalmente se aplicó la prueba de análisis de varianza considerando a los péptidos como bloque, para comparar la inoculación subcutánea y la inoculación nasal.

## RESULTADOS.

**Separación electroforética de las proteínas de membrana externa de *Brucella melitensis*.** Mediante el análisis del perfil electroforético del extracto proteico obtenido con la cepa 33 se observaron 13 bandas, las cuales se señalan en la figura 3. La comparación de los pesos moleculares de estas bandas (cuadro 1) con otras descritas en la literatura indica, que algunas corresponden con los pesos de proteínas mayoritarias de interés para este estudio. Los pesos moleculares aproximados de estas proteínas se calcularon de acuerdo a su movilidad relativa comparada con un marcador de peso molecular (Mark12 BioRad). Una vez verificada la integridad y perfil de las proteínas en el extracto, se procedió a su uso como antígeno de captura en las placas utilizadas en los ensayos de ELISA.

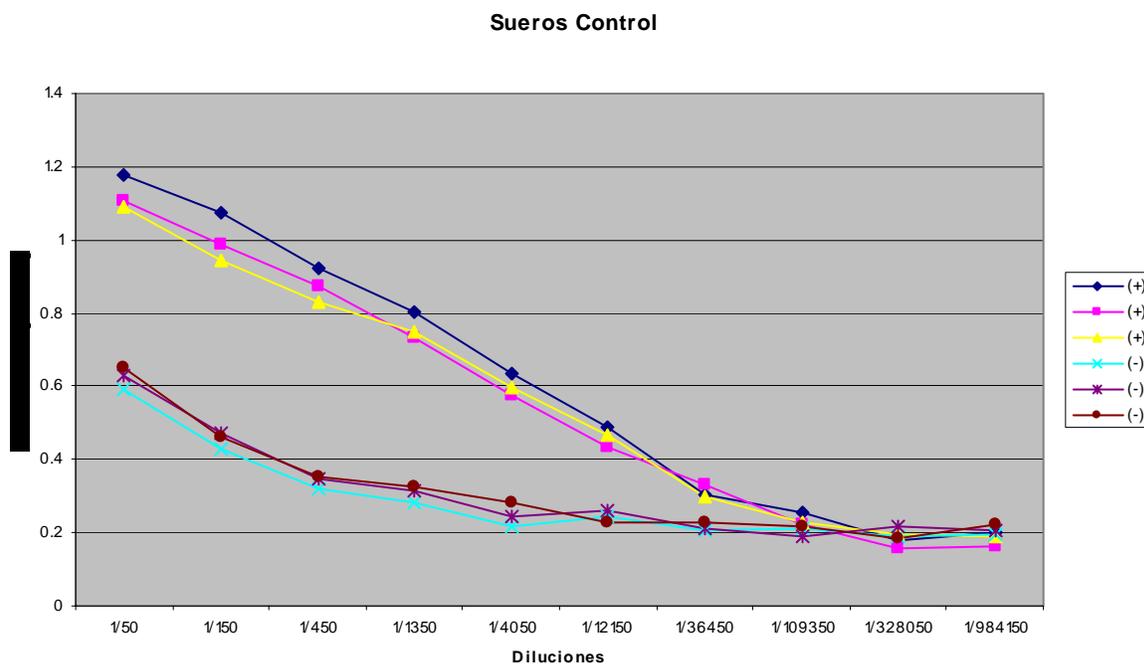


**Figura 3.** Foto de un gel de poliacrilamida SDS al 12%, teñido con azul de Coomassie R250, en el cual se muestra el perfil electroforético de las proteínas de la membrana externa de *Brucella melitensis*. Del lado izquierdo se muestra el gel fijado sobre papel filtro, del lado derecho, se muestra la imagen digitalizada por medio de un fotodocumentador (FluorS, BioRad). Las líneas amarillas indican las bandas de proteínas a las cuales se les calculó su peso molecular.

**Tabla 1.** Pesos moleculares de las bandas de proteínas de la preparación de OMP's de *Brucella*. Se muestran los pesos moleculares obtenidos para cada una de las líneas amarillas mostradas en la Figura 3. El cálculo de peso molecular se obtuvo de acuerdo a su movilidad relativa comparado con el marcador de peso molecular.

<b>Banda</b>	<b>Peso molecular (kDa)</b>
1	95.5
2	85.2
3	77.7
4	67.7
5	63.1
6	51
7	45.7
8	39
9	36.3
10	31.6
11	24.5
12	18.2
13	12.9

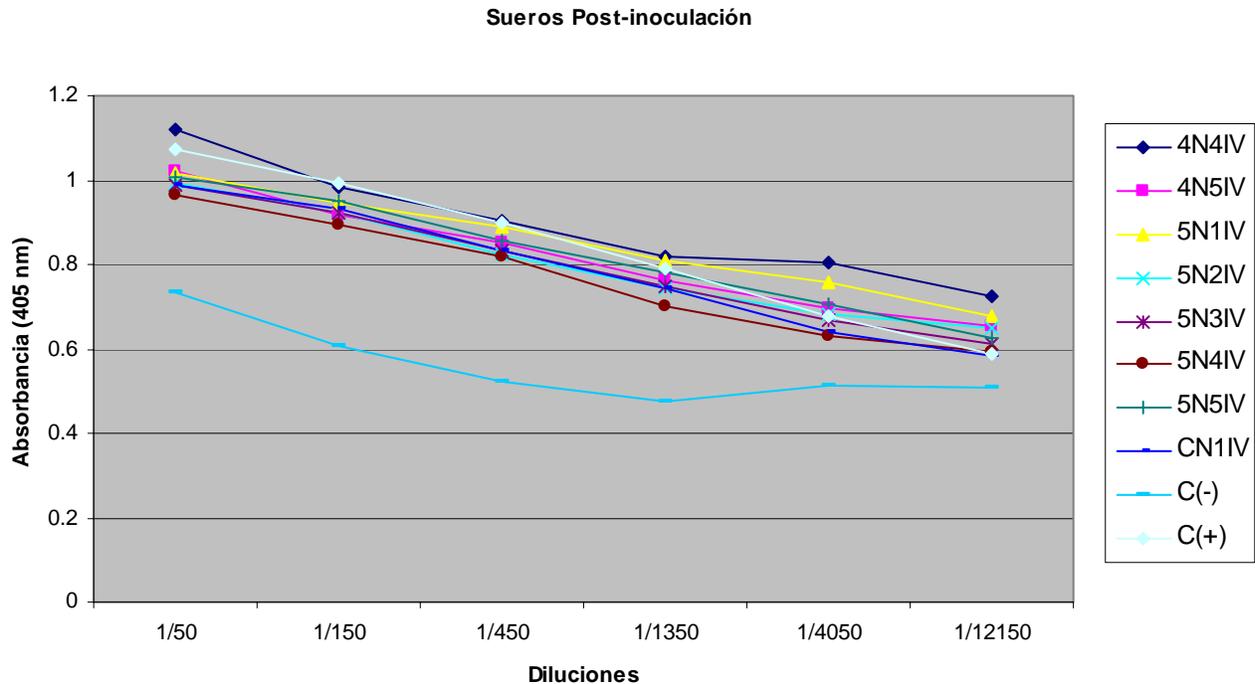
**Evaluación de la respuesta inmune inducida por los péptidos sintéticos empleándola prueba de ELISA con PME's.** Con el fin de determinar la concentración de antígeno que se debía utilizar, se evaluaron placas de ELISA que tenían fijado antígeno a una concentración de 0.2 y 1.0 µg/pozo, cabe mencionar en este punto que el antígeno fue desnaturalizado previo a su fijación en las placas <sup>49, 53, 54</sup>. Cada una de las placas fue probada con sueros de siete animales positivos (cobayos infectados con *Brucella*) y siete negativos a *Brucella* (figura 4). Los resultados obtenidos mostraron que la concentración de antígeno ideal para ser utilizada en la evaluación de los cobayos, fue de 0.2 µg/pozo, ya que las placas de 1.0 µg/pozo no mostraron variación en cuanto al resultado, sin embargo la cantidad de antígeno era mayor. De igual forma los resultados mostraron que el comportamiento de los sueros en el ELISA, era muy similar a lo descrito en la literatura, es decir a diluciones muy altas o muy bajas es difícil diferenciar los grupos (figura 4 dilución 1/36450 y dilución 1/50).



**Figura 4.** Gráfica donde se muestran los valores de absorbancia obtenidos en las pruebas de ELISA con los sueros control positivos (cobayos infectados con *Brucella*) y negativos a *Brucella*, utilizados en las evaluaciones de los sueros de los animales inoculados con los péptidos sintéticos, a distintas diluciones. La concentración de antígeno (OMP's) utilizada fue de 0.2 µg/pozo con un tiempo de lectura de 20 min.

Todos los sueros obtenidos durante el ensayo de inmunización y desafío fueron evaluados, comenzando con las muestras obtenidas antes de la inoculación de los péptidos sintéticos (sangrado basal) hasta las muestras obtenidas dos semanas después del desafío. Así mismo todos los sueros fueron evaluados en diluciones triples comenzando con un título de 1/50 hasta 1/12150, junto con un control positivo y un control negativo, los cuales fueron también diluidos. Las lecturas se realizaron a los 10, 20 y 30 minutos.

El análisis de los resultados indicó que desde la dilución 1/50 hasta la dilución 1/4050, los sueros de los testigos positivos y de los animales inmunizados, después de cubrir el esquema de inmunización, mostraban una reacción distinta a los de los animales testigos negativos o no inmunizados. Para el análisis estadístico se utilizaron solamente los valores de absorbancia de los sueros a una dilución 1/150 con un tiempo de lectura de 20 minutos, ya que con esta lectura se mostraba de forma más evidente la diferencia entre los sueros de los animales positivos o inmunizados y los sueros de los animales negativos o no inmunizados (figura 5).

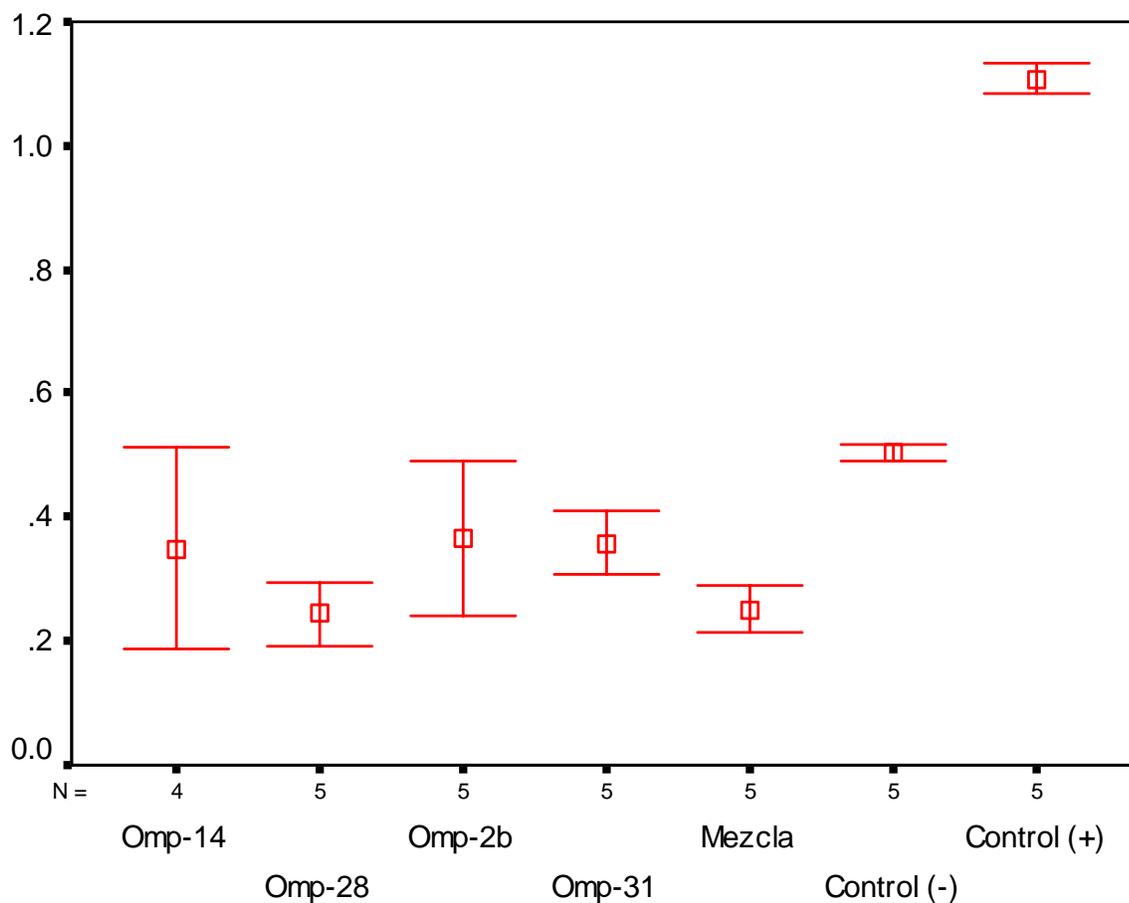


**Figura 5.** Gráfica donde se muestran los valores de absorbancia obtenidos en las pruebas de ELISA con los sueros de los animales inmunizados con los péptidos sintéticos de *Brucella* en distintas diluciones (4to. Sangrado). Se muestra también el control positivo y el negativo. La concentración de antígeno utilizada fue de 0.2 µg/pozo con un tiempo de

El análisis estadístico de los resultados mostró que las medias de los valores de absorbancia obtenidos en las pruebas de ELISA para los sueros correspondientes al sangrado basal (B-N) de los grupos 1N, 2N, 3N, 4N y 5N fueron estadísticamente iguales ( $P= 0.058$ ) entre sí, pero se encontraban por debajo de la media de los valores de los sueros del testigo negativo ( $P= 0.0001$ ) (tabla 2 y figura 6). Así mismo, los valores del sangrado basal subcutáneo (B-SC), mostraron ser iguales como grupo ( $P= 0.703$ ) e iguales respecto a los valores del testigo negativo ( $P= 0.106$ ) (tabla 3 y figura 7). Como se muestra en las figuras 6 y 7, así como en los valores de las tablas 2 y 3, estos animales estaban completamente libres de anticuerpos contra *Brucella*, antes de iniciar la aplicación de los péptidos sintéticos.

