



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**

**PROTECCIÓN CONFERIDA POR LA MUTANTE Δ ery-CD DE *Brucella*
melitensis REV 1 EN CABRAS GESTANTES, FRENTE AL DESAFÍO
EXPERIMENTAL**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
MVZ TOMÁS EMMANUEL CASTILLO LUCERO**

**TUTOR PRINCIPAL:
M. EN C. ENRIQUE HERRERA LÓPEZ
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE SALUD ANIMAL**

**COMITÉ TUTORAL:
DR. EFRÉN DÍAZ APARICIO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DRA. BEATRIZ ARELLANO REYNOSO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

MÉXICO, D.F., ABRIL 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIA

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

A Dios

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de realizar parte de mi formación académica y personal.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada para la realización de mi Maestría y mi estancia en la Universidad de Texas A&M

A mi tutor principal MC Enrique Herrera López y comité tutorial, Dra. Beatriz Arellano Reynoso y Dr. Efrén Díaz Aparicio. Gracias por darme la oportunidad y confianza de trabajar con ustedes.

A los miembros del jurado, Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo, Dra. Edda Lydia Sciutto Conde, MC Enrique Herrera López, Dr. Andrés Ducoing Watty y Rosa Elena Miranda Miranda Morales, por sus sugerencias y comentarios a este trabajo.

A MC Luis Gomez Nuñez, investigador del CENID- Microbiología INIFAP, Laboratorio de Virología, No. de Registro: 666, por el apoyo técnico a este trabajo y su amistad.

Al Dr. Arturo Trejo profesor de la FES Cuautitlán UNAM

A mis compañeros del Laboratorio de Bacteriología del CENID Microbiología

APOYO FINANCIERO

El presente trabajo fue financiado por el proyecto “Equipamiento y operación de laboratorios de referencia y auxiliares para el diagnóstico y desarrollo de medidas de prevención para enfermedades de los caprinos” del Componente de Innovación y Transferencia en materia pecuaria 2012, INIFAP.

Y por el proyecto: “Comportamiento *in vitro* e *in vivo* de dos cepas mutantes de *Brucella melitensis*, como inmunógenos en el modelo caprino”. PAPIIT No. IT222511:

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ÍNDICE DE CUADROS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 <i>Brucella</i> y brucelosis	5
1.2 Etiología	7
2. Factores de virulencia	7
2.1 Lipopolisacárido	8
2.2 Glucano Cíclico B-1,2	9
2.3 Sistema de dos componentes <i>bvrRS</i>	10
2.4 Sistema de secreción tipo IV (SST) IV	11
2.5 Sistema regulatorio “Quorum Sensing”	12
3. Respuesta inmune	13
3.1 Sistema del complemento	14
3.2 Receptores tipo Toll	14
3.3 Inmunidad adaptativa	15
3.4 Linfocitos B	16
3.5 Citocinas	16
4. Rev 1 de <i>Brucella melitensis</i>	18
5. Eritritol	19
6. JUSTIFICACIÓN	23
7. OBJETIVO GENERAL	23
7. 1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
8. HIPÓTESIS	23
9. MATERIALES Y MÉTODOS	24
9.1 Sincronización de las cabras y diagnóstico de gestación	24
9.2 Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo	24
9.3 Inmunización	25

9.4 Toma de muestras para extracción de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	25
9.5 Toma de muestra para serología	26
9.5.1 Prueba de tarjeta al 3%	27
9.5.2 Prueba de Inmunodifusión Radial (IDR)	27
9.6 Desafío experimental con la cepa 16 M de <i>B. melitensis</i>	27
9.7 Sacrificio de los animales	28
9.8 Aislamiento bacteriológico	28
9.9 Identificación de la cepa vacunal Rev 1 y la cepa 16 M	28
9.10 Extracción de ADN de la cepa mutante $\Delta eryCD$	29
9.11 Extracción de ARN	29
9.12 Inactivación de DNasa	30
9.13 Cuantificación de ARN	30
9.14 Síntesis de ADNc	30
9.15 Diseño de oligos para la evaluación de la respuesta inmune celular	30
9.16 Estandarización de citocinas por gradiente de temperatura mediante PCR punto final	31
9.17 Cuantificación de citocinas por qPCR	32
9.18 Método de Cuantificación	34
9.19 Análisis Estadístico	34
10. RESULTADOS	35
10.1 Diagnóstico de gestación	35
10.2 Resultados de la prueba de tarjeta al 3% post vacunación	36
10.3. Resultados de la prueba de IDR post-vacunación	37
10.4 Protección ante el desafío	39
10.5 Aislamiento bacteriológico y susceptibilidad a antibióticos del grupo de cabras vacunados con Rev1 y grupo control (SSF)	40
10.6 Identificación de la cepa mutante $\Delta eryCD$ mediante PCR punto final	42
10.7 Secuencias de los oligos sintetizados de cada citocina	43

10.8 Gradientes de temperaturas de alineamiento de cada una de las citocinas enPCR punto final	44
10.9 Resultados de la estandarización en PCR tiempo real (qPCR) de las citocinas	50
10.10 Respuesta inmune celular	51
11. DISCUSIÓN	55
12. CONCLUSIÓN	63
13. ANEXO	64
14. BIBLIOGRAFÍA	67

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue conocer el comportamiento de la cepa mutante $\Delta ery-CD$ de *Brucella melitensis* Rev 1 en el modelo caprino, con el fin de evaluar su posible uso como inmunógeno en cabras. En este proyecto se trabajó con tres grupos constituidos por 8 cabras criollas de uno a dos años de edad; el primer grupo fue vacunado con la cepa mutante $\Delta eryCD$ a una dosis de 1×10^6 UFC/mL, el segundo grupo fue vacunado con la cepa vacunal Rev 1 a una dosis de 1×10^6 UFC/mL y el tercer grupo se le inyectó 1 mL solución salina fisiológica estéril, posterior a la vacunación se colectaron muestras de sangre completa para la obtención de células mononucleares (PBMC), también se colectó suero para realizar las pruebas de tarjeta e Inmunodifusión Radial. A los 110 días de gestación se realizó el desafío con la cepa 16 M de *B. melitensis* a una dosis de 4×10^5 UFC/mL, posteriormente al parto o al aborto las cabras se sacrificaron humanitariamente para realizar el aislamiento bacteriológico de distintos linfonodos, bazo y órganos reproductivos; de los fetos y de los cabritos se obtuvo contenido abomasal, bazo e hígado, todos los órganos y tejidos fueron inoculados en Agar Farrell incubando a 37 °C durante diez días. Del grupo $\Delta eryCD$ se obtuvo el aislamiento de la cepa mutante $\Delta eryCD$ a partir de una cabra, para el grupo de Rev 1 de una cabra se aisló 16 M y de otra cabra se aisló la cepa Rev 1. Del grupo control se obtuvieron aislamientos de la cepa de desafío en seis cabras. A diferentes tiempos post-vacunación se evaluó la respuesta inmune celular mediante la expresión del ARN mensajero obtenido de las PBMC, fueron cuantificadas en PCR tiempo real (qPCR), Interleucina 12 (IL12), Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α), Interferón- γ (INF- γ), Interleucina 4 (IL4) e Interleucina 10 (IL10). Del día cinco al once hubo una notable expresión de IL12 y TNF- α , para INF- γ a partir del día cinco la inducción de esta citocina tuvo una expresión elevada mostrándose constante hasta el día 11, en el día 13 su expresión empezó a descender, por lo tanto, entre los grupos $\Delta eryCD$ y Rev1 no presentaron diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$). Para el caso del grupo $\Delta eryCD$ y Rev 1, IL4 solo expresó en el día 7 y para IL10 solo hubo expresión en el grupo $\Delta eryCD$ en el día 11. Se concluye que la cepa mutante $\Delta eryCD$, es un candidato idóneo para ser una vacuna en cabras.