**Tabla 2.** Valores de absorbancia (D.O. 405) antes de la aplicación de los péptidos sintéticos de *Brucella* para el grupo de la inoculación nasal.

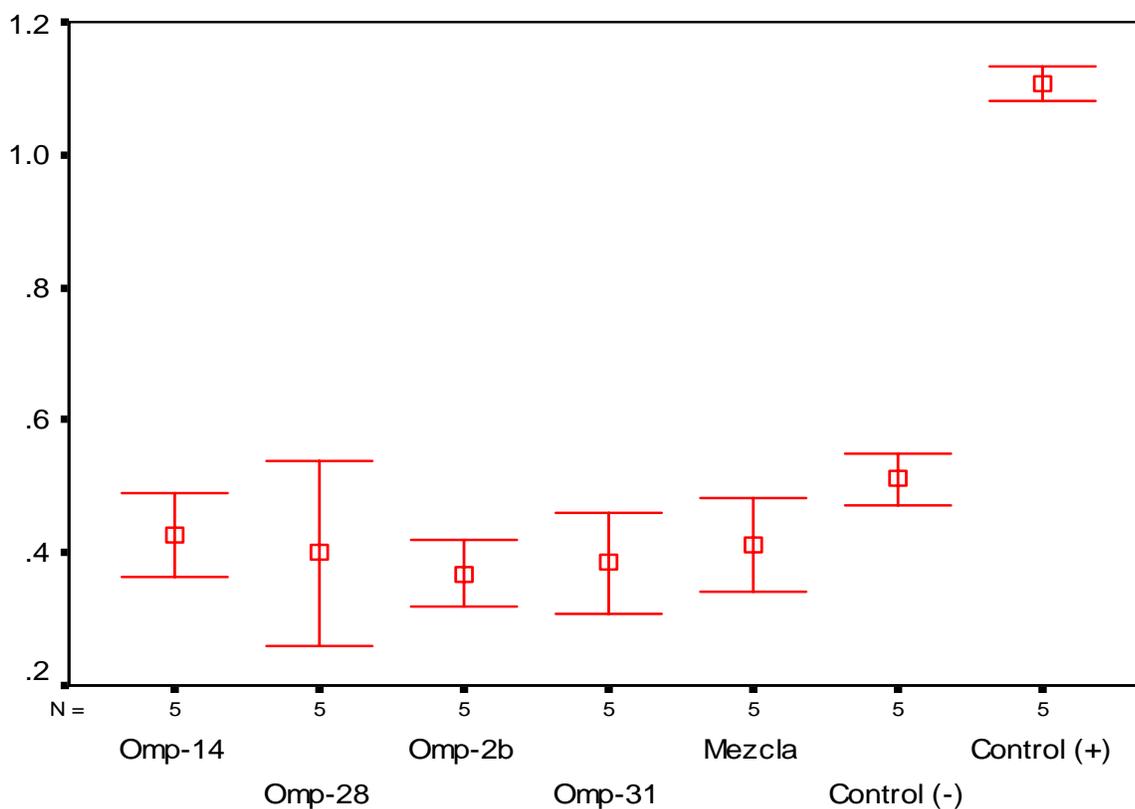
Basal-Nasal	N	Media	Desviación Std.
Omp-14	4	0.349	0.103
Omp-28	5	0.244	0.042
Omp-2b	5	0.366	0.099
Omp-31	5	0.358	0.041
Mezcla	5	0.251	0.030



**Figura 6.** Comparación de los valores de absorbancia (D.O. 405) en las pruebas de ELISA con los sueros del sangrado basal de los grupos de la vía nasal, con los controles positivo y negativo. Se muestran los valores de la dilución 1/150 con una lectura a los 20 minutos.

**Tabla 3.** Valores de absorbancia (D.O. 405) antes de la aplicación de los péptidos sintéticos de *Brucella* para el grupo de la inoculación subcutánea.

Subcutáneo-Basal	N	Media	Desviación Std.
Omp-14	5	0.426	0.050
Omp-28	5	0.399	0.111
Omp-2b	5	0.368	0.040
Omp-31	5	0.384	0.061
Mezcla	5	0.413	0.056
Control (-)	5	0.510	0.032

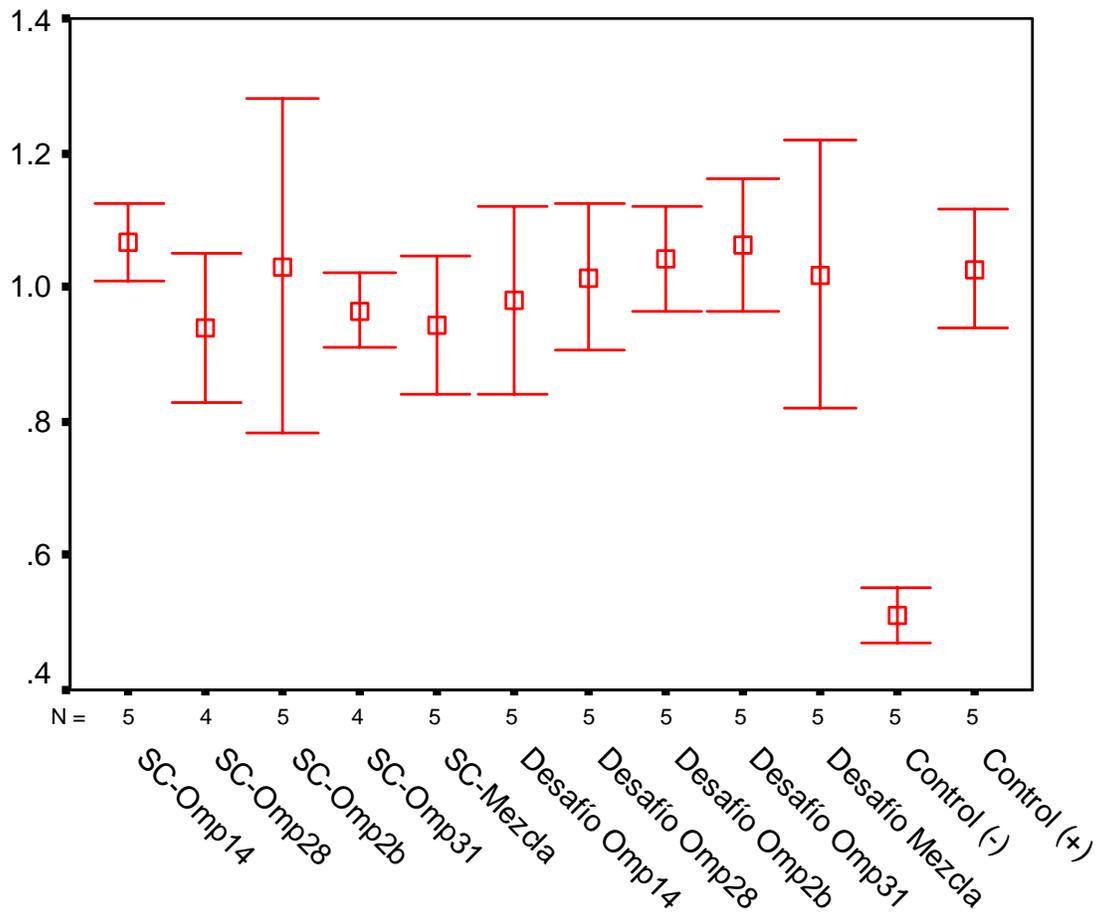


**Figura 7.** Comparación de los valores de absorbancia (D.O. 405) obtenidos en las pruebas de ELISA, empleando los sueros del sangrado basal de los grupos de la vía subcutánea, con los valores de los grupos control positivo y negativo. Se muestran los valores de la dilución 1/ 150 con un tiempo de lectura a los 20 minutos.

La evaluación de la respuesta inmune humoral en los sueros del tercer sangrado post-inoculación (PI), mostró que las medias de los valores de absorbancia obtenidos a partir de los animales inoculados con los péptidos sintéticos por vía subcutánea, no mostraron diferencia al ser comparados con los valores del grupo control positivo, sin embargo con respecto a los valores obtenidos después del desafío, los cinco grupos (1s, 2s, 3s, 4s y 5s) se encontraron por debajo de éste en términos generales (tabla 4 y figura 8). Mediante el análisis de varianza se determinó para estos grupos, que no existían diferencias estadísticas significativas entre sí, por lo que se consideran dentro de un mismo grupo, de igual forma al compararse con el grupo control positivo se encontró que eran estadísticamente iguales a este (P= 0.311). Con el análisis de varianza no se observaron diferencias entre los sueros después de la inoculación con los del desafío, tampoco con los del control positivo (P= 0.869).

**TABLA 4.** Valores de absorbancia obtenidos (D.O. 405) en las pruebas de ELISA con los sueros de los cobayos después de tres aplicaciones de los péptidos sintéticos diseñados a partir de las OMP's de *Brucella*, por la vía subcutánea y después del desafío.

Subcutáneo-post-inoculación	N	Media	Desviación Std.
SC-Omp14	5	1.067	0.047
SC-Omp28	4	0.938	0.069
SC-Omp2b	5	1.031	0.199
SC-Omp31	4	0.965	0.035
SC-Mezcla	5	0.941	0.083
Desafío Omp14	5	0.980	0.113
Desafío Omp28	5	1.015	0.086
Desafío Omp2b	5	1.040	0.062
Desafío Omp31	5	1.062	0.080
Desafío Mezcla	5	1.018	0.160
Control (+)	5	1.026	0.071

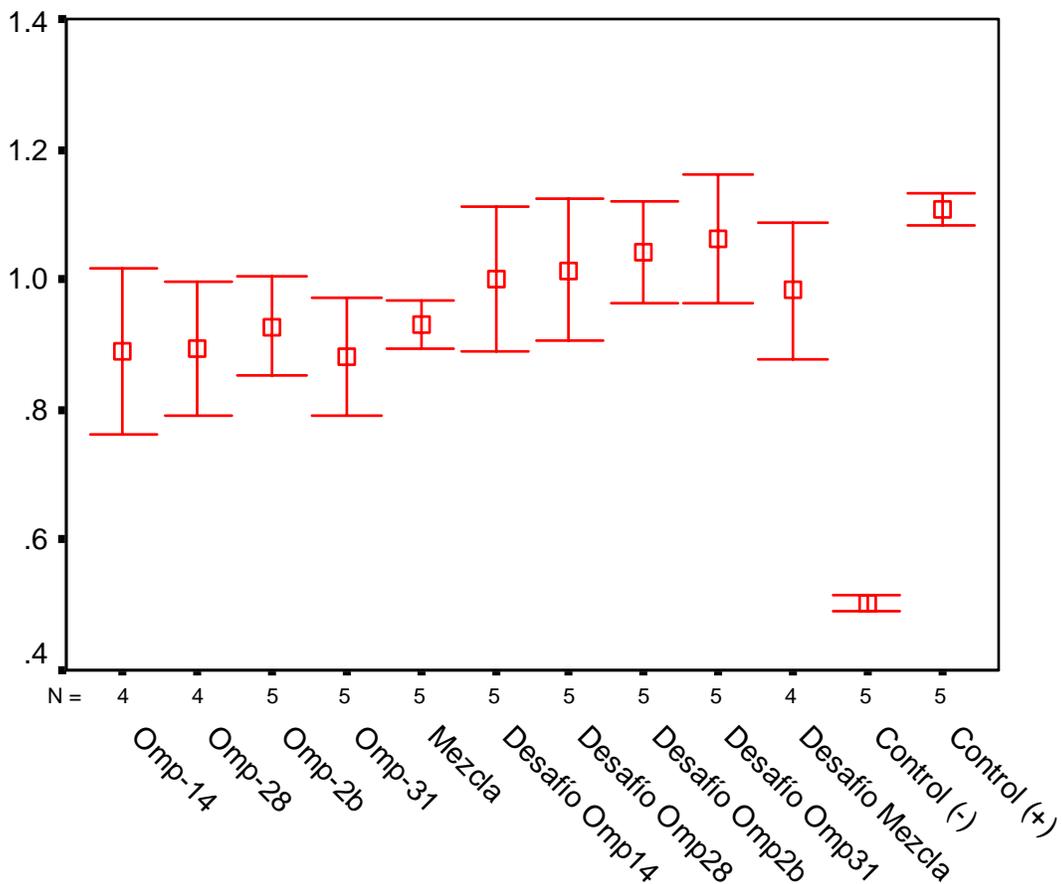


**Figura 8.** Comparación de los valores de absorbancia (D.O. 405 nm) obtenidos con los sueros de los cobayos después de tres aplicaciones por vía subcutánea de los péptidos sintéticos diseñados a partir de las OMP's de *Brucella*, contra los grupos control positivo y control negativo, comparados con los valores post-desafío (*Brucella melitensis* 133). Se muestran los valores de la dilución 1/ 150 con un tiempo de lectura a los 20 minutos.