Palabras clave: $\Delta ery-CD$, *B. melitensis* Rev 1, caprinos, células mononucleares, ARN mensajero, qPCR, interleucina.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the behavior of the mutant strain $\Delta eryCD$ of *Brucella melitensis* Rev 1 in the goat model in order to evaluate their possible use as an immunogenic in goats. We worked with three groups consisting of eight native goats from one to two years old; The first group was vaccinated with the mutant strain $\Delta eryCD$ at a dose of 1×10^6 CFU/mL, the second group was vaccinated with the strain Rev 1 at a dose of 1×10^6 UFC/mL and the third group was injected with 1 ml of sterile physiological saline. After vaccination whole blood samples were collected to obtain Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC), serum was also collected for testing card and Radial Immunodifusion. At 110 days of pregnancy the challenge was performed with strain *B. melitensis* 16M at a dose of 4×10^5 CFU/mL. At parturition or abortion, the goats were humanely slaughtered for bacteriological isolation of different lymph nodes, spleen and reproductive organs. Abomasal contents, spleen and liver were obtained from fetuses and kids. All organs and tissues were inoculated in Farrell Agar incubated at 37°C for ten days. $\Delta eryCD$ group one isolation of mutant strain $\Delta eryCD$ was obtained from a goat, from the group Rev 1 the strain 16 M was isolated and another goat strain Rev 1. From the control group was isolated the strain 16 M in six goats. Cellular immune response was measured using the expression of the messenger RNA derived from PBMC post-vaccination in which interleukin 12 (IL12), Tumoral- Necrosis Factor alpha (TNF- α), Interferon-gamma (INF- γ), interleukin 4 (IL4) and interleukin 10 (IL10) were studied and quantified in real-time PCR (qPCR), hence the day 5 to 11 for there was a marked expression of IL12 and TNF- α for IFN- γ from day five induction of this cytokine had high expression showing constant until day 11, day 13 expression began to descend, statistically proved to be not significant ($P > 0.05$.) between the $\Delta eryCD$ and Rev1 groups..In the case of IL4 only expressed at day 7 for both groups $\Delta eryCD$ y Rev 1 and for IL10 expression was only in the $\Delta eryCD$ group on day 11. According to the data obtained it is concluded that the mutant strain $\Delta eryCD$, is an ideal to be a candidate vaccine in goats.

Key words: $\Delta eryCD$, *Brucella melitensis* Rev 1, immunogenic, PBMC, qPCR,

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Diseño Experimental	25
CUADRO 2. Programas utilizados para la qPCR	32
CUADRO 3. Condiciones de la qPCR	34
CUADRO 4. Diagnóstico de gestación de los tres grupos	35
CUADRO 5. Protección conferida hacia el aborto entre los dos grupos vacunados y el grupo control	39
CUADRO 6. Aislamiento bacteriológico en los diferentes grupos experimentales	42
CUADRO 7. Oligos utilizados para la evaluación de la respuesta inmune en los grupos inmunizados	44

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Respuesta serológica de cabras vacunadas con $\Delta eryCD$, Rev 1 y el grupo control	36
FIGURA 2. Número de animales positivos empleando la prueba de Tarjeta al 3% post vacunación	37
FIGURA 3. Resultados de diferenciación entre vacunados e infectados de las cabras vacunadas con $\Delta eryCD$, Rev 1 y el grupo control	38
FIGURA 4. Número de animales positivos empleando la prueba de IDR post vacunación entre los grupos vacunados	38
FIGURA 5. Gel de agarosa al 1% mostrando los productos de amplificación por PCR para identificación de <i>B. melitensis</i> y de la cepa mutante $\Delta eryCD$	43
FIGURA 6. Gradiente de temperatura de alineamiento para el gen GAPDH	45
FIGURA 7. Gradiente de temperatura de alineamiento para el gen TNF- α	46
FIGURA 8. Gradiente de temperatura de alineamiento para el gen IL12	47
FIGURA 9. Gradiente de temperatura de alineamiento para el gen IL4	48
FIGURA 10. Gradiente de temperatura de alineamiento para el gen IFN- γ	49
FIGURA 11. Gradiente de temperatura de alineamiento para el gen IL10	50
FIGURA 12. Gel de agarosa al 2.5 % mostrando los productos de amplificación por qPCR	51
FIGURA 13. Expresión de TNF- α por qPCR a partir de PBMC	53
FIGURA 14. Expresión de IFN- γ por qPCR a partir de PBMC	54
FIGURA 15. Expresión de IL12 por qPCR a partir de PBMC	54
FIGURA 16. Expresión de IL4 por qPCR a partir de PBMC	55

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Brucella* y brucelosis

La brucelosis es una enfermedad infecto-contagiosa de origen bacteriano que afecta al humano, así como a diferentes especies de animales domésticos y silvestres. Esta enfermedad es de distribución mundial y se considera como endémica en la República Mexicana, su impacto se ve reflejado en las grandes pérdidas económicas en el sector agropecuario (Hernández-Castro et al., 2007).

Los estudios moleculares del género *Brucella* han revelado la existencia de una estrecha relación entre las cepas aisladas, las cuales pertenecen a un único género. En la actualidad se ha clasificado al género *Brucella* en diez especies (Turse et al., 2011) que se agrupan por la naturaleza del LPS en especies de fenotipo liso y rugoso y por su hospedero preferente, aunque la mayoría de las especies pueden afectar a más de una especie animal. Las especies de fenotipo liso tienen el LPS completo y son: *B. abortus* que afecta principalmente a bovinos, *B. suis* a cerdos, *B. melitensis* a caprinos, *B. neotomae* a la rata del desierto, *B. pinnipedialis* a pinnípedos (lobos marinos, osos marinos, focas, elefantes marinos y morsas), *B. ceti* a cetáceos (ballenas, delfines y orcas), *B. microti* al ratón de montaña y *B. inopinata* que fue aislada de una infección de un implante mamario. Mientras que las especies de fenotipo rugoso en su LPS carecen de cadena O; únicamente son *B. ovis* que afecta a ovinos y *B. canis* a perros.

Clínicamente, los síntomas en humanos incluyen fiebre, anorexia, poliartritis, meningitis, neumonía, endocarditis y otras manifestaciones clínicas; la infección en humanos es debido a la ingestión o consumo de alimentos no pasteurizados como leche, quesos y otros productos lácteos. Esta enfermedad es considerada una zoonosis de tipo ocupacional para Médicos Veterinarios, personal de laboratorio y personas que están en relación con animales

infectados; las secreciones uterinas o fetos abortados son también una fuente de infección (Carvalho-Neta et al., 2010; Franco et al., 2007).

En cabras, la brucelosis causa aborto especialmente en el último tercio de la gestación, que frecuentemente es seguido de partos normales, en los cuales se eliminan grandes cantidades de brucelas. En el macho muy rara vez se presenta orquitis o epididimitis. Las secreciones presentes durante el parto o el aborto de los animales infectados, contaminan alimento y agua, entrando a los animales susceptibles por vía oral o mediante aerosoles por la vía conjuntival. También se presenta la transmisión vertical a las crías, durante el parto o la lactancia (Adams, 2002; Carvalho-Neta et al., 2010).

La vacunación es uno de las herramientas importantes en la prevención de la brucelosis animal y ha impulsado una intensa investigación en el área. Sin embargo, a la fecha muy pocas vacunas han trascendido con este objetivo. Entre ellas se encuentran la cepas S19 y RB51 de *B. abortus* y Rev 1 de *B. melitensis*, para ser usadas en bovinos y pequeños rumiantes (caprinos y ovinos) respectivamente (Alton et al., 1972; Mancera-Martínez et al., 1992; Stevens et al., 1997).

La eficacia de una vacunación contra la brucelosis requiere de desencadenar principalmente una eficiente inmunidad celular. Además, es importante que el inmunógeno sea una cepa viva atenuada, para que de esta forma se recreen las condiciones necesarias para que se presente una respuesta inmune celular efectiva.

1.2 Etiología

Los microorganismos del género *Brucella*, son coco-bacilos Gram negativos, intracelulares facultativos, no móviles y no forman esporas, crecen lentamente en los medios básicos; su crecimiento se puede mejorar mediante la adición de sangre o suero. Estos microorganismos tienen poca acción fermentativa sobre los carbohidratos en medios convencionales. Oxidan ciertos aminoácidos, así como intermediarios del ciclo de la urea. Son catalasa positivos y usualmente oxidasa positivos, reducen nitratos e hidrolizan la urea en diferentes grados. Además, no producen hemólisis y no utilizan el citrato como única fuente de carbono. A diferencia de muchas otras bacterias, su genoma está constituido por dos cromosomas circulares y carecen de plásmidos (Castro et al. 2005).