Para el caso de los distintos grupos que recibieron los péptidos por la vía nasal, se observó que los valores de la medias de los cuatro distintos péptidos y la mezcla están por debajo de la media del grupo control positivo y también de la media de los sueros después del desafío. Estos cinco grupos mostraron también ser estadísticamente iguales entre sí ( $P= 0.778$ ) y como ya se ha mencionado diferentes al control positivo ( $P= 0.0001$ ). Por otra parte los valores obtenidos después del desafío son estadísticamente iguales a los valores del grupo control positivo ( $P=0.122$ ) (tabla 5 y figura 9).

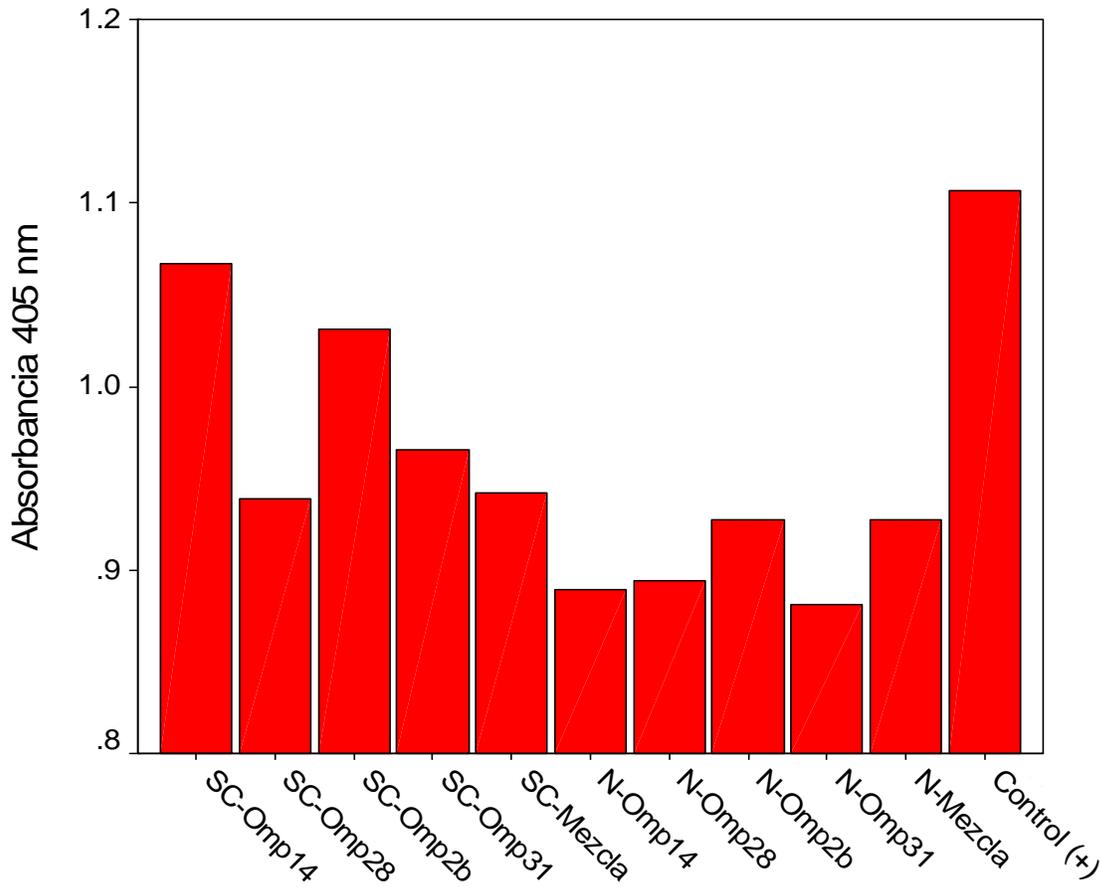
**TABLA 5.** Valores de absorbancia (D.O. 405) obtenidos en las pruebas de ELISA con los sueros de los cobayos después de tres aplicaciones de los péptidos sintéticos diseñados a partir de las OMP's de *Brucella*, por la vía nasal y después del desafío.

Nasal- Post-inoculación	N	Media	Desviación Std.
Omp-14	4	0.889	0.080
Omp-28	4	0.894	0.063
Omp-2b	5	0.927	0.061
Omp-31	5	0.881	0.073
Mezcla	5	0.931	0.028
Desafío Omp14	5	1.000	0.091
Desafío Omp28	5	1.015	0.086
Desafío Omp2b	5	1.040	0.062
Desafío Omp31	5	1.062	0.080
Desafío Mezcla	4	0.982	0.066
Control (+)	5	1.107	0.019



**Figura 9.** Comparación de los valores de absorbancia (D.O 405) obtenidos con los sueros de los cobayos después de tres aplicaciones por vía nasal de los péptidos sintéticos diseñados a partir de las OMP's de *Brucella*, y los grupos control positivo y control negativo, comparados con los valores post-desafío. Se muestran los valores de la dilución 1/ 150 con un tiempo de lectura a los 20 minutos.

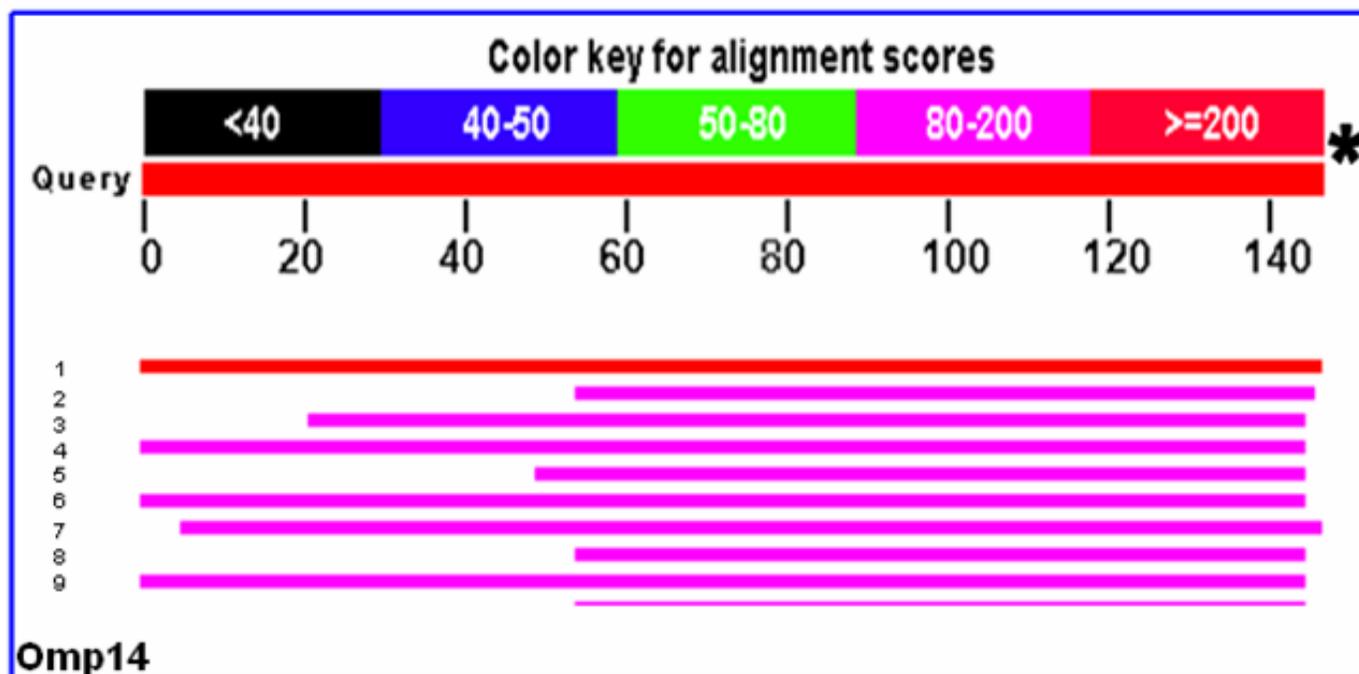
Para determinar cual de las dos vías utilizadas en el ensayo de inmunización, indujo mayor número de anticuerpos, se realizó un análisis de varianza por bloques, tomando a los péptidos como bloque, el análisis de resultados mostró que la vía subcutánea fue la que generó una mayor inducción de anticuerpos en los cobayos ( $P= 0.038$ ) (figura 10).



**Figura 10.** Gráfica comparativa entre la vía subcutánea y la vía nasal después de tres aplicaciones de los péptidos sintéticos diseñados a partir de las OMP's de *Brucella*, se muestran solo los valores de absorbancia de la dilución 1/150 con un tiempo de lectura de 20 minutos.

Además de las pruebas antes mencionadas, se realizó una búsqueda en el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) <sup>55</sup>, para determinar la homología de las proteínas de las cuales fueron sintetizados los péptidos con otras de diferentes microorganismos. EL resultado mostró que estas proteínas tienen homología con microorganismos del subgrupo  $\alpha$ -Protobacterias, a la cual pertenece también *Brucella*. Los resultados se presentan para cada proteína en las figuras 11 a la 14 y las tablas 6 a 9, respectivamente. En la parte superior de cada figura se observa la longitud de la proteína, así como el número de aminoácidos de ésta (indicada por un asterisco), en la parte inferior se muestra una serie de barras identificadas con un número y que corresponden a la homología con regiones de PME's de otras bacterias, estas barras muestran la longitud y su localización respecto a la secuencia de la proteína analizada. En cada una de las tablas se muestran el orden de aparición (número de barra de la imagen), la clave de acceso y el nombre del microorganismo al cual pertenece la secuencia homóloga.

Para determinar si los péptidos sintéticos eran específicos de *Brucella* se utilizó el mismo programa, en el caso de Omp14 no se pudo determinar su homología ya que no existen datos relacionados a su secuencia, sin embargo los aminoácidos que involucran a las otras OMP's sintetizadas mostraron ser específicas de *Brucella* (figura 15-17 y tablas 10-12).

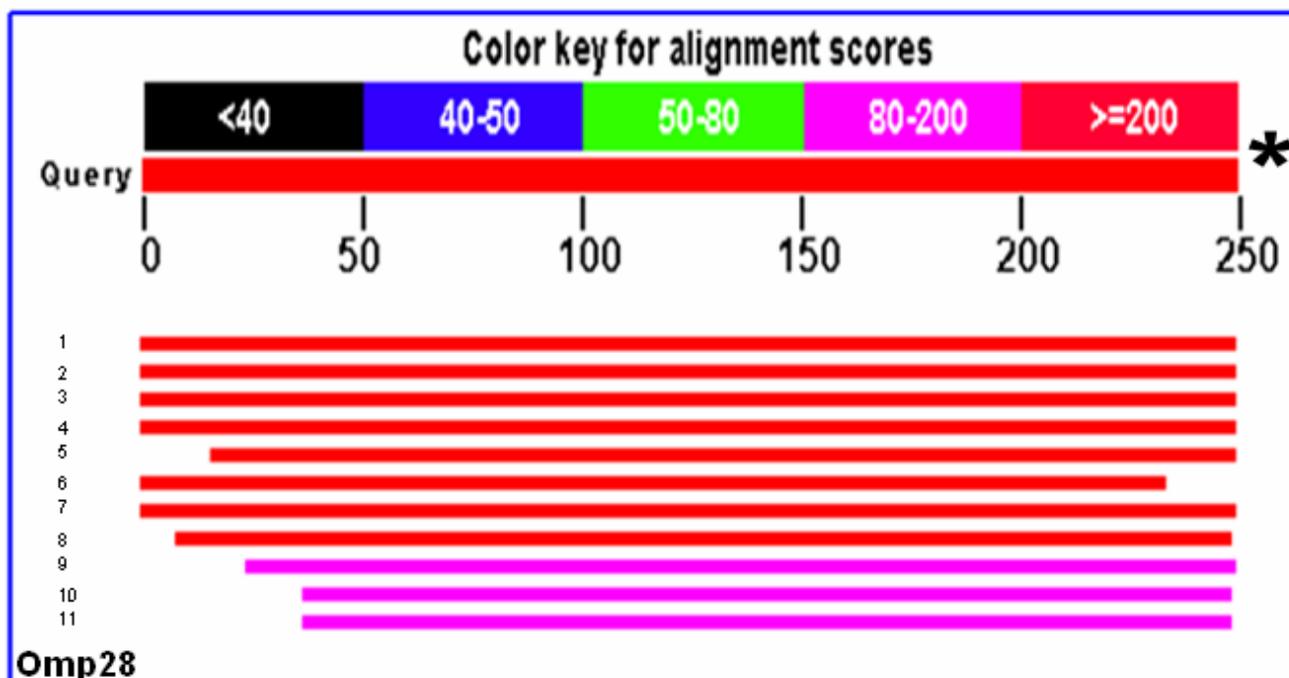


\* Proteína Omp14, 147 aminoácidos.