2. Factores de Virulencia

La característica principal del género *Brucella* spp. es la habilidad de sobrevivir dentro de las células fagocíticas y no fagocíticas; sin embargo, esta habilidad representa una gran variedad de factores, que hasta el momento no se ha demostrado que factor sea el responsable de la virulencia del género *Brucella* spp.

El destino preferido de *Brucella* spp. es la formación de un nicho intracelular donde puede sobrevivir, multiplicarse y expandirse a nuevas células. Por lo tanto, los verdaderos factores de virulencia de *Brucella* spp. son aquellos que le permiten invadir, resistir la muerte intracelular y alcanzar su nicho replicativo. En contraste con otros patógenos, en *Brucella* spp. no se han descrito factores de virulencia clásicos, como exotoxinas, citolisinas, cápsulas, fimbrias y plásmidos de virulencia (Detilleux et al., 1992).

2.1 Lipopolisacárido (LPS)

El LPS de bacterias intracelulares pertenecientes a la familia *Proteobacteria* como *Brucella* spp., posee propiedades y estructuras distintas al LPS de las enterobacterias. El LPS de las bacterias Gram negativas está compuesto del lípido A, el centro oligosacárido (núcleo o core) y la cadena O-polisacárido (cadena O). La mayoría de las especies de *Brucella* poseen LPS liso (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. pininipedia*, *B. microti* y *B. inopinata*), por otro lado *B. ovis* y *B. canis*, presentan LPS rugoso de forma natural, donde la cadena O se encuentra afectada por mutaciones naturales. *Brucella* posee un LPS liso peculiar llamado no-clásico, debido a que el lípido A posee un eje compuesto de diaminoglucosa, la mayoría de las enterobacterias tienen un eje compuesto de glucosamina, además de poseer los grupos acil largos, (C18-C19, C28) en lugar de C12 y C14, y están unidos al centro por enlaces amida en lugar de enlaces ester y amida que poseen el LPS de enterobacterias (Moreno et al., 1981; Moreno et al., 1984)

El lípido A es un glicolípido que contiene glucosamina y diaminoglucosa. En sus grupos amino e hidroxilo presenta sustituciones por ácidos grasos de longitud variada en su cadena. El núcleo contiene glucosa, manosa y ácido 3, deoxi-D-mano-2-octulosónico (KDO) y no contiene ni heptosas ni fosfatos. La quinovosamina está presente en el núcleo del LPS-S pero no el LPS-R (Moriyon & Lopez-Goñi, 2000).

La cadena O del LPS es el antígeno (Ag) inmunodominante de superficie, capaz de inducir una respuesta serológica en la mayoría de los animales en contacto con especies lisas de *Brucella* (Plommet, 1987). Las colonias lisas adoptan morfologías translúcidas y homogéneas, mientras que las rugosas opacas y granulares determinadas por el antígeno O del LPS de la pared celular.

Las especies de *Brucella* pueden caracterizarse en mayor medida por la proporción relativa de epítomos antigénicos, conocidos como antígeno A para *B. abortus* y antígeno M para *B. melitensis*, que residen en la cadena polisacáridica O del LPS liso (Murray et al., 2009).

Las proteínas de membrana externa (PME) se asocian estrechamente con el LPS. Dentro de éstas se encuentran las denominadas proteínas mayores, que se clasifican en tres grupos de acuerdo a sus pesos moleculares: grupo 1 (89-94 kDa), grupo 2 (36-38 kDa) y grupo 3 (25-27 y 31-34 kDa) y se encuentran expuestas en la membrana externa, pero son menos accesibles en las cepas lisas que en las rugosas, debido al impedimento estérico ocasionado por las cadenas O del LPS (Cloeckert et al. 2002; Salhi et al., 2003).

2.2. Glucano Cíclico β -1,2

Brucella spp. es una bacteria que ha desarrollado estrategias para persistir por tiempos prolongados en células hospedadoras, evitando la respuesta inmune innata. Se ha comprobado que *Brucella* spp. sintetiza glucano cíclico β -1,2, implicado en la evasión de la respuesta inmune. El glucano cíclico β -1,2 actúa sobre balsas lipídicas, encontrándose sobre la membrana celular del hospedador. En el caso de *Brucella* spp. el gen que codifica para este glucano es llamado *cgs*, cuyas mutaciones en este gen no evitan la fusión fagosoma lisosoma y no pueden replicarse. Ensayos a partir de purificados de glucano cíclico β -1,2, las mutantes fueron capaces de controlar la maduración de la vacuola evadiendo la fusión fagosoma-lisosoma, permitiendo que *Brucella* spp. establezca su nicho replicativo en el retículo endoplasmático (RE). Teniendo en cuenta estos resultados con respecto a la capacidad de *Brucella*- glucano cíclico β -1,2 para modular la organización de las balsas lipídicas, están involucrados en actividades de la biogénesis fagolisosoma tales como la acumulación de actina, polimerización y la fusión endosoma fagosoma. Por lo anterior, se llegó a la conclusión de que el glucano cíclico β -1,2 es un factor de virulencia que

interactúa sobre las balsas lipídicas y contribuye a la supervivencia de este patógeno (Arellano-Reynoso et al., 2005).

Este componente periplásmico es producido por proteobacterias de la subdivisión α -2, donde se ha descrito que esta molécula está involucrada en la osmoregulación o bien como supresor de la respuesta de defensa de plantas a bacterias endosimbióticas, como *Bradyrhizobium japonicum*. Esto ha sugerido que la estructura de la molécula del β - glucano cíclico es importante para una interacción simbiótica y que esto a la vez tiene una función específica, además de su papel en la adaptación hipo-osmótica (Bhagwat & Mithofer, 1999).

Las balsas lipídicas, están enriquecidas por esfingolípidos y colesterol, en la que secuestran ciertas proteínas y excluyen otras sustancias. Las balsas lipídicas han sido implicadas en numerosos procesos celulares, incluyendo la transducción de señales, el tráfico intracelular y la clasificación molecular. Por lo que se ha demostrado que las balsas lipídicas están presentes en los fagosomas. Las balsas lipídicas, están provistas de la mayor proteína fagosomal que es la Proteína de la membrana lisosomal-1 asociada (LAMP1), enriquecida por flotilin-1 presente en los fagosomas, que se origina en la membrana plasmática durante la fagocitosis, y se acumula gradualmente durante la maduración de los fagosomas (Dermine et al., 2001).

2.3 Sistema de dos componentes *bvrRS*

El operón *bvrRS* de *Brucella* spp. codifica un sistema de regulación de dos componentes que controla la expresión de genes involucrados en el mantenimiento de la integridad de la envoltura celular. Estos genes codifican para múltiples miembros de la familia de proteínas Omp3, así como productos de genes que modifican la composición de ácidos grasos de la molécula del lípido A del LPS. Mutantes en *bvrS* y *bvrR* han mostrado un incremento en la sensibilidad a péptidos catiónicos antimicrobianos en ensayos *in vitro*,

comparados con la cepa parental. Así mismo, son menos resistentes a la muerte intracelular en macrófagos y células epiteliales y son atenuadas en ratones infectados experimentalmente (Ko & Splitter, 2003).

El gen *brvS* codifica para una proteína sensora con posible actividad de histidina kinasa y el gen *brvR*, para una proteína regulatoria de la activación o inhibición de la transcripción. Las mutantes *brvS/brvR* en *B. abortus* tienen afectada su capacidad invasiva en células HeLa. El análisis comparativo de la secuencia primaria de aminoácidos del sistema *brvS/brvR* de *B. abortus* determinó una gran similitud al sistema *ChvI/ChvG* de *A. tumefaciens* involucrado en la virulencia, y al sistema *exoS* de *S. meliloti* que participa en la producción del exopolisacárido el cual es importante para una simbiosis efectiva. Una menor similitud fue observada con el sistema de dos componentes *PhoP/PhoQ* de *Salmonella*. Recientemente se ha descrito que el sistema de *brvR / brvS* de *B. abortus* controla la expresión de una proteína de membrana externa denominada OMP25. Experimentos preliminares de disrupción del gen *omp25*, indican una reducción de la virulencia en todas las especies de *Brucella*.

2.4 Sistema de secreción tipo IV (SST IV)

En el género *Brucella* se ha identificado el operón de la región *virB*, que está formado por 12 genes los cuales están relacionados con el tránsito intracelular de patógenos como el caso de los genes *Dot/Icm* de *Legionella pneumophila*. La acidificación del pH dentro del fagosoma es un estímulo requerido para la expresión de *virB* dentro de las células del hospedero. Este sistema es esencial para la sobrevivencia y multiplicación intracelular de *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis*. Por lo tanto se ha encontrado en el genoma de *B. abortus* dos marcos de lectura abiertos con alta homología a genes del sistema *virB* de *A. tumefaciens* y *Ptl* de *B. pertussis*. La estructura del operón *virB* de *B. abortus* se ha observado que este sistema de secreción cumple un rol fundamental en la virulencia y la replicación intracelular de la bacteria en

fagocitos no profesionales. Los genes *virB* de *Brucella* spp. son esenciales para la evasión de los lisosomas y el establecimiento del nicho replicativo de la bacteria durante la infección de células HeLa (Palomares-Resendiz, 2010)

La expresión del operón *virB* de *B. melitensis* es regulada por un quórum sensing (QS) (*VjbR*), que posee un efecto inhibitorio de N-doecanol-DL- lactano hemoserina (C₁₂-HSL) sobre la expresión *PvirB* y la replicación intracelular de *Brucella* spp. (Seleem et al., 2008).

2.5 Sistema regulatorio “Quórum Sensing”

Este sistema está basado en la señalización de moléculas que pueden transmitir mensajes entre una bacteria y su correspondiente regulador. Es un mecanismo esencial para que la bacteria realice cambios en respuesta al ambiente y también para su virulencia. Las especies de *Brucella* spp. sintetizan N-Acil-L-Homoserina-C12 Lactonas señal de quórum sensing, y además cinco reguladores transcripcionales LuxR-like, pero solo dos se han investigado (*vjbR* y *BlxR*). El regulador transcripción LuxR-like (*vbjR*) controla más de 100 genes incluyendo proteínas de membrana externa, operón *virB*, glucano cíclico B-1-2 sintetasa Cgs y genes que codifican con flagelos como *fliF*. La mutante de *vjbR* (Weeks, 2010) es atenuada en macrófagos, células HeLa y el modelo de infección en ratones. Por otra parte se han identificado en *B. melitensis* 16 M, dos factores de transcripción que intervienen en el proceso “quórum sensing”: *VjbR* y *BlxR* (también llamado *BabR*) (Delrue et al., 2004; Rambow-Larsen et al., 2008), ambos forman parte de dos circuitos de regulación transcripcional independientes, implicados en la adaptación de *Brucella* spp. a diferentes ambientes durante el periodo de infección (Rambow-Larsen et al., 2008) (Uzureau et. al., 2010) (Weeks, 2010). Estos factores de transcripción también se les ha relacionado con la regulación de proteínas de membrana externa, incluyendo al sistema *BvrS-BvrR* y con la probable formación de biopelículas (Barbier et al., 2011; Uzureau et al., 2007). Se conoce que existe una interacción

entre la región del promotor del operón *VirB* y *VjbR*, el regulador de utilización de histidina (*HufC*), el factor de integración del hospedador (IHF), *BvrR*, *BabR* y el gen *bacA*, que esta interacción se establece bajo condiciones de estrés ocasionado por cambios en el pH o por la baja disponibilidad de nutrientes (Lacerda et al., 2013).

3. Respuesta Inmune

El ingreso de *Brucella* spp. en el organismo induce la activación de los mecanismos de defensa que se inician con la participación de algunos componentes de la inmunidad innata, como el sistema del complemento. La activación del complemento por la vía clásica y alterna, juega un rol muy importante en la resistencia contra bacterias Gram negativas. Existe controversia en cuanto a la capacidad que posee el LPS de las especies lisas de *Brucella* de activar la vía alterna del complemento, sin embargo, la activación de la vía clásica puede iniciarse con la presencia de bajas concentraciones de IgM e IgG anti-LPS, lográndose de esta forma la lisis bacteriana. Los neutrófilos son las primeras células de defensas del hospedero que se ponen en contacto con *Brucella* spp. La opsonización de las bacterias por anticuerpos y el sistema del complemento facilita su fagocitosis (Castro et al., 2005).

Otras células que reaccionan ante la presencia de *Brucella* spp. son los macrófagos. El ingreso de la bacteria a los mismos se produce a través de la molécula CD14 y del LPS. Esta interacción induce también la producción de IL-12 que estimula a las células NK y a los linfocitos T colaboradores o *helper* (LTH) CD4+, que secretan IFN- γ , favoreciendo el desarrollo de una respuesta inmune predominante mediada por LTH1. Este subgrupo de linfocitos T estimula fundamentalmente la respuesta de tipo celular y participa en forma directa en la protección contra microorganismos intracelulares, ampliando el patrón de citocinas que incluye IL2, TNF- α y sobre todo IFN- γ , esencial para la activación de los macrófagos (Castro et al., 2005).

3.1 Sistema del Complemento

El complemento es un sistema de proteínas plasmáticas que interactúan con los anticuerpos o con las superficies bacterianas para opsonizar o directamente eliminar a los patógenos mediante la formación de un complejo de ataque de membrana. Actualmente, son tres vías de mecanismo de activación del complemento las cuales son: (i) la vía clásica, mediada por complejos antígeno anticuerpo, (ii) la vía alternativa, y (iii) la vía de la lectina, que se activa por la unión de la lectina-manosa a carbohidratos en las superficies microbianas. La interacción entre *Brucella* spp y el complemento son mediadas por el componente del LPS. La acción de la vía clásica mediada por IgM y por la baja concentración de IgG ha sido considerada a ser la acción bactericida dominante del suero en contra de *Brucella* spp. en la etapa temprana de la infección (Ko & Splitter, 2003).

3.2 Receptores tipo Toll

Los receptores tipo Toll (TLR) reconocen a *Brucella* spp. y a sus componentes bacterianos, en la que los fagocitos mononucleares inician una respuesta inmune que influyen tanto en la inmunidad innata como adaptativa.

Estudios han revelado las cascadas de señalización intracelulares que participan en el inicio de la respuesta inmune mediada por TLR en la infección por *Brucella* spp. Los receptores TLR2, TLR4 y TLR9 están implicados en las interacciones del hospedero con *Brucella* spp. Las vías de señalizaciones dependientes de MyD88 e independientes de TRIF participan en la activación de la respuesta innata por parte de *Brucella* spp. Sin embargo se ha demostrado el rol crítico de la molécula MyD88 la cual activa NF- κ B, induciendo la producción de citocinas inflamatorias como IL1, IL8, TNF- α e IL12 así como en la maduración de las células dendríticas y la producción de IL-12 durante la infección por *Brucella* spp. (García-Samartino, 2010).

3.3 Inmunidad Adaptativa

Las funciones del sistema adaptativo pueden estar clasificadas dentro de tres mecanismos: el primero, IFN- γ producido por CD4⁺ y CD8⁺, células T $\gamma\delta$ que activan su función bactericida en macrófagos para impedir la sobrevivencia intracelular de *Brucella* spp. Segundo, citotoxicidad de CD8⁺ y células T $\gamma\delta$. Tercero, isotipos de anticuerpos de tipo Th1, tales como IgG2a e IgG3 que opsonizan al patógeno para facilitar la fagocitosis (Ko & Splitter, 2003).

La función de las células T $\alpha\beta$ en la protección contra brucelosis, es la inducción de IFN- γ que es capaz de interferir con el desarrollo de una respuesta protectora de tipo Th1 (Martirosyan et al., 2011). Las CD desempeñan un papel clave, en el inicio de la infección y en la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, *Brucella* spp. ha desarrollado componentes que interfieren en la respuesta innata con el fin de evadir la respuesta inmune del hospedero. Por lo que se ha descubierto que este patógeno prolifere dentro de las CD, tanto *in vitro* como *in vivo* esto conduce a la inhibición de la maduración funcional, caracterizada por la ausencia de secreción de citocinas proinflamatorias tales como TNF- α e IL12, bajo este panorama la presentación del antígeno a las células T por parte de esta célula es ineficaz (Martirosyan & Gorvel, 2013). Después de la activación de los macrófagos, las células T inmaduras (Th0) se diferencian en células efectoras y de memoria, que están programadas para secretar distintos patrones de citocinas (Golding et al., 2001).