**Figura 11.** Diagrama obtenido de la búsqueda en el BLAST del NCBI de la proteína Omp14, donde la barra en rojo muestra una homología mayor a 200 y las barras en rosa indican una homología entre 80 y 200 con respecto a la proteína.

**Tabla 6.** Homología de la proteína Omp14 (BLAST) comparada con otros microorganismos.

No.	Clave de acceso	Descripción
1	<a href="#">ref NP_541530.1 </a>	Hypothetical protein BMEI10552 [ <i>Brucella melitensis</i> 16M]
2	<a href="#">ref ZP_01416535.1 </a>	conserved hypothetical transmembrane signal peptide protein [ <i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419]
3	<a href="#">ref NP_386088.1 </a>	HYPOTHETICAL TRANSMEMBRANE SIGNAL PEPTIDE PROTEIN [ <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021]
4	<a href="#">ref YP_001257575.1 </a>	Hypothetical protein BOV_A0553 [ <i>Brucella ovis</i> ATCC 25840]
5	<a href="#">ref NP_102453.1 </a>	Hypothetical protein mlr0699 [ <i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099]
6	<a href="#">ref YP_223409.1 </a>	Hypothetical protein BruAb2_0637 [ <i>Brucella abortus</i> biovar 1 str.
7	<a href="#">ref NP_353753.1 </a>	Hypothetical protein AGR_C_1322 [ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58]
8	<a href="#">ref NP_353754.1 </a>	Hypothetical protein AGR_C_1323 [ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58]
9	<a href="#">ref NP_699771.1 </a>	Hypothetical protein BRA0587 [ <i>Brucella suis</i> 1330]

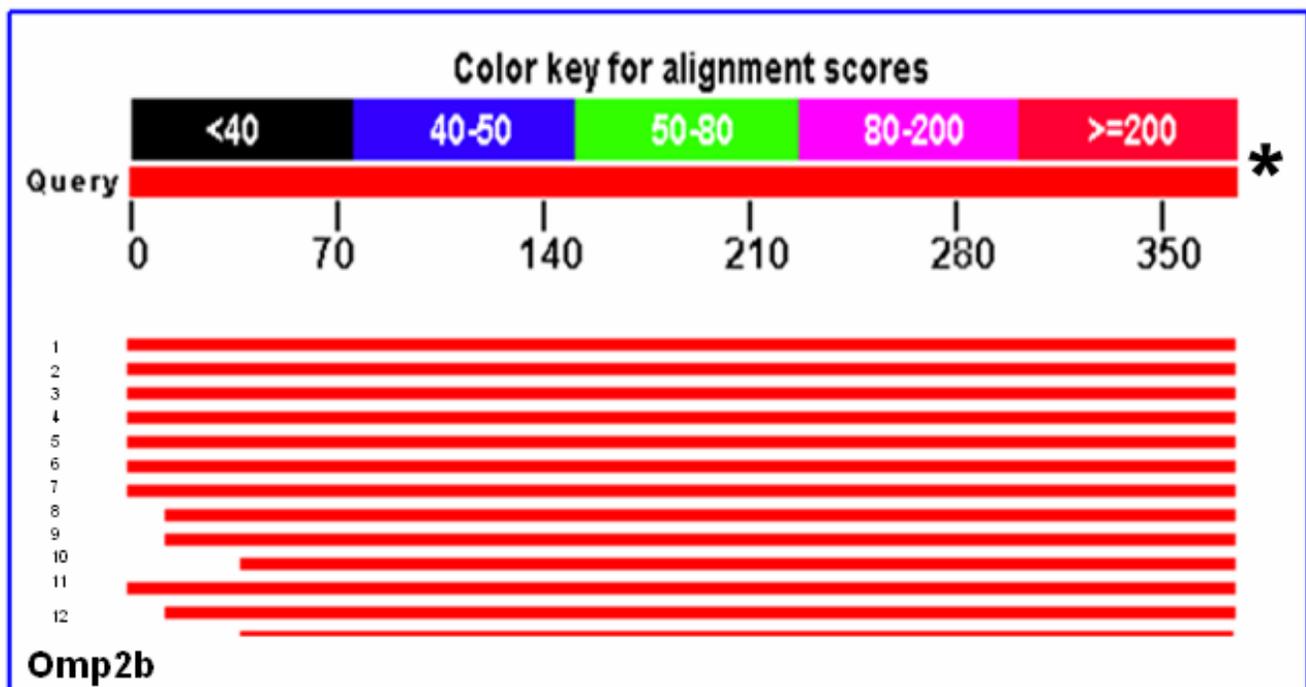


\* Proteína Omp28, 250 aminoácidos.

**Figura 12.** Diagrama obtenido de la búsqueda en el BLAST del NCBI de la proteína Omp28, donde las barras en rojo muestran una homología mayor a 200 las barras en rosa indican una homología entre 80 y 200 con respecto a la proteína.

**Tabla 7.** Homología de la proteína Omp28 (BLAST) comparada con otros microorganismos.

No.	Clave de acceso	Descripción
1	<a href="#">ref NP_539453.1 </a>	PERIPLASMIC IMMUNOGENIC PROTEIN [ <i>Brucella melitensis</i> 16M]
2	<a href="#">gb AAO39767.1 </a>	BP26 [ <i>Brucella melitensis</i> biovar <i>abortus</i> ]
3	<a href="#">ref YP_414862.1 </a>	Immunoreactive 28 kDa outer membrane protein [ <i>Brucella melitensis</i> biovar <i>abortus</i> 2308]
4	<a href="#">gb AAT51971.1 </a>	Omp28 precursor [ <i>Brucella melitensis</i> ]
5	<a href="#">ref YP_001259360.1 </a>	Immunoreactive 28 kDa outer membrane protein [ <i>Brucella ovis</i> ATCC 25840]
6	<a href="#">gb ABC17803.1 </a>	BP26 [ <i>Brucella</i> sp. SSO-1]
7	<a href="#">sp Q44642 BP26_BRUAB</a>	26 kDa periplasmic immunogenic protein precursor
8	<a href="#">ref YP_674631.1 </a>	Protein of unknown function DUF541 [ <i>Mesorhizobium</i> sp. BNC1]
9	<a href="#">ref YP_470429.1 </a>	Hypothetical conserved membrane protein [ <i>Rhizobium etli</i> CFN 42]
10	<a href="#">ref NP_386413.1 </a>	Hypothetical protein SMC01556 [ <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021]
11	<a href="#">ref ZP_01414248.1 </a>	Conserved hypothetical protein [ <i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419]

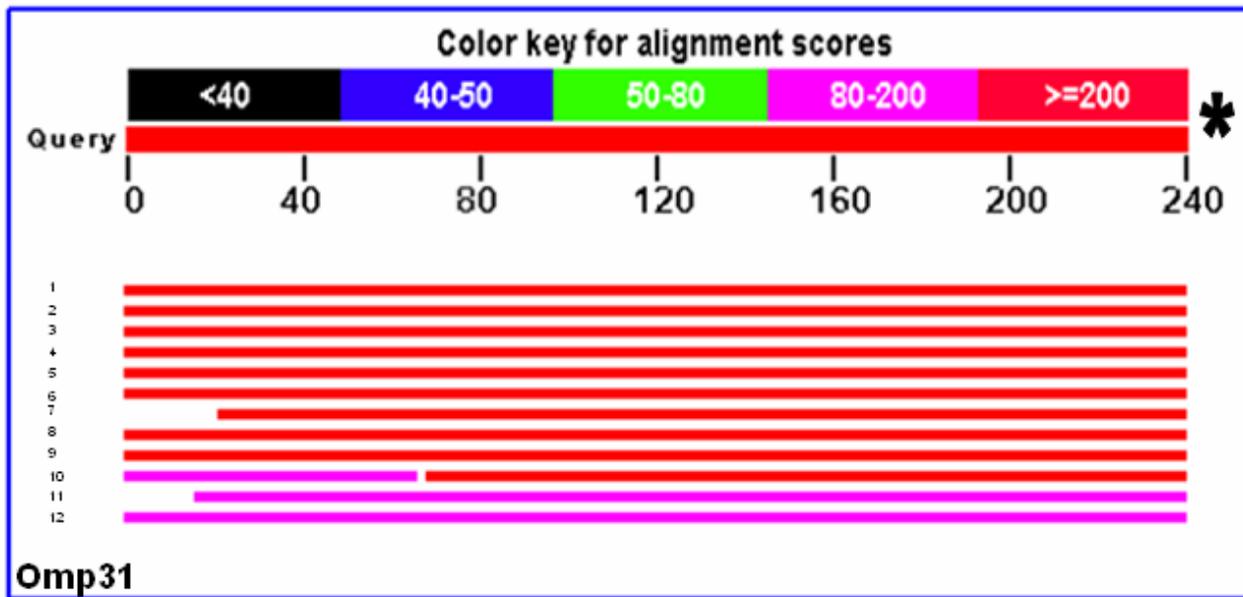


\* Proteína Omp2b, 375 aminoácidos.

**Figura 13.** Diagrama obtenido de la búsqueda en el BLAST del NCBI de la proteína Omp2b, donde las barras en rojo muestran una homología mayor a 200 con respecto a la proteína.

**Tabla 8.** Homología de la proteína Omp2b (BLAST) comparada con otros microorganismos.

No.	Clave de acceso	Descripción
1	<a href="#">gb AAA67790.1 </a>	Porin [ <i>Brucella melitensis</i> ]
2	<a href="#">ref NP_540222.1 </a>	PORIN [ <i>Brucella melitensis</i> 16M]
3	<a href="#">ref YP_221393.1 </a>	Omp2b, porin [ <i>Brucella abortus</i> biovar 1 str. 9-941]
4	<a href="#">ref NP_697653.1 </a>	Porin Omp2a [ <i>Brucella suis</i> 1330]
5	<a href="#">gb AAA67787.1 </a>	Porin [ <i>Brucella melitensis</i> biovar Canis]
6	<a href="#">gb AAA67793.1 </a>	Porin [ <i>Brucella melitensis</i> biovar Neotomae]
7	<a href="#">dbj BAD67159.1 </a>	Putative porin [ <i>Brucella sp.</i> JM13/00]
8	<a href="#">gb AAA83991.1 </a>	Unknown protein [ <i>Brucella melitensis</i> biovar Abortus]
9	<a href="#">emb CAM91982.1 </a>	Outer membrane protein 2b [ <i>Brucella sp.</i> CCM 4915]
10	<a href="#">gb AAX83996.1 </a>	Omp2b [ <i>Brucella melitensis</i> biovar Suis]
11	<a href="#">gb AAD03400.1 </a>	Putative porin [ <i>Brucella sp.</i> B202R]
12	<a href="#">gb ABP98814.1 </a>	Omp2b [ <i>Brucella ovis</i> ]

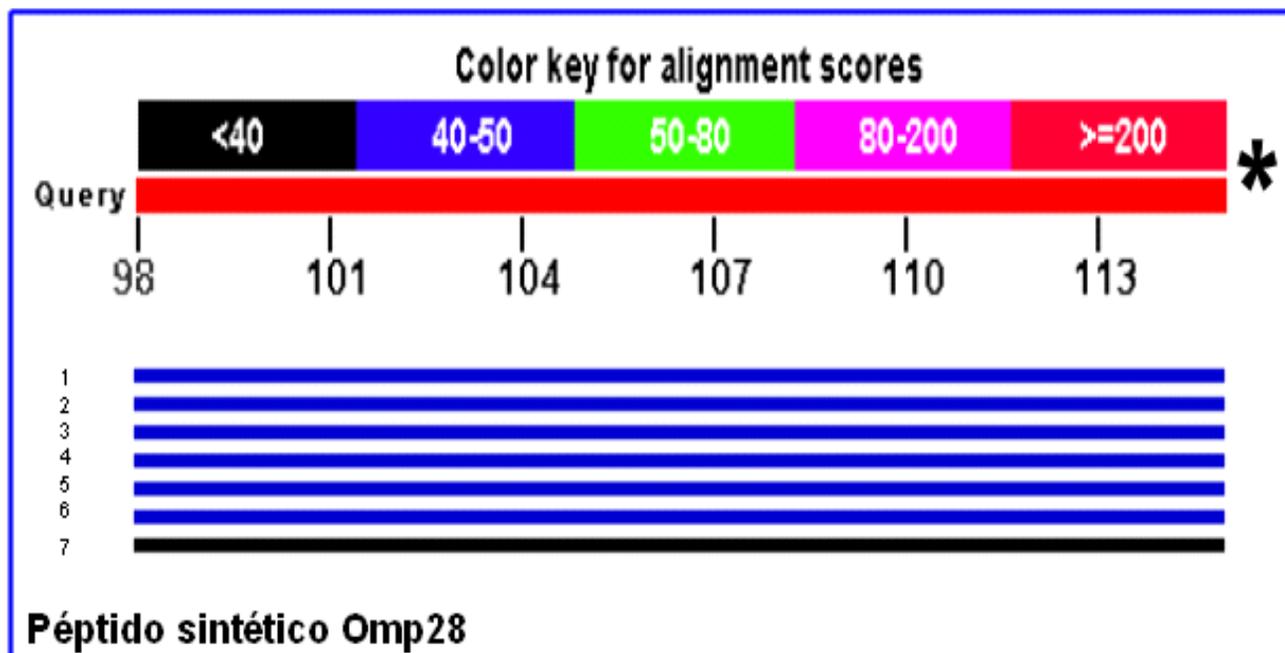


\* Proteína Omp31, 240 aminoácidos.