3.4 Linfocitos B

Las células B son estimuladas directamente por las células T a través de la integración de moléculas coestimuladoras como CD40 y de su ligando CD40L presente en la célula T, lo cual, junto a las citocinas liberadas, son importantes en promover el cambio del isotipo de IgM a IgG. El rol de los anticuerpos durante la infección de *Brucella* spp se ha visto que tanto IgM como IgG, en bajas concentraciones, son capaces de promover la lisis de *Brucella* spp. a través de la vía clásica del complemento. La opsonización de *Brucella* spp. podría ser considerada como la principal acción de los anticuerpos contra *Brucella* spp (Rivers et al., 2006).

Los anticuerpos poseen un efecto positivo en la protección contra bacterias a través de su capacidad de opsonizar y su habilidad de activar el sistema del complemento para eliminar a la bacteria (Baldwin & Goenka, 2006).

3.5 Citocinas

Las citocinas son moléculas clave en el control de la brucelosis, ya que permiten dirigir una respuesta inmune celular o humoral, en este caso *Brucella* spp estimula a las células presentadoras de antígenos para que secreten IL-12, la que induce a los linfocitos T a diferenciarse en Th1 y secretar IFN- γ (Rivers et al., 2006). El rol de la IL-12 en la protección contra *Brucella* spp. es el de detectar a una infección de *Brucella* spp. (Baldwin & Goenka, 2006. Por lo tanto, IFN- γ desempeña un papel en el establecimiento de una respuesta Th1. Las células NK, producen IFN- γ , eliminan células infectadas y desempeñan un papel en el control de infecciones por organismos intracelulares (Baldwin & Goenka, 2006; Golding et al., 2001). La producción de IFN- γ activa las funciones bactericidas del macrófago, induciendo la apoptosis, aumentando la diferenciación celular y la producción de citocinas, incluyendo la producción de anticuerpos como IgG a IgG2a y aumentando la expresión de moléculas

involucradas en la presentación antigénica. *Brucella* spp es un potente inductor de IFN- γ , la activación impide que *Brucella* spp. establezca su nicho replicativo. El IFN- γ es el componente crucial de la inmunidad que permite la sobrevivencia del hospedador, y así el estado crónico de infección (Baldwin & Goenka, 2006; García-Samartino, 2010; Rivers et. al., 2006).

Otra citocina importante es la TNF- α el cual contribuye a la resistencia frente a *Brucella* spp por una vía independiente de IFN- γ , estimula la fagocitosis en el sitio de infección y participa en la activación de los macrófagos.

La interleucina 10 (IL10) producida por linfocitos CD4, macrófagos activos y algunas poblaciones de células B, inhibe la respuesta Th1, ya que disminuye la capacidad de los macrófagos para presentar antígenos e inhibe la secreción de IFN- γ , por lo tanto, aumenta la susceptibilidad a la infección por *Brucella* spp . La producción temprana de IL-10 (inmunomoduladora) durante la infección podría estar en el establecimiento exitoso de la infección (García-Samartino et al., 2010; Rivers et al., 2006). IL10 es producida por macrófagos y linfocitos B (Baldwin & Goenka, 2006).

4. Rev 1 de *Brucella melitensis*

El doctor Elberg de la Universidad de Berkely, California en Estados Unidos, desarrolló una cepa vacunal a partir de *B. melitensis* para ser usada en cabras y ovejas, a la que se denominó Rev 1 de *B. melitensis*. Se realizaron múltiples pases en medios de cultivo creando dependencia a la estreptomycinina. La cepa vacunal tiene características que permiten su identificación y la diferenciación de la cepa *wild type*, como su grado de colonización y resistencia a antibióticos.

Se ha demostrado que la cepa Rev 1 produce un alto nivel de inmunidad contra una infección experimental o natural y la inducción de anticuerpos vacunales hasta por 6 a 8 meses (Alton, 1987). Sin embargo, presenta desventajas como virulencia residual a una dosis de (10^9 células), vacunando cabras y ovejas producen abortos causando la excreción de la bacteria en fluidos vaginales y leche. Por lo tanto la cepa Rev 1 es considerada como la mejor vacuna disponible para la profilaxis de brucelosis en pequeños rumiantes. En México el programa de control de la brucelosis, usa la vacunación con la cepa Rev 1, aplicando la dosis clásica en cabritas jóvenes y la dosis reducida en cabras adultas recomendándose la vacunación de hembras vacías. Siendo hasta el momento Rev 1, la única vacuna eficaz para el ganado ovino y caprino, que induce una respuesta serológica muy semejante a la de la infección natural (Blasco, 1997; Banai, 2002).

La cepa Rev 1, mantiene características similares a las otras especies de *Brucella*, posee un fenotipo liso con antígeno M, con un crecimiento lento, con un tamaño de 1-2 mm en colonias. Rev 1 es susceptible a altas concentraciones de fucsina y tionina, es resistente a estreptomycinina a concentraciones de 2.5 µg/ml y susceptible a la penicilina G 5 U.I.

La cepa Rev 1, es virulenta para los machos de cualquier edad, por lo que por ninguna circunstancia se deben de vacunar, ya que produce orquitis e infertilidad (NOM-041-ZOO-1995). La vacunación con la cepa Rev 1 tiene la desventaja de inducir seroconversión en los animales vacunados, dichos títulos séricos tienden a persistir por más de 8 meses (Díaz-Aparicio et al., 1994; Stevens et al., 1995; Wright et al., 1997). Sin embargo, estudios realizados por Villa et al., (2008) y Díaz-Aparicio et al., (2004) demuestran que el porcentaje de abortos atribuidos a la vacunación con Rev 1 rondan el 20% de las hembras gestantes.

5. Eritritol

El metabolismo de este azúcar es un rasgo distintivo del género *Brucella*. En 1950 se demostró que el eritritol era capaz de estimular el crecimiento de todas las especies de *Brucella* en medios de cultivo. Las altas concentraciones de eritritol en placenta y útero grávido, dieron origen al paradigma que sostenía que este azúcar era el responsable del tropismo de la bacteria hacia los tejidos reproductores (Sangari & Agüero, 1996; Jain et al., 2012). En humanos y en roedores el eritritol no está presente en los tejidos reproductores. Tampoco está presente este azúcar en macrófagos, donde *Brucella* spp. se replica eficientemente. Smith & Ficht (1990), hacen referencia que el operón responsable del catabolismo del eritritol fue clonado, en el que se obtuvieron mutantes de la cepa *B. abortus* 2308 donde además se demostró que son incapaces de catabolizar el eritritol.

En rumiantes, el aborto es asociado a la placentitis proliferando *B. abortus* o *B. melitensis* de manera rápida tomando al eritritol como una fuente de carbono. La presencia de altas cargas bacterianas dentro de trofoblastos en placenta dan como resultado la diseminación e infección en feto de *B. abortus* y *B. melitensis*. Poco es conocido acerca de este proceso de infección en estas células. En rumiantes, los trofoblastos producen cantidades de eritritol en el

último tercio de gestación, por lo cual se considera que es fuente de carbono para *B. abortus* y *B. melitensis*, en su metabolismo y a su vez favoreciendo la supervivencia bacteriana; sobre la base de la vellosidades coriónicas se encuentran células eritrofagocíticas, considerándose el principal sitio de la invasión de la bacteria en tejidos fetales, haciendo su replicación a trofoblastos intercotiledonarios ocasionando su crecimiento seguido de la inflamación, necrosis de las células trofoblasticas, vasculitis y ulceración del alantocorion. En consecuencia, los intercambios metabólicos feto-materno están comprometidos al aborto (Carvalho-Neta et al., 2010; von Bargen et al., 2012; Xavier et al., 2010).