**Figura 14.** Diagrama obtenido de la búsqueda en el BLAST del NCBI de la proteína Omp31, donde las barras en rojo muestran una homología mayor a 200 y las barras en rosa indican una homología entre 80 y 200 con respecto a la proteína.

**Tabla 9.** Homología de la proteína Omp31 (BLAST) comparada con otros microorganismos.

No.	Clave de acceso	Descripción
1	<a href="#">gb AAL27296.1 AF366073_1</a>	Outer membrane protein Omp31 [ <i>Brucella melitensis</i> biovar Canis]
2	<a href="#">ref NP_699613.1 </a>	Outer membrane protein, 31 kDa [ <i>Brucella suis</i> 1330]
3	<a href="#">gb AAL27285.1 AF366062_1</a>	Outer membrane protein Omp31 [ <i>Brucella melitensis</i> ]
4	<a href="#">gb AAL27287.1 AF366064_1</a>	Outer membrane protein Omp31 [ <i>Brucella melitensis</i> biovar Suis]
5	<a href="#">gb AAL27289.1 AF366066_1</a>	Outer membrane protein Omp31 [ <i>Brucella melitensis</i> biovar Suis]
6	<a href="#">ref YP_001257410.1 </a>	Outer membrane protein Omp31 [ <i>Brucella ovis</i> ATCC 25840]
7	<a href="#">ref NP_541822.1 </a>	31 kDa outer-membrane immunogenic protein precursor [ <i>Brucella melitensis</i> 16M]
8	<a href="#">ref YP_222291.1 </a>	Omp31-1, outer membrane protein, 31 kDa [ <i>Brucella abortus</i> biovar 1 str. 9-941]
9	<a href="#">ref NP_698612.1 </a>	Outer membrane protein Omp31 [ <i>Brucella suis</i> 1330]
10	<a href="#">ref NP_539319.1 </a>	31 kDa OUTER-MEMBRANE IMMUNOGENIC PROTEIN PRECURSOR [ <i>Brucella melitensis</i> 16M]
11	<a href="#">ref NP_102534.1 </a>	Outer membrane protein [ <i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099]
12	<a href="#">ref ZP_01197246.1 </a>	Outer membrane protein Omp31 [ <i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2]

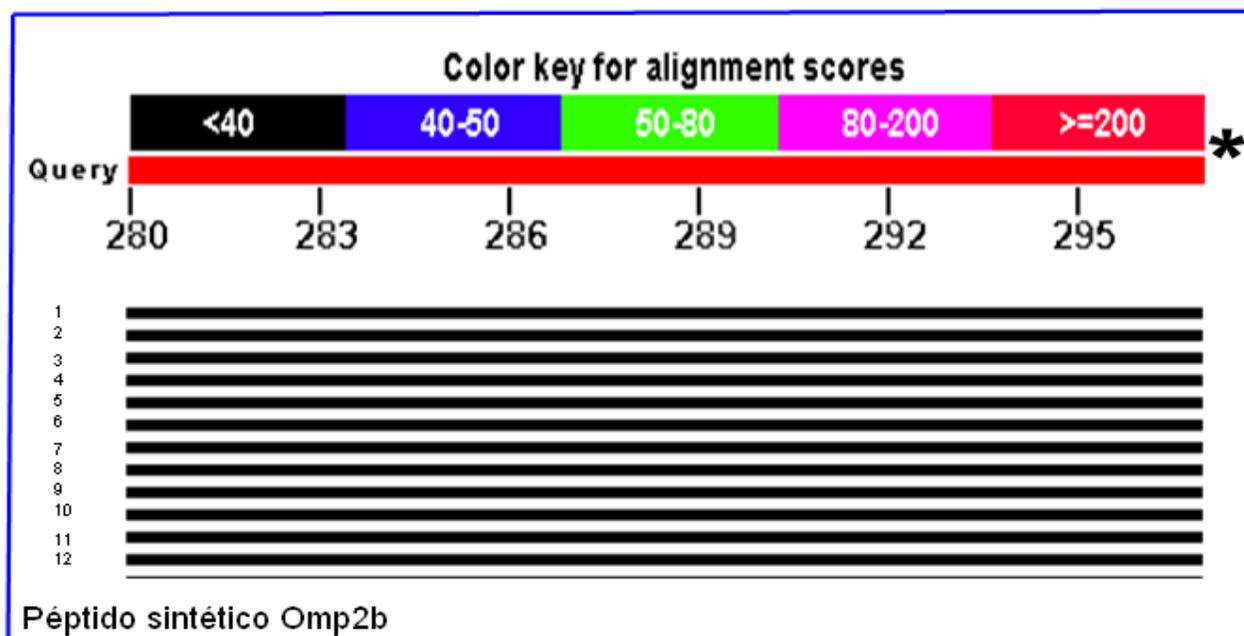


\* Longitud del péptido sintético Omp28 (aminoácido 99 a 115).

**Figura 15.** Diagrama obtenido de la búsqueda en el BLAST del NCBI de la secuencia del péptido sintético Omp28.

**Tabla 10.** Homología del péptido sintético Omp28 (BLAST).

No.	Clave de acceso	Descripción
1	<a href="#">gb ABC17803.1 </a>	BP26 [ <i>Brucella sp.</i> SSO-1]
2	<a href="#">ref NP_539453.1 </a>	PERIPLASMIC IMMUNOGENIC PROTEIN [ <i>Brucella melitensis</i> 16M]
3	<a href="#">gb AAT51971.1 </a>	Omp28 precursor [ <i>Brucella melitensis</i> ]
4	<a href="#">gb AAO39767.1 </a>	BP26 [ <i>Brucella melitensis</i> biovar Abortus]
5	<a href="#">ref YP_001259360.1 </a>	immunoreactive 28 kDa outer membrane protein [ <i>Brucella ovis</i> ATCC 25840]
6	<a href="#">sp Q44642 BP26_BRUAB</a>	26 kDa periplasmic immunogenic protein precursor
7	<a href="#">ref YP_414862.1 </a>	immunoreactive 28 kDa outer membrane protein [ <i>Brucella melitensis</i> biovar Abortus 2308]

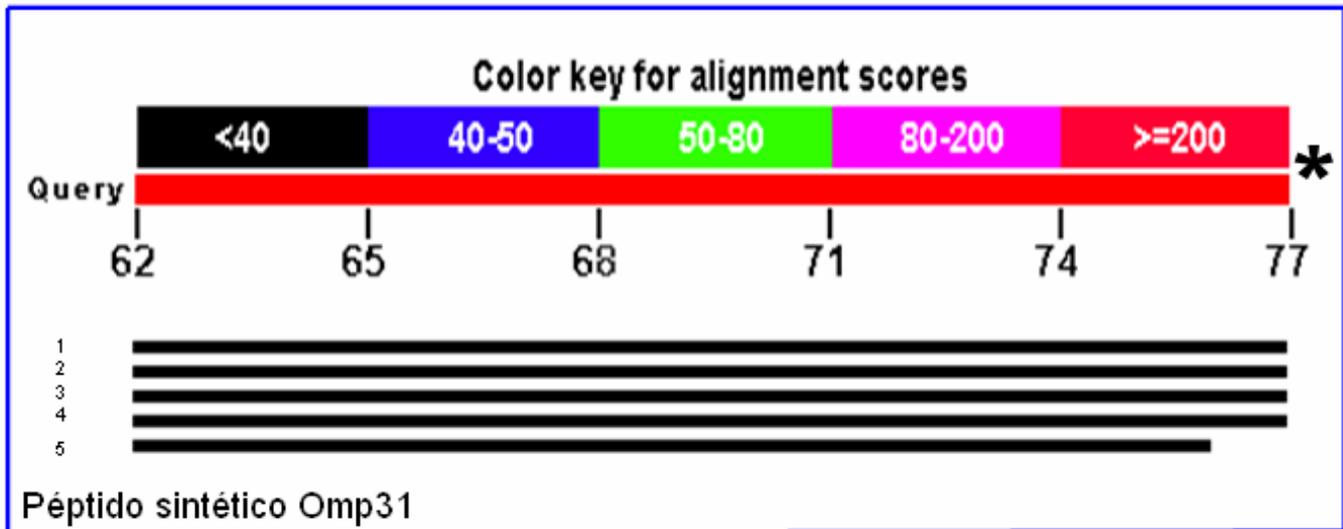


\* Longitud del péptido sintético Omp2b (aminoácido 281 a 297).

**Figura 16.** Diagrama obtenido de la búsqueda en el BLAST del NCBI de la secuencia del péptido sintético Omp2b.

**Tabla 11.** Homología del péptido sintético Omp2b (BLAST).

No.	Clave de acceso	Descripción
1	<a href="#">gb AAG15256.1 </a>	Omp2a [ <i>Brucella sp.</i> B14/94]
2	<a href="#">gb AAF80104.1 </a>	Omp2b porin [ <i>Brucella melitensis</i> biovar Abortus]
3	<a href="#">gb AAG15255.1 </a>	Omp2b [ <i>Brucella sp.</i> B14/94]
4	<a href="#">gb AAA67787.1 </a>	Porin [ <i>Brucella melitensis</i> biovar Canis]
5	<a href="#">ref NP_540222.1 </a>	PORIN [ <i>Brucella melitensis</i> 16M]
6	<a href="#">ref NP_697653.1 </a>	Porin Omp2a [ <i>Brucella suis</i> 1330]
7	<a href="#">ref YP_221393.1 </a>	Omp2b, porin [ <i>Brucella abortus</i> biovar 1 str. 9-941]
8	<a href="#">gb AAF80105.1 </a>	Omp2b porin [ <i>Brucella melitensis</i> biovar Suis]
9	<a href="#">gb AAA67790.1 </a>	Porin [ <i>Brucella melitensis</i> ]
10	<a href="#">emb CAM91982.1 </a>	Outer membrane protein 2b [ <i>Brucella sp.</i> CCM 4915]
11	<a href="#">gb AAX83998.1 </a>	Omp2b [ <i>Brucella melitensis</i> biovar Suis]
12	<a href="#">gb AAA83991.1 </a>	Unknown protein [ <i>Brucella melitensis</i> biovar Abortus]



\* Longitud del péptido sintético Omp31 (aminoácido 63 a 77).

**Figura 17.** Diagrama obtenido de la búsqueda en el BLAST del NCBI de la secuencia del péptido sintético Omp31.

**Tabla 12.** Homología del péptido sintético Omp31 (BLAST).

No.	Clave de acceso	Descripción
1	<a href="#">gb AAL27296.1 AF366073_1</a>	Outer membrane protein Omp31 [ <i>Brucella melitensis</i> biovar Canis]
2	<a href="#">gb AAL27285.1 AF366062_1</a>	Outer membrane protein Omp31 [ <i>Brucella melitensis</i> ]
3	<a href="#">ref NP_699613.1 </a>	Outer membrane protein, 31 kDa [Brucella suis 1330]
4	<a href="#">ref NP_541822.1 </a>	31 kDa outer-membrane immunogenic protein precursor [ <i>Brucella melitensis</i> 16M]
5	<a href="#">gb AAL27289.1 AF366066_1</a>	Outer membrane protein Omp31 [ <i>Brucella melitensis</i> biovar Suis]

## Discusión.

En el caso particular de *Brucella*, sus proteínas de la membrana externa (OMP's) han sido objeto de interés en cuanto al desarrollo de inmunógenos, pues han mostrado conferir protección en modelos murinos y han sido empleadas como antígenos para el diagnóstico de la enfermedad. En este trabajo se evaluó la respuesta inmune humoral en cobayos, los cuales habían sido inoculados con péptidos sintéticos desarrollados a partir de secuencias de distintas OMPS de *Brucella melitensis*, encontrándose que la inducción de anticuerpos en estos animales fue similar a la presentada por el control positivo, el cuál consistió en el suero de un cobayo inoculado experimentalmente con la cepa 33 de *Brucella melitensis*. Estos datos sugieren que los péptidos empleados fueron capaces de inducir una respuesta inmune humoral muy similar a la desarrollada durante la infección; sin embargo, esto no significa que una vacuna a partir de péptidos sintéticos genere protección contra la enfermedad, para probar esto son necesarios más estudios. En este punto cabe señalar que los valores previos al desafío y después del mismo no mostraron diferencia estadística significativa, lo cuál confirma que con el uso de estos péptidos sintéticos se generaron niveles de anticuerpos muy similares a los que generan las OMP's durante la infección.

Para la evaluación de la inmunidad en los cobayos, se empleó un extracto de PME de *B. melitensis*, el perfil electroforético en estos extractos mostró bandas de pesos moleculares aproximados de 95.5, 85.2, 77.7, 67.7, 63.1, 51, 45.7, 39, 36.1, 31.6, 24.5, 18.2, 12.9 kDa. Algunas de estas bandas corresponden en peso a las proteínas Omp14, Omp28, Omp31 y Omp2b, que como se menciona anteriormente, fueron utilizadas como modelo para diseñar los péptidos sintéticos. Debido a que estas proteínas aparecen en el extracto proteico, su utilización como antígeno de captura en pruebas de ELISA fue apropiada en la evaluación de

la respuesta inmune generada por los péptidos sintéticos. En este estudio también se emplearon los péptidos sintéticos como antígeno de captura, sin embargo debido a que los resultados obtenidos no mostraron diferencias entre los distintos grupos de animales inmunizados y no inmunizados, incluso con aquellos animales que fueron desafiados, los resultados no aparecen en este trabajo. Una explicación posible para estos resultados, es que la fijación del antígeno a las placas no resultó ser la adecuada, más experimentos son necesarios para verificar este punto.

El uso de componentes estructurales de microorganismos patógenos, como es el caso de las proteínas, es de gran interés para el desarrollo de agentes protectores o nuevas vacunas dirigidas, no sólo hacia la salud animal si no también al ser humano. En este estudio los péptidos empleados tuvieron la capacidad de inducir anticuerpos en cobayos. La ventaja de emplear péptidos sintéticos en comparación con péptidos recombinantes expresados por alguna bacteria no patógena diferente a *Brucella*, radica principalmente en que no existe contaminación con el LPS endógeno, que pudiera interferir con el diagnóstico.

Estudios realizados por Cassataro y col., mostraron que la aplicación de un péptido sintético de 27 aminoácidos a partir de la Omp31 unido con una molécula acarreadora produjo una protección similar a la inducida por la vacuna Rev. 1<sup>56, 57</sup>. En nuestro caso el péptido correspondiente a Omp31 es más pequeño que el que se utilizó en el trabajo citado; sin embargo, comparte 11 aminoácidos y la respuesta obtenida fue significativa, si se le compara con la respuesta de los animales infectados.

En este estudio los distintos péptidos no mostraron diferencias significativas entre sí en relación a la inmunidad humoral que generaron, lo cuál se podría comprender si se considera

que los valores de las medias eran distintos, pero dada la amplia desviación estándar ocasionada por un número pequeño de animales por tratamiento, el análisis de varianza indicó que no existía diferencia significativa. Sin embargo es importante recalcar que los péptidos empleados son distintos entre sí de acuerdo a su perfil hidropático, por lo cual es poco probable que tuvieran un comportamiento similar. Esta cuestión también es importante si se considera que los animales que recibieron una mezcla de los péptidos también mostraron un comportamiento similar, en este caso fue la dosis que se administró durante el programa de vacunación la que influyó en los resultados, ya que para las vías subcutánea y nasal, la dosis para los cuatro primeros grupos fue de 50  $\mu\text{g}$  y para el quinto grupo (mezcla de péptidos) se utilizaron 25  $\mu\text{g}$  de cada uno de los péptidos, lo que nos podría indicar que el quinto grupo fue vacunado con una subdosis, por lo tanto los valores que presentaron en la evaluación no pueden ser interpretados, pues se esperaba que este grupo fuera el que presentara una mejor respuesta.

En el caso de las distintas rutas de inoculación empleadas no se encontró diferencia significativa entre ellas en la respuesta humoral que generaron, nuevamente en este caso los valores de las medias eran distintos pero debido a la desviación estándar amplia, no se pueden considerar como significativas. Sin embargo en términos generales podría decirse que la inoculación por la vía subcutánea fue la que mayor cantidad de anticuerpos específicos generó, por lo que puede decirse que esta vía sería apropiada para futuras inmunizaciones, aunque también debe considerarse que en la vía nasal no se utilizó adyuvante y se presentaron resultados similares a los obtenidos por la inoculación vía subcutánea, con lo cual se podría suponer que las dos vías de inoculación son efectivas. Es necesario aclarar en este punto que en el caso de la inmunidad humoral evaluada en los animales que recibieron los péptidos por vía nasal no fue IgA, sino IgG, aun así la respuesta observada fue semejante a

los de la vía subcutánea. Esto sugiere que los péptidos utilizados en este trabajo pueden generar una respuesta inmune humoral satisfactoria al ser administrados por la vía nasal, un trabajo posterior deberá ser para este caso, la evaluación de la respuesta IgA secretora. Así mismo, se debe mencionar que la respuesta celular no fue evaluada, para determinar este punto son necesarias nuevas evaluaciones en las cuales se deberá determinar tanto la respuesta inmune humoral como la respuesta celular.

La búsqueda de homologías de las proteínas OMP14, OMP28, OMP31 y OMP2b, mostró que solo tienen homología con microorganismos de la familia *Rhizobiaceae*, sin embargo en nuestro estudio sólo fueron utilizadas pequeñas secuencias de aminoácidos que corresponden a los péptidos sintetizados los cuales no muestran homología con otros microorganismos, es decir, corresponden con el género *Brucella*, por lo tanto podría mencionarse que los péptidos son específicos y no tendrían reacciones cruzadas que pudieran alterar los resultados obtenidos en estas pruebas. En esta búsqueda, el péptido OMP14, no tuvo homología con ninguna proteína registrada en las base de datos del GenBank.

Tres de los cuatro péptidos evaluados (Omp31, Omp28 y Omp2b), empleados en este trabajo, fueron sintetizados a partir de proteínas que han sido ampliamente estudiadas y son consideradas como inmunogénicas, pues producen cierta protección. También han sido propuesto su uso como antígenos para el desarrollo de pruebas de diagnóstico para la brucelosis, incluso para diferenciar a los animales infectados de los vacunados. En este trabajo si bien no se evaluó la protección inducida por estos péptidos, la capacidad de generar anticuerpos es consistente con lo descrito en la literatura <sup>2, 10, 22, 28, 29, 33, 47, 58</sup>.

En el caso de Omp14, aunque la información es escasa, se conoce que es una proteína inmunoreactiva y que induce respuesta inmune humoral y celular durante el curso de la infección <sup>58</sup>. En nuestro trabajo la inmunidad inducida por el péptido correspondiente, fue la mejor, cuando se inoculó por vía subcutánea, lo cual coincide con lo descrito por Chirhart-Gilleland <sup>58</sup>. Estos datos nos sugieren que esta proteína es un excelente candidato como inmunógeno.

En el desarrollo de nuevas vacunas para prevenir la brucelosis el enfoque ha cambiado en los últimos años, ahora se considera el empleo de proteínas como las de la membrana externa, incluso en este caso, no sólo se ha considerado el uso de la estructura completa de estas proteínas como inmunógenos, sino fracciones de la misma. Tal es el caso de los péptidos sintéticos que muestran ciertas ventajas sobre otras vacunas, primero no se trata de organismos vivos atenuados, por lo cual son totalmente inocuos, incluso para animales inmunocomprometidos, segundo, se trata solo de estructuras seleccionadas por su inmunogenicidad y su ubicación en la membrana celular, por lo tanto la respuesta inducida es mucho más específica; tercero, al ser altamente puros (libres de contaminación por LPS o peptidoglicano), son seguros, es decir que no inducen reacciones secundarias a su aplicación y cuarto, que en su producción a gran escala, el personal que las elabora no esta expuesto a ningún riesgo de contagio, pues no se está en contacto directo con el microorganismo infeccioso. Cabe agregar que las vacunas basadas en péptidos sintéticos no requieren de cadena fría para su almacenamiento <sup>43</sup>.

Finalmente cabe señalar que en la mayoría de los trabajos en los que se utilizan péptidos sintéticos como posibles inmunógenos, se emplean moléculas acarreadoras para desarrollar una respuesta inmunológica mayor, mientras que en este estudio no se utilizaron y se pudo observar una respuesta inmune humoral.

Con los resultados obtenidos en este trabajo se puede mencionar que el sistema inmunitario de los animales empleados en la experimentación, fue estimulado pues se detectó la presencia de IgG en suero, por lo que se puede inferir que los péptidos utilizados en este estudio producen al menos una respuesta inmune humoral, muy similar a la encontrada en animales infectados. Así mismo cabe señalar que de entre los péptidos evaluados el Omp14 inoculado por vía subcutánea presentó valores por arriba de los demás, incluyendo el control positivo. Este trabajo sienta las bases para el desarrollo de nuevas vacunas para la brucelosis, las cuales pueden ser empleadas en los humanos. Con el desciframiento del genoma de diferentes especies de *Brucella* se han identificado genes que son esenciales para su patogenicidad, virulencia y antigenicidad en los huéspedes naturales, las proteínas codificadas por dichos genes pueden ser utilizadas para el desarrollo de vacunas con péptidos sintéticos <sup>48</sup>.

## **CONCLUSIONES.**

- En este trabajo se detectó una respuesta inmune humoral específica en cobayos que fueron inmunizados con péptidos sintéticos diseñados a partir de distintas OMP's de *Brucella spp.*
- La respuesta inmunológica se observó en las dos vía de inoculación y fue estadísticamente significativa.
- La vía subcutánea fue la vía que generó una mayor cantidad de anticuerpos.
- El péptido Omp14 inoculado por la vía subcutánea indujo una respuesta inmune humoral mayor a la presentada por los otros grupos.

## **PERSPECTIVAS.**

- Repetir la inmunización empleando el modelo experimental de ratón, con el fin de evaluar estos péptidos sintéticos.
- Utilizar una molécula acarreadora con los péptidos sintéticos para generar una respuesta inmunológica mayor.
- Evaluar los niveles IgA, cuando los péptidos hallan sido inoculados por vía nasal.
- Evaluar la respuesta inmune celular inducida por los péptidos sintéticos.
- Determinar el nivel de protección de la vacuna.

## BIBLIOGRAFÍA.

1. Pappas Georgios, M.D., Akritidis Nikolaos, M.D., Bosilkovski Mile, M.D., and Tsianos Epameinondas, M.D. Brucellosis. *New England Journal of Medicine* 2005. 352: 2325-2336.
2. Moriyón Ignacio, López Goñi Ignacio. Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Internatl. Microbiol.* 1998. Vol.1: 19-26.
3. Cutler S. J., Whatmore A. M. and Commander N. J. Brucellosis- new aspects of an old disease. *Journal of Applied Microbiology* 2005. 98: 1270-1281.
4. <http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/>
5. Moreno Edgar and Moriyón Ignacio. *Brucella melitensis*: A nasty bug with hidden credentials for virulence. *PNAS* 2002; 99, No.1: 1-3.
6. Nicoletti Paul. A short history of brucellosis. *Veterinary Microbiology* 2002; 90: 5-9.
7. M. Ruiz Castañeda. Brucelosis. Ed. científicas La Prensa Médica Mexicana, S. A. 3ra. Edición. 1986.
8. Luna Martínez J. Eduardo, Mejía Terán Claudia. Brucellosis in Mexico: current status and trends. *Veterinary Microbiology* 2002. 90: 19-30.
9. World Health Organization. The Development of New/ Improved Brucellosis Vaccines: Report of WHO Meeting 1997. 1-48.
10. Cloeckaert Axel, Vizcaíno Nieves, Yves Paquet Jean, A. Bowden Raúl, H. Elzer Philip. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp: past, present and future. *Veterinary Microbiology* 2002; 90: 229-247.