Como ya se ha descrito anteriormente por Anderson & Smith (1965); Sperry & Robertson (1975a), que el eritritol era promovido por una glucólisis para la formación de dihidroxiacetona-fosfato. Ahora se muestra por Barbier et al. (2014), que el eritritol se convierte realmente en D-eritrosa-4-fosfato a través de un conjunto hasta ahora no descrito de reacciones que implica tres isomerasas y que permite la síntesis y el crecimiento de hexosa-monofosfato por la vía de la pentosa-fosfato.

En la cepa S19 de *B. abortus*, la enzima D-eritruosa 1-fosfato deshidrogenasa, está ausente, por lo tanto, la ausencia de eritritol es debido a que, en el metabolismo el ATP es consumido al acumularse D-eritruosa 1-fosfato deshidrogenasa (Sperry & Robertson, 1975b). Los análisis genéticos de regiones cromosomales han sido estudiados en los genes que catabolizan para el eritritol realizando mutagénesis e inserciones Tn5 en el que estas mutantes permitieron clonar un fragmento cromosomal que es envuelto en el catabolismo de eritritol, el plásmido en el cual contiene el fragmento es llamado pSU6004, se conoce que puede haber más actividades enzimáticas para transformar eritritol. La ausencia de este metabolismo en la cepa vacunal no está relacionado con la atenuación de *B. abortus* S19 (Sangari et al., 1994).

Los cuatro genes del catabolismo de eritritol están organizados en un operón, (operón *ery*) dentro del fragmento cromosomal de *B. abortus* 2308, la secuencia del operón completo es de 7714 bp, y tiene cuatro marcos de lectura abierta. El primer gen (*eryA*) codifica para L-eritritol-4-P de 519 aa. El segundo gen (*eryB*) es para L-tetrolosa-4-P. El tercer gen (*eryC*) es seguido por la dehidrogenación y descarboxilación generando di-hidroxiacetona-P así como dióxido de carbono (CO₂) y sus productos finales y el cuarto gen (*eryD*) codifica para un regulador del operón *ery* en su expresión. El promotor del operón está localizado en la parte 5' a *eryA*, conteniendo un factor de integración al hospedero (IHF) y la transcripción de este promotor es represado por *eryD*, estimulado por eritritol (Sangari & Agüero, 1991; Barbier et al., 2014).

Solo se ha demostrado el análisis del posible rol del eritritol en la virulencia de *B. suis* en macrófagos y en el modelo murino así como la comprobación de las causas de atenuación de las mutante de *eryC* de *B. suis* (Burkhardt et al., 2005). Concluyendo que la inactivación de la vía de degradación de eritritol por mutación de *eryC* reduce la capacidad de *B. suis* en el medio intracelular de los macrófagos.

En diversas investigaciones realizadas en la relación *Brucella*-eritritol, han sido estudiados modelos murinos, donde existe la controversia de que estos animales no producen eritritol, así como en cultivos celulares medio mínimo de hierro (Jain et al., 2012) y ratones (Petersen et al., 2013); por lo tanto en el modelo caprino es poco estudiado. Hasta la fecha existen trabajos de investigación demostrando que vacunas mutantes como Δ *ery* de *B. abortus* 2308 es significativamente atenuado en macrófagos, pero aun sin estudiar en un modelo animal (Zhang et al., 2014).

Esto demuestra que la administración de eritritol a ratones o macrófagos no puede imitar el medio ambiente en los rumiantes durante la gestación y por lo tanto no se pueden utilizar como modelos para entender el efecto eritritol sobre *Brucella* spp.

Por tal motivo la cepa mutante *eryCD* de *B. melitensis* Rev1 se construyó cumpliendo las mismas características de *B. abortus* S19, haciendo la delección de esto dos genes C y D del operón *ery* (Rodriguez et al., 2012), obteniendo una cepa mutante con una cepa española Rev 1 de *B. melitensis*, para poder ser usada como inmunógeno. Esto con el fin de evaluar la relación de *Brucella*-eritritol en un modelo de cabras gestantes y así entender su atenuación.

6. JUSTIFICACIÓN

La Rev 1 de *B. melitensis* es una vacuna viva atenuada que es el inmunógeno oficial en México contra la brucelosis caprina. Sin embargo, tiene el inconveniente de poder causar abortos, así como virulencia residual y su excreción en leche y exudados. En este trabajo evaluamos la cepa mutante $\Delta eryCD$ de *B. melitensis* Rev 1, y se espera que su mutación en los genes (*eryCD*) del operón *ery* que están ligados con la utilización del eritritol presente en placenta y útero gravido, genere un grado de atenuación aceptable para provocar una inmunidad celular y que permita conferir protección a cabras gestantes frente al desafío experimental con la cepa de *B. melitensis* 16 M.

7. OBJETIVO GENERAL

Conocer la capacidad inmunógena de la cepa mutante $\Delta ery-CD$ de *B. melitensis* Rev 1, en estudios *in vivo* en el modelo caprino, con el fin de evaluar la inmunidad celular para su posible uso como inmunógeno en cabras.

7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la inducción de la respuesta inmune humoral y celular, estimulada por la cepa mutante $\Delta ery-CD$ de *B. melitensis* Rev 1, en el modelo caprino.
2. Evaluar la protección conferida por la cepa mutante de $\Delta ery-CD$, frente al desafío experimental con una cepa de referencia *B. melitensis* 16 M, en hembras gestantes.
- 3.

8. HIPÓTESIS

La cepa mutante $\Delta ery-CD$ de *B. melitensis* Rev1 induce en el modelo caprino una exacerbada respuesta inmune celular y humoral, suficiente para proteger contra el desafío con una cepa virulenta de *B. melitensis*.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con 24 cabras hembras de uno a dos años de edad y un macho, procedentes de un hato sin antecedentes clínicos y serológicos de brucelosis del estado de Guanajuato, México. Las hembras fueron divididas en tres grupos de ocho cada uno. Todos los animales fueron alojados en las instalaciones del CENID-Microbiología Animal INIFAP, donde se contó con corrales adecuados para pequeños rumiantes, con alimento y agua al libre acceso. El macho se alojó en un corral individual.

9.1 Sincronización de las cabras y diagnóstico de gestación

Las cabras fueron sometidas a un diagnóstico de gestación, con el fin de verificar la no preñez. La sincronización se realizó de la siguiente manera, se colocaron esponjas vaginales (The Chronogest CR compuesta de 20 mg de cronolona micronizada de MSD Salud Animal), las cuales permanecieron de 11 a 13 días durante la época reproductiva (agosto), en el noveno día se administró Folligon Reg. SAGARPA: Q0273-067, a dosis de 300 UI (1.5 ml) por vía intramuscular y al segundo día de la administración de Folligon se retiraron las esponjas. Durante todo este tiempo las cabras estuvieron conviviendo con el macho. El diagnóstico de gestación se realizó con ultrasonido y transducción transrectal (Ami Medical inc) modelo Ultrascan 90.

9.2 Cepas bacterianas, medios, y condiciones de cultivos

Las cepas de *B. melitensis*: Cepa muntante Δ ery-CD (Donada por el Dr. Rigoberto Hernández Castro, Investigador del Hospital General “Dr. Manuel Gea Gonzalez” Departamento de Ecología de Agentes Patógenos, México, D.F), Rev 1 y la 16 M, fueron crecidas a 37°C en agar *Brucella* o caldo *Brucella* con agitación orbital a 200 RPM por 24 h.

Para la cepa de desafío, (*B. melitensis* 16 M), se incubó en 9 mL de Caldo Trypticaseína Soya (TSB) a 37° por agitación orbital durante 22 horas a 200 RPM, después de la incubación se centrifugó el cultivo a 2000 xg por 10 minutos eliminando el sobrenadante y por último se resuspendió la pastilla en 10 mL de PBS.

9.3 Inmunización

El grupo $\Delta eryCD$ se inmunizó con la cepa mutante $\Delta eryCD$, a una concentración de 1×10^6 UFC/mL, el grupo Rev 1 se inmunizó con la cepa vacunal oficial mexicana Rev 1 (Vacuna Melirev-R No. Lote 3510050-2, caducidad Julio 2013 de PRONABIVE) a una dosis de 1×10^6 UFC/mL, al grupo control (SSF) se le aplicó 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (Cuadro 1). La vacunación se realizó por vía subcutánea.