11. Fretin D., Fauconnier A., Köhler S., Halling S., Léonard S., Nijskens C., Ferooz J., Lestrade P., Delrue R. M., Danese I., Vandenhoute J., Tibor A., De Bolle X., and Letesson J. J. The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cellular Microbiology* 2005; Vol. 7, No.5: 687-698.
12. Verstrete D. R., Creasy M. T., Caveney N. T., Baldwin C. L., Blab M. W., and Winter A. J. Outer Membrane Proteins of *Brucella abortus*: Isolation and Characterization. *Infection and Immunity* 1982. Vol. 35, No. 3: 979-989.
13. Moreno Edgar. Brucellosis in Central America. *Veterinary Microbiology* 2002; 90: 31-38.
14. White Philip G., and Wilson J.B. Differentiation of smooth and nonsmooth colonies of *Brucellae*. Department of Agricultural Bacteriology, University of Wisconsin, 1950. Notes.
15. Gamazo Carlos and Moriyón Ignacio. Release of Outer Membrane Fragments by Exponentially Growing *Brucella melitensis* Cells. *Infection and Immunity* 1987. Vol.55,No.3: 609-615.
16. Gómez-Miguel María J., Moriyón Ignacio, and López José. Brucella Outer Membrane Lipoprotein Shares Antigenic Determinants with Escherichia coli Braun Lipoprotein and Is Exposed on the Cell Surface. *Infección and Immunity* 1987. Vol. 55, No.1: 258-262.
17. Martínez de Tejada G., Pizarro Cerdá, Moreno E. and Moriyón I. The Outer Membranes of *Brucella spp.* are Resistant to Bactericidal Cationic Peptides. *Infection and Immunity* 1995; 63, No.8: 3054-3061.
18. M. Monir Madkour. Brucellosis. 1989.

19. Cloeckaert A., De Wergifosse P., Dubray D. and Limet J. N. Identification of Seven Surface- Exposed *Brucella* Outer Membrane Proteins by Use of Monoclonal Antibodies: Immunogold Labeling for electron Microscopy and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Infection and Immunity* 1990; 58 No.12: 3980-3987.
20. Dubray G., Bézard G. Isolation of three protective cell-wall of *Brucella abortus* in experimental brucellosis in mice. *Ann. Rech. Vet.* 1980. Vol. 11: 367-373.
21. Dubray G. Protective antigens in brucellosis. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol*, 1987. Vol. 138: 84-87.
22. Salhi Imed, Boigegrain Rose-Anne, Machold Jan, Weise Christoph, Cloeckaert Axel and Rouot Bruno. Characterization of New Members of Group 3 Outer Membrane Protein Family of *Brucella spp.* *Infection and Immunity* 2003; 71 No. 8: 4326-4332.
23. Gamazo Carlos, I.Vitas Ana, Moriyón Ignacio, López Goñi I. and Díaz Ramón. *Brucella* group 3 outer membrane proteins contain a heat- modifiable protein. *FEMS Microbiology Letters* 1993;112: 141-146.
24. S. Zygmunt Michel, Slih- Alj Debbarh Hanane, Cloeckaert Axel and Dubray Gérard. Antibody response to *Brucella melitensis* outer membrane antigens in naturally infected and Rev1 vaccinated sheep. *Veterinary Microbiology* 1994; 39: 33-46.
25. Tibor Anne, Decelle Beatrice and Letesson Jean-Jacques. Outer Membrane Proteins Omp10, Omp16, and Omp19 of *Brucella spp.* Are Lipoproteins. *Infection and Immunity* 1999; vol.67, No. 9: 4960-4962.
26. Paquet Jean-Yves, A.Díaz María, Genevrois Stephanie, Grayon Maggy, Verger Jean-Michel, De Bolle Xavier, H. Lakey Jeremy, Letesson Jean – Jacques, and Cloeckaert Axel. Molecular, Antigenic, and Functional Analyses of Omp2b Porin Size Variants of *Brucella spp.* *Journal of Bacteriology* 2001; Vol.183, No.16: 4839-4847.

27. Vizcaíno Nieves, Cloeckaert Axel, S. Zygmunt Michel, and Dubray Gérard. Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression of the *Brucella melitensis omp31* Gene Coding for an Immunogenic Major Outer Membrane Protein. *Infection and Immunity* 1996; Vol.64, No.9: 3744-3751.
28. Bowden Raúl A., Estein Silvia M. Zygmunt Michel S., Dubray Gérard and Cloeckaert. Identification of protective outer membrane antigens of *Brucella ovis* by passive immunization of mice with monoclonal antibodies. *Microbes and Infection* 2000; 2: 481-488.
29. Cassataro Juliana, Pasquevich Karina, Bruno Laura, Wallach Jorge C., Fossati Carlos A., and Baldi Pablo C. Antibody Reactivity to Omp31 from *Brucella melitensis* in Human and Animal Infections by Smooth and Rough Brucellae. *Clinical and Diagnostic Lab. Immunology* 2004; Vol.11, No: 111-114.
30. Vizcaíno Nieves, Caro-Hernández Paola, Cloeckaert Axel, Fernández Lago Luís. DNA polymorphism in the omp25/omp31 family of *Brucella spp.*: identification of a 1.7-kb inversion in *Brucella cetaceae* and of a 15.1-kb genomic island, absent from *Brucella ovis*, related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide. *Microbes and Infection* 2004; 6: 821-834.
31. Seco Mediavilla Patricia, Verger Jean Michel, Grayon Maggy, Cloeckaert Axel, M. Marín Clara, S. Zygmunt Michel, Fernández Lago Luis, and Vizcaíno Nieves. Epitope Mapping of the *Brucella melitensis* BP26 Immunogenic Protein: Usefulness for Diagnosis of Sheep Brucellosis. *Clinical and Diagnostic Lab. Immunology* 2003; Vol. 10, No.4: 647-651.
32. Cloeckaert Axel, Baucheron Sylvie, Vizcaíno Nieves, and S. Zygmunt Michel. Use of Recombinant BP26 Protein in Serological Diagnosis of *Brucella melitensis* Infection in Sheep. *Clinical and Diagnostic Lab. Immunology* 2001; Vol. 8, No.4: 772-775.

33. Slih- Alj Debbarih Hanane, S. Zygmunt Michel, Dubray Gérard and Cloeckert Axel. Competitive enzyme- linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies to the *Brucella melitensis* BP26 protein to evaluate antibody responses in infected and *B. melitensis* Rev. 1 vaccinated sheep. *Veterinary Microbiology*, 1996. Vol. 53: 325-337.
34. Yagupsky Pablo, Jo Baron Ellen. Laboratory Exposures to Brucellae and Implications for Bioterrorism. *Emerging Infectious Diseases*. 2005; Vol. 11, No. 8: 1180-1185.
35. Noviello Stephanie, Gallo Richard, Kelly Molly, Limberger Ronald J. Laboratory-acquired Brucellosis. *Emerg. Infec. Disea.* 2004; Vol. 10, No. 10: 1848-1850.
36. Fiori Pier Luigi, Mastrandrea Scilla, Rappelli Paola and Cappuccinelli Piero. *Brucella abortus* Infection Acquired in Microbiology Laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000; Vol. 38, No. 5: 2005-2006.
37. Pappas G., Panagopoulou P., Christou L., and Akritidis N. *Brucella* as a biological weapon. *Cellular and molecular Life Sciences* 2006. 63: 2229-2236.
38. A. Minas. Control and eradication of brucellosis in small ruminants. *Small Ruminant Research*. 2005.
39. Arnon Ruth and Ben-Yedidia Tamar. Old and new vaccine approaches. *International Immunopharmacology* 2003; Vol.3: 1195-1204.
40. Blasco J. M. Existing and future vaccines against brucellosis in small ruminants. *Small Ruminant Research* 2006; 1-5.
41. G. Schurig Gerhardt, Sriranganathan Nammalwar, J. Corbel Michael. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Veterinary Microbiology* 2002. Vol. 90: 479-496.
42. Brucellosis 2005 International Research Conference. October 15-19, 2005. Mérida, Yucatán México. Universidad Autónoma de Yucatán.

43. Demotz Stéphane, Moulon Corinne, Roggero Mario A., Fasel Nicolas, Masina Slavica. Native-like, long synthetic peptides as components of sub-unit vaccines: practical and theoretical considerations for their use in humans. *Molecular Immunology* 2001. Vol 38: 415-422.
44. Aucouturier J., Dupuis L. and Ganne. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine* 2001; Vol.19: 2666-2672.
45. Olive Colleen, Batzloff Michael, Horváth Aniko, Clair Timothy, Yarwood Penny, Toth Istvan, and Good Michael F. Potential of Lipid Core Peptide Technology as a Novel Self-Adjuvanting Vaccine Delivery System for Multiple Different Synthetic Peptide Immunogens. *Infection and Immunity* 2003. Vol. 71, No. 5: 2373-2383.
46. Ding Xuan Z., Bhattacharjee Apurba, Nikolich Mikeljon P., Paulsen Ian T., Myers Gary, Seshadri Rekha and Hoover David L. Cloning, expression, and purification of *Brucella suis* outer membrane proteins. *Protein Expression and Purification* 2005; 40: 134-141.
47. Yang Xinghong, Hudson Mary, Walters Nancy, F. Bargatze Robert, and W. Pascual David. Selection of Protective Epitopes for *Brucella melitensis* by DNA Vaccination. *Infection and Immunity*, 2005; Vol. 73, No. 11: 7297-7303.
48. Shirley M. Halling. Paradigm shifts in vaccine development: lessons learned about antigenicity, pathogenicity and virulence of Brucellae. *Veterinary Microbiology* 2002. Vol. 90: 545-552.
49. Martínez Gómez D. Desarrollo y estandarización de un inmunoensayo enzimático indirecto como método de diagnóstico para la brucelosis caprina utilizando proteínas de la membrana externa de *Brucella melitensis*. Tesis de licenciatura. México D.F.: UNAM 1998.

50. Bradford M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annal Biochem* 1976; 1: 248-254.)
51. Verdugo Rodríguez A. Respuesta inmune humoral específica contra preparaciones de proteínas de la membrana externa de *Salmonella typhi*. Tesis Doctorado (Doctorado en Biotecnología)-UNAM. México 1993.
52. Towbin H, Staehlin T, Gordon J. Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocelulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl Acad. Sci.* 1979; vol. 76: 4350-4354.
53. Verdugo Rodríguez A. and Calva E. Denaturing Treatment of *Salmonella typhi* Outer Membrane Preparations for Improved Immunodiagnosis of Typhoid Fever. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 1993. Vol 1, No. 1: 113-116.
54. Verdugo Rodríguez A., López Vidal Y., Puente J. L., Ruíz Palacios G. M., Calva E. Early Diagnosis of Typhoid Fever an Enzyme Immunoassay Using *Salmonella typhi* Outer Membrane Protein Preparations. *Eur. J Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1993. Vol 12, No. 4: 248-254.
55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
56. Cassataro Juliana, A. Pasquevich Karina, M. Estein Silvia, A. Laplagne Diego, A. Velikovsky Carlos, de la Barrera Silvia, Bowden Raúl, A. Fossati Carlos, H. Giambartolomei Guillermo, and A. Goldbaum Fernando. 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* 2007: 1-10.

57. Cassataro Juliana, M. Estein Silvia, A. Pasquevich Karina, A. Velikovsky Carlos, de la Barrera Silvia, Bowden Raúl, A. Fossati Carlos, and H. Giambartolomei Guillermo. Vaccination with the Recombinant *Brucella* Outer Membrane Protein 31 or a Derived 27- Amino-Acid Synthetic Peptide Elicits a CD4+ T Helper 1 Response That Protects against *Brucella melitensis* Infection. *Infection and Immunity* 2005. Vol. 73, No. 12: 8079-8088.
58. L.Chirhart-Gilleland Rebecca, E. Kovach Michael, H. Elzer Philip, R.jennings Stephen, and Roop II R. Martin. Identification and Characterization of a 14- Kilodalton *Brucella abortus* Protein Reactive with Antibodies from Naturally and Experimentally Infected BALB/c Mice. *Infección and Immunity* 1998. Vol.66, No. 8: 4000-4003.

## BIBLIOGRAFÍA.

1. Pappas Georgios, M.D., Akritidis Nikolaos, M.D., Bosilkovski Mile, M.D., and Tsianos Epameinondas, M.D. Brucellosis. *New England Journal of Medicine* 2005. 352: 2325-2336.
2. Moriyón Ignacio, López Goñi Ignacio. Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Internatl. Microbiol.* 1998. Vol.1: 19-26.
3. Cutler S. J., Whatmore A. M. and Commander N. J. Brucellosis- new aspects of an old disease. *Journal of Applied Microbiology* 2005. 98: 1270-1281.
4. <http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/>
5. Moreno Edgar and Moriyón Ignacio. *Brucella melitensis*: A nasty bug with hidden credentials for virulence. *PNAS* 2002; 99, No.1: 1-3.
6. Nicoletti Paul. A short history of brucellosis. *Veterinary Microbiology* 2002; 90: 5-9.
7. M. Ruiz Castañeda. Brucelosis. Ed. científicas La Prensa Médica Mexicana, S. A. 3ra. Edición. 1986.
8. Luna Martínez J. Eduardo, Mejía Terán Claudia. Brucellosis in Mexico: current status and trends. *Veterinary Microbiology* 2002. 90: 19-30.
9. World Health Organization. The Development of New/ Improved Brucellosis Vaccines: Report of WHO Meeting 1997. 1-48.
10. Cloeckaert Axel, Vizcaíno Nieves, Yves Paquet Jean, A. Bowden Raúl, H. Elzer Philip. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp: past, present and future. *Veterinary Microbiology* 2002; 90: 229-247.