Grupo	Tratamiento	No. Animales	Dosis	Vía administración
A	$\Delta eryCD$	8	1×10^6 UFC/ml	Subcutánea
B	Rev 1	8	1×10^6 UFC/ml	Subcutánea
C	SSF	8	1 ml	Subcutánea

Cuadro 1. Diseño Experimental

9.4 Toma de muestras para extracción de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC).

Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular (10ml), con tubo Vacutainer BD verde Heparina de Litio Ref.: 367886 Pmhyl, con aguja Vacutainer 21 BD CX100, en los días cero (aplicación de la vacuna), uno, tres, cinco, siete, nueve, once, trece, quince, diecisiete, diecinueve y veintiuno. Se procedió a realizar la extracción de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con Ficoll – Paque Plus^R (Amersham Biosciences). La sangre se centrifugó a 350 xg durante 15 minutos, la interface (leucocitos) se pasó a un tubo de 15 ml con 5 ml de PBS y se mezcló suavemente. Posteriormente se colocó una pipeta Pasteur estéril y se adicionó 3 ml de Ficoll – Paque Plus^R y se centrifugó a 350 xg a 30 minutos. Después se colectaron las PBMC y se colocaron en 3 ml de PBS, posteriormente se centrifugaron a 252 xg por 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 500 µl de medio RPMI 1640 (1X) (in vitro) y las células se conservaron en congelación a -70 °C hasta su uso.

9.5 Toma de muestras para serología

Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular (10 ml), con Tubo Vacutainer BD rojo para suero Ref. 367815 y aguja Vacutainer 21 BD CX100, en los días 0, 15, 21, 30 tomando posteriormente cada quince días hasta el día 121, Las muestras se centrifugaron a 350 xg para la separación de los componentes sanguíneos y el suero, siendo este último transferido a microtubos estériles previamente identificados, para posteriormente ser mantenidos a -20°C hasta su utilización.

9.5.1 Prueba de tarjeta al 3%

La prueba de tarjeta se realizó en una placa de vidrio, con una cuadrícula de 3 x 3 cm, se depositaron 30 µl de antígeno *B. abortus* (Aba test tarjeta al 3%, PRONABIVE), para uso en caprinos y ovinos y después dentro del mismo cuadro muy cercano al antígeno se pusieron 30 µl de suero y se mezclaron con la punta de la micropipeta, con un movimiento circular, se agitó suavemente por 4 minutos y se determinó si habían aglutinado sobre una fuente de luz en un fondo oscuro. Se utilizaron sueros como controles positivo y negativo.

9.5.2 Prueba de Inmunodifusión Radial (IDR)

En una placa con el gel ya preparado (véase Anexo). Se realizó perforando los pozos con un sacabocados a una distancia mínima de 4 mm, entre ellos y se extrajo el gel con una aguja. Se llenaron los pozos con 10 a 15 µl de suero y se incubaron las placas en un recipiente cerrado a temperatura ambiente durante 24 horas y los resultados se interpretaron dando como positivos a los sueros en los que se presentó un halo o anillo de precipitación alrededor del pozo, siendo este proporcional a la concentración de anticuerpos, el halo de precipitación en una prueba positiva, se observó claramente cuando se iluminaba oblicuamente contra un fondo oscuro.

9.6 Desafío experimental con la cepa 16 M de *B. melitensis*.

Las cabras fueron movilizadas y confinadas a las unidades de aislamiento del CENID-Microbiología, con las condiciones adecuadas para alojar animales infectados experimentalmente. Una vez en dichas instalaciones, los animales fueron desafiados a una dosis de 4×10^5 UFC/ml por vía conjuntival, con la cepa virulenta *B. melitensis* 16 M. Esto se realizó aproximadamente a los 110 días de gestación.

9.7 Sacrificio de los animales

Previo a la eutanasia de las hembras se colectó una muestra de sangre y de calostro. Las cabras fueron sacrificadas de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-033-ZOO-1995), en los 40 días posteriores al desafío (aproximadamente 4 o 5 meses de gestación), o antes si sucedía el aborto, se realizó el sacrificio con un disparo con pistola de perno cautivo, calibre 0.22 (Cash Special No. Serie 21849), produciendo una insensibilización instantánea. Al caer el animal se procedió inmediatamente al desangrado por medio de un corte de las venas yugulares, para posteriormente realizar la necropsia se colectaron los nódulos linfáticos: Submandibulares, retrofaríngeos, prescapulares, supramamarios y mesentéricos. Adicionalmente, bazo, glándula mamaria y útero. En caso de aborto a los fetos se les tomo muestras de bazo, hígado, pulmón y contenido abomasal. A los cabritos se les practicó la eutanasia de forma humanitaria, se les realizó la necropsia y se obtuvieron las mismas muestras que en los fetos.

9.8 Aislamiento Bacteriológico

Los órganos y los tejidos fueron procesados en el laboratorio para el cultivo bacteriológico, cada uno se homogenizó en 5 ml de PBS y se inoculó en placas con Agar Farrell, que se incubaron por 10 días a 37 °C.

9.9 Identificación de la cepa vacunal de Rev 1 y cepa 16 M

Las colonias sospechosas fueron resembradas en medio TSA, suplementado con 2.5 µg/mL de estreptomycin, para la identificación de la cepa vacunal Rev 1 y/o cepa de desafío.

9.10 Extracción de ADN de la cepa mutante Δ eryCD

Las bacterias se colocaron en 500 μ l de PBS y se inactivaron a 95°C en baño María. Se realizó la extracción de ADN por el método de TRIzol® Reagen (Ambion) se agregaron 700 μ l de TRIzol® Reagen (Ambion) a los 500 μ l de PBS con la bacteria inactivada y se mezcló en vortex, incubando a temperatura ambiente (T/A) por cinco minutos. Se agregaron 200 μ l de cloroformo (J.T Baker 9180) frío y se mezcló en el vortex incubando a T/A por 10 min, posteriormente se centrifugó a 5590 xg/15 minutos, continuando con el proceso, se tomó la fase superior de cada muestra y se pasó a un tubo eppendorf nuevo estéril de 1.5 ml, se agregaron 500 μ l de isopropanol (J.T. Baker 9084) frío mezclando suavemente por inversión, posteriormente se centrifugó a 5590 xg por 10 minutos y se decantó el sobrenadante. A la pastilla se le agregó 1 ml de etanol grado biología molecular (Sigma Aldrich) al 70% y se centrifugó a 4038 xg por 5 minutos, se decantó el sobrenadante, la pastilla se dejó secar durante 2 horas, transcurrido este tiempo se resuspendió en 30 μ l de agua estéril. El ADN obtenido se cuantificó en el Nanodrop 2000c de Thermo Scientific.

9.11 Extracción de ARN

A partir de las PBMC se utilizó el método de paso simple (Chomczynsky, 1993). Se agregaron 700 μ l de TRIzol® Reagen (Ambion) a los 500 μ l de PMCB se mezcló en el vortex y se incubó a temperatura ambiente (T/A) por cinco minutos. Posteriormente se agregaron 200 μ l de cloroformo frío, se mezcló en el vortex incubado a T/A por 10 min y se centrifugó a 5590 xg/15 minutos, durante el proceso se tomaron la fase superior de cada muestra y se pasó a un tubo eppendorf nuevo estéril en el que se agregó 500 μ l de isopropanol frío. Cada tubo se mezcló por inversión se centrifugó a 5590 xg por 10 minutos se decantó el isopropanol. Se agregó 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 4038 xg por 5 minutos, después se decantó el etanol y se dejó secar por 2 horas finalmente se

agregaron 30 μ l de agua DEPC (Dietilpircarbonato), para conservarlas en congelación a -70 °C hasta su uso.

9.12 Inactivación de DNasa

Después de la extracción de ARN, se procedió a la inactivación de DNasa siguiendo el protocolo del producto: Deoxyribonuclease I (Sigma). A los 30 μ l de la muestra de ARN se agregaron 3 μ l de Buffer 10X. Se incubó a 37°C por 45 minutos. Después se añadió 0.1 volumen (3 μ l) de (DNasa Inactivation) y se mezcló gentilmente, se incubó por 2 minutos a T/A y se mezcló, se centrifugó a 559 xg por 15 minutos y la fase líquida (RNA) se colocó en un tubo nuevo, las muestras se guardaron a -70°C hasta su uso.