11. Fretin D., Fauconnier A., Köhler S., Halling S., Léonard S., Nijskens C., Ferooz J., Lestrade P., Delrue R. M., Danese I., Vandenhoute J., Tibor A., De Bolle X., and Letesson J. J. The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cellular Microbiology* 2005; Vol. 7, No.5: 687-698.
12. Verstrete D. R., Creasy M. T., Caveney N. T., Baldwin C. L., Blab M. W., and Winter A. J. Outer Membrane Proteins of *Brucella abortus*: Isolation and Characterization. *Infection and Immunity* 1982. Vol. 35, No. 3: 979-989.
13. Moreno Edgar. Brucellosis in Central America. *Veterinary Microbiology* 2002; 90: 31-38.
14. White Philip G., and Wilson J.B. Differentiation of smooth and nonsmooth colonies of *Brucellae*. Department of Agricultural Bacteriology, University of Wisconsin, 1950. Notes.
15. Gamazo Carlos and Moriyón Ignacio. Release of Outer Membrane Fragments by Exponentially Growing *Brucella melitensis* Cells. *Infection and Immunity* 1987. Vol.55,No.3: 609-615.
16. Gómez-Miguel María J., Moriyón Ignacio, and López José. Brucella Outer Membrane Lipoprotein Shares Antigenic Determinants with Escherichia coli Braun Lipoprotein and Is Exposed on the Cell Surface. *Infección and Immunity* 1987. Vol. 55, No.1: 258-262.
17. Martínez de Tejada G., Pizarro Cerdá, Moreno E. and Moriyón I. The Outer Membranes of *Brucella spp.* are Resistant to Bactericidal Cationic Peptides. *Infection and Immunity* 1995; 63, No.8: 3054-3061.
18. M. Monir Madkour. Brucellosis. 1989.

19. Cloeckaert A., De Wergifosse P., Dubray D. and Limet J. N. Identification of Seven Surface- Exposed *Brucella* Outer Membrane Proteins by Use of Monoclonal Antibodies: Immunogold Labeling for electron Microscopy and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Infection and Immunity* 1990; 58 No.12: 3980-3987.
20. Dubray G., Bézard G. Isolation of three protective cell-wall of *Brucella abortus* in experimental brucellosis in mice. *Ann. Rech. Vet.* 1980. Vol. 11: 367-373.
21. Dubray G. Protective antigens in brucellosis. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol*, 1987. Vol. 138: 84-87.
22. Salhi Imed, Boigegrain Rose-Anne, Machold Jan, Weise Christoph, Cloeckaert Axel and Rouot Bruno. Characterization of New Members of Group 3 Outer Membrane Protein Family of *Brucella spp.* *Infection and Immunity* 2003; 71 No. 8: 4326-4332.
23. Gamazo Carlos, I.Vitas Ana, Moriyón Ignacio, López Goñi I. and Díaz Ramón. *Brucella* group 3 outer membrane proteins contain a heat- modifiable protein. *FEMS Microbiology Letters* 1993;112: 141-146.
24. S. Zygmunt Michel, Slih- Alj Debbarh Hanane, Cloeckaert Axel and Dubray Gérard. Antibody response to *Brucella melitensis* outer membrane antigens in naturally infected and Rev1 vaccinated sheep. *Veterinary Microbiology* 1994; 39: 33-46.
25. Tibor Anne, Decelle Beatrice and Letesson Jean-Jacques. Outer Membrane Proteins Omp10, Omp16, and Omp19 of *Brucella spp.* Are Lipoproteins. *Infection and Immunity* 1999; vol.67, No. 9: 4960-4962.
26. Paquet Jean-Yves, A.Díaz María, Genevrois Stephanie, Grayon Maggy, Verger Jean-Michel, De Bolle Xavier, H. Lakey Jeremy, Letesson Jean – Jacques, and Cloeckaert Axel. Molecular, Antigenic, and Functional Analyses of Omp2b Porin Size Variants of *Brucella spp.* *Journal of Bacteriology* 2001; Vol.183, No.16: 4839-4847.

27. Vizcaíno Nieves, Cloeckaert Axel, S. Zygmunt Michel, and Dubray Gérard. Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression of the *Brucella melitensis omp31* Gene Coding for an Immunogenic Major Outer Membrane Protein. *Infection and Immunity* 1996; Vol.64, No.9: 3744-3751.
28. Bowden Raúl A., Estein Silvia M. Zygmunt Michel S., Dubray Gérard and Cloeckaert. Identification of protective outer membrane antigens of *Brucella ovis* by passive immunization of mice with monoclonal antibodies. *Microbes and Infection* 2000; 2: 481-488.
29. Cassataro Juliana, Pasquevich Karina, Bruno Laura, Wallach Jorge C., Fossati Carlos A., and Baldi Pablo C. Antibody Reactivity to Omp31 from *Brucella melitensis* in Human and Animal Infections by Smooth and Rough Brucellae. *Clinical and Diagnostic Lab. Immunology* 2004; Vol.11, No: 111-114.
30. Vizcaíno Nieves, Caro-Hernández Paola, Cloeckaert Axel, Fernández Lago Luís. DNA polymorphism in the omp25/omp31 family of *Brucella spp.*: identification of a 1.7-kb inversion in *Brucella cetaceae* and of a 15.1-kb genomic island, absent from *Brucella ovis*, related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide. *Microbes and Infection* 2004; 6: 821-834.
31. Seco Mediavilla Patricia, Verger Jean Michel, Grayon Maggy, Cloeckaert Axel, M. Marín Clara, S. Zygmunt Michel, Fernández Lago Luis, and Vizcaíno Nieves. Epitope Mapping of the *Brucella melitensis* BP26 Immunogenic Protein: Usefulness for Diagnosis of Sheep Brucellosis. *Clinical and Diagnostic Lab. Immunology* 2003; Vol. 10, No.4: 647-651.
32. Cloeckaert Axel, Baucheron Sylvie, Vizcaíno Nieves, and S. Zygmunt Michel. Use of Recombinant BP26 Protein in Serological Diagnosis of *Brucella melitensis* Infection in Sheep. *Clinical and Diagnostic Lab. Immunology* 2001; Vol. 8, No.4: 772-775.

33. Slih- Alj Debbarih Hanane, S. Zygmunt Michel, Dubray Gérard and Cloeckert Axel. Competitive enzyme- linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies to the *Brucella melitensis* BP26 protein to evaluate antibody responses in infected and *B. melitensis* Rev. 1 vaccinated sheep. *Veterinary Microbiology*, 1996. Vol. 53: 325-337.
34. Yagupsky Pablo, Jo Baron Ellen. Laboratory Exposures to Brucellae and Implications for Bioterrorism. *Emerging Infectious Diseases*. 2005; Vol. 11, No. 8: 1180-1185.
35. Noviello Stephanie, Gallo Richard, Kelly Molly, Limberger Ronald J. Laboratory-acquired Brucellosis. *Emerg. Infec. Disea.* 2004; Vol. 10, No. 10: 1848-1850.
36. Fiori Pier Luigi, Mastrandrea Scilla, Rappelli Paola and Cappuccinelli Piero. *Brucella abortus* Infection Acquired in Microbiology Laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000; Vol. 38, No. 5: 2005-2006.
37. Pappas G., Panagopoulou P., Christou L., and Akritidis N. *Brucella* as a biological weapon. *Cellular and molecular Life Sciences* 2006. 63: 2229-2236.
38. A. Minas. Control and eradication of brucellosis in small ruminants. *Small Ruminant Research*. 2005.
39. Arnon Ruth and Ben-Yedidia Tamar. Old and new vaccine approaches. *International Immunopharmacology* 2003; Vol.3: 1195-1204.
40. Blasco J. M. Existing and future vaccines against brucellosis in small ruminants. *Small Ruminant Research* 2006; 1-5.
41. G. Schurig Gerhardt, Sriranganathan Nammalwar, J. Corbel Michael. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Veterinary Microbiology* 2002. Vol. 90: 479-496.
42. Brucellosis 2005 International Research Conference. October 15-19, 2005. Mérida, Yucatán México. Universidad Autónoma de Yucatán.

43. Demotz Stéphane, Moulon Corinne, Roggero Mario A., Fasel Nicolas, Masina Slavica. Native-like, long synthetic peptides as components of sub-unit vaccines: practical and theoretical considerations for their use in humans. *Molecular Immunology* 2001. Vol 38: 415-422.
44. Aucouturier J., Dupuis L. and Ganne. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine* 2001; Vol.19: 2666-2672.
45. Olive Colleen, Batzloff Michael, Horváth Aniko, Clair Timothy, Yarwood Penny, Toth Istvan, and Good Michael F. Potential of Lipid Core Peptide Technology as a Novel Self-Adjuvanting Vaccine Delivery System for Multiple Different Synthetic Peptide Immunogens. *Infection and Immunity* 2003. Vol. 71, No. 5: 2373-2383.
46. Ding Xuan Z., Bhattacharjee Apurba, Nikolich Mikeljon P., Paulsen Ian T., Myers Gary, Seshadri Rekha and Hoover David L. Cloning, expression, and purification of *Brucella suis* outer membrane proteins. *Protein Expression and Purification* 2005; 40: 134-141.
47. Yang Xinghong, Hudson Mary, Walters Nancy, F. Bargatze Robert, and W. Pascual David. Selection of Protective Epitopes for *Brucella melitensis* by DNA Vaccination. *Infection and Immunity*, 2005; Vol. 73, No. 11: 7297-7303.
48. Shirley M. Halling. Paradigm shifts in vaccine development: lessons learned about antigenicity, pathogenicity and virulence of Brucellae. *Veterinary Microbiology* 2002. Vol. 90: 545-552.
49. Martínez Gómez D. Desarrollo y estandarización de un inmunoensayo enzimático indirecto como método de diagnóstico para la brucelosis caprina utilizando proteínas de la membrana externa de *Brucella melitensis*. Tesis de licenciatura. México D.F.: UNAM 1998.

50. Bradford M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annal Biochem* 1976; 1: 248-254.)
51. Verdugo Rodríguez A. Respuesta inmune humoral específica contra preparaciones de proteínas de la membrana externa de *Salmonella typhi*. Tesis Doctorado (Doctorado en Biotecnología)-UNAM. México 1993.
52. Towbin H, Staehlin T, Gordon J. Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocelulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl Acad. Sci.* 1979; vol. 76: 4350-4354.
53. Verdugo Rodríguez A. and Calva E. Denaturing Treatment of *Salmonella typhi* Outer Membrane Preparations for Improved Immunodiagnosis of Typhoid Fever. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 1993. Vol 1, No. 1: 113-116.
54. Verdugo Rodríguez A., López Vidal Y., Puente J. L., Ruíz Palacios G. M., Calva E. Early Diagnosis of Typhoid Fever an Enzyme Immunoassay Using *Salmonella typhi* Outer Membrane Protein Preparations. *Eur. J Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1993. Vol 12, No. 4: 248-254.
55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
56. Cassataro Juliana, A. Pasquevich Karina, M. Estein Silvia, A. Laplagne Diego, A. Velikovsky Carlos, de la Barrera Silvia, Bowden Raúl, A. Fossati Carlos, H. Giambartolomei Gillermo, and A. Goldbaum Fernando. 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* 2007: 1-10.

57. Cassataro Juliana, M. Estein Silvia, A. Pasquevich Karina, A. Velikovsky Carlos, de la Barrera Silvia, Bowden Raúl, A. Fossati Carlos, and H. Giambartolomei Guillermo. Vaccination with the Recombinant *Brucella* Outer Membrane Protein 31 or a Derived 27- Amino-Acid Synthetic Peptide Elicits a CD4+ T Helper 1 Response That Protects against *Brucella melitensis* Infection. *Infection and Immunity* 2005. Vol. 73, No. 12: 8079-8088.
58. L.Chirhart-Gilleland Rebecca, E. Kovach Michael, H. Elzer Philip, R.jennings Stephen, and Roop II R. Martin. Identification and Characterization of a 14- Kilodalton *Brucella abortus* Protein Reactive with Antibodies from Naturally and Experimentally Infected BALB/c Mice. *Infección and Immunity* 1998. Vol.66, No. 8: 4000-4003.