9.13 Cuantificación de ARN

Las muestras de ARN se cuantificaron utilizando el NanoDrop 2000 Spectrophometer siguiendo las especificaciones del fabricante.

9.14 Síntesis de ADNc

La realización de la síntesis de ADNc de los tres grupos (*Δ eryCD*, Rev 1 y SSF) se efectuó con el Kit First Strand cDNA Synthesis Kit de (Thermo Scientific Cat. No. #K1612), siguiendo las indicaciones del fabricante.

9.15 Diseño de oligos para la evaluación de la respuesta inmune celular

Para la evaluación de la respuesta inmune de tipo celular Th1, se determinaron los niveles de TNF- α , IFN- γ e Interleucina (IL12) y para la respuesta inmune de tipo humoral Th2 se evaluaron los niveles de Interleucina 4 (IL4) e Interleucina 10 (IL10), se diseñaron oligos específicos de las citocinas ya mencionadas realizando una búsqueda en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando una herramienta de alineamiento (Basic

Local Alignment Search Tool) (BLAST), el software Oligo Analyzer para el diseño de los oligos a partir de las secuencias y el Software Serial Cloner 2.6 para la evaluación de los oligos *in silico*.

9.16 Estandarización de citocinas por gradiente de temperaturas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en punto final

A partir de 500 μL de PBMCs estimulados con pokeweed (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se estandarizó cada citocina por medio de gradiente de temperaturas en PCR punto final, para determinar la temperatura de alineación, la PCR se desarrolló utilizando PCR Master Mix 2X de Thermo Scientific Cat. No. #K0171 que contiene (0.05 U/ μL de Taq DNA polimerasa, buffer de reacción, 4 mM MgCl_2 y 0.4 mM de dNTP), oligos específicos para cada citocina, agua para PCR y cDNA.

La reacción se realizó a 12 μl de volumen final, se agregó PCR master mix 1X 6 μl , 10 pico moles (pMol) de cada iniciador 1 μl , cDNA (250 ng/ μl) 1 μl , y agua estéril 3 μl . El programa en el termociclador fue el siguiente: un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos, 45 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a diferentes temperaturas entre los 51 a 62°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 30 segundos y una extensión final a 72°C por 10 minutos. Para la visualización del producto amplificado se preparó gel de agarosa al 2.5%, teñido con bromuro de etidio. Se usó un voltaje de 80 V por 60 minutos a 400 MHz.

9.17 Cuantificación de citocinas por Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo Real (q-PCR).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo utilizando el PCR Master Mix 2X (Thermo Scientific) #K0171 (0.05 U/ μ L de Taq DNA polimerasa, buffer de reacción, 4mM MgCl₂ y 0.4 mM de dNTP), un par de iniciadores a 10 picomoles (pMoles), Syto 9 (Invitrogen de Life Technologies) , cDNA, y agua. Se preparó una pre-mezcla, utilizando el siguiente protocolo, PCR Master Mix (1X) 6.5 μ l, Iniciadores FW y RV 0.2 μ l, Syto9 1.0 μ l, cDNA 1.0 μ l y agua para PCR 4.1 μ l, cada muestra se realizó por triplicado y se utilizó placa óptica de 96 pozos bajo las siguientes condiciones: en el Software de Light Cyler 480 de ROCHE. Se seleccionó un formato de detección SYBR Green I/HRM Dye. Se utilizaron 5 programas para la cuantificación en qPCR (Cuadro 2).

Programas	Ciclos	Modo de Análisis
1. Preincubación	1	Ninguno
2. Amplificación	45	Cuantificación
3. Extensión Final	1	Ninguno
4. Curva melting	1	Ninguno
5. Enfriamiento	1	Ninguno

Cuadro 2. Programas utilizados para la qPCR.

Las condiciones de la PCR se muestran en el Cuadro 3 para el perfil de citocinas mediante qPCR.

1. Pre – incubación

Temperatura °C	Modo Adquisición	Tiempo	Ritmo (°C/S)
Desnaturalización			
Inicial 95°C	Ninguno	3 minutos	4.4

2. Amplificación

Temperatura °C	Modo Adquisición	Tiempo	Ritmo (°C/S)	Sec Target °C	Step Size °C	Step Delay (ciclos)
Desnaturalización 95 °C	Ninguno	30 seg	4.4	-----	----	-----
Amplificación 70 °C	Ninguno	30 seg	2.2	60	1	3
Extensión 72 °C	Simple	12 seg	4.4	----	----	----

3. Extensión Final

Temperatura °C	Modo Adquisición	Tiempo	Ritmo (°C/S)
Extensión Final 72 °C	Ninguno	5 minutos	4.4

4. Curva Melting

Temperatura °C	Modo Adquisición	Tiempo	Ritmo (°C/S)	Adquisición (Ciclos)
95 °C	Ninguno	05 seg	4.4	-----
65 °C	Ninguno	1 minuto	2.2	-----
97 °C	Continuo	-----	0.11	5

5. Enfriamiento

Temperatura °C	Modo Adquisición	Tiempo	Ritmo (°C/S)
40 °C	Ninguno	30 segundos	2.2

Cuadro 3. Condiciones de la qPCR.

9.18 Método de cuantificación

Se utilizó el método de cuantificación relativa el cual consistió en comparar el Ct (threshold cycle o ciclo umbral) de la muestra desconocida, con una muestra de calibración que se utilizó como referencia fisiológica (extracción de PBMC a partir de sangre estimuladas con Pokeweed). Todas las cuantificaciones, fueron normalizadas con Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control endógeno, para tener en cuenta la variación en la concentración inicial, calidad del ARN y la eficiencia de reacción en la transcripción reversa. Este método fue seleccionado debido a que es sencillo, fácil y rápido. Las ecuaciones que se utilizaron para calcular $\Delta\Delta Ct$ mediante el método de cuantificación relativa fueron:

$$Ct \text{ de la muestra} - Ct \text{ GAPDH} = \Delta Ct$$

$$\Delta Ct \text{ de la muestra} - \Delta Ct \text{ del calibrador} = \Delta\Delta Ct$$

$$\text{Cantidad relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

9.19 Análisis estadístico

Cada experimento se realizó por triplicado, y de forma independiente. Como prueba paramétrica se utilizó t student y como prueba no paramétrica ANOVA de dos colas, seguida de la prueba estadística de Bonferroni en el software Pathprism versión 6.

10.RESULTADOS

10.1 Diagnóstico de gestación

El diagnóstico de gestación se realizó a los 45 días después de la monta, en el grupo Δ eryCD quedaron gestantes 7 de los 8 animales, en el grupo Rev 1 todas las cabras quedaron gestantes y el grupo control (SSF) dos cabras no quedaron gestantes (Cuadro 4).

Grupo	Tratamiento	No. de Cabra ID	Diagnóstico de Gestación
A	eryCD	9	+
		10	+
		11	+
		12	-
		13	+
		14	+
		15	+
		16	+
B	Rev 1	17	+
		18	+
		19	+
		20	+
		21	+
		22	+
		23	+
		24	+
C	SSF	25	+
		26	-
		27	+
		28	+
		29	+
		30	+
		32	+

Cuadro 4. Diagnóstico de gestación de los tres grupos. (+) Positivo (-) Negativo.

10.2 Resultados de la prueba de tarjeta al 3% post-vacunación

La respuesta serológica fue determinada por la prueba de tarjeta al 3%, del día 0 al día 121 para el grupo $\Delta eryCD$, a partir del día 7 los 8 animales resultaron positivos a la prueba hasta el día 121, en el grupo Rev 1 la respuesta serológica se evaluó del día 0 al 90, resultando solo una cabra positiva en el día 7, en el día 15, 7 cabras resultaron positivas a la prueba de tarjeta al 3%, en el día 21 solo 3 cabras resultaron positivo y para el día 30 solo hubo respuesta serológica en una cabra; en el grupo control (SSF) se mantuvo negativo durante todo el experimento (Figura 1). En la Figura 2 se muestra el número de animales positivos entre los grupos $\Delta eryCD$ y Rev 1 resultando ser significativo $P < 0.0005$ entre el grupo $\Delta eryCD$ y Rev 1 a la inducción de anticuerpos vacunales.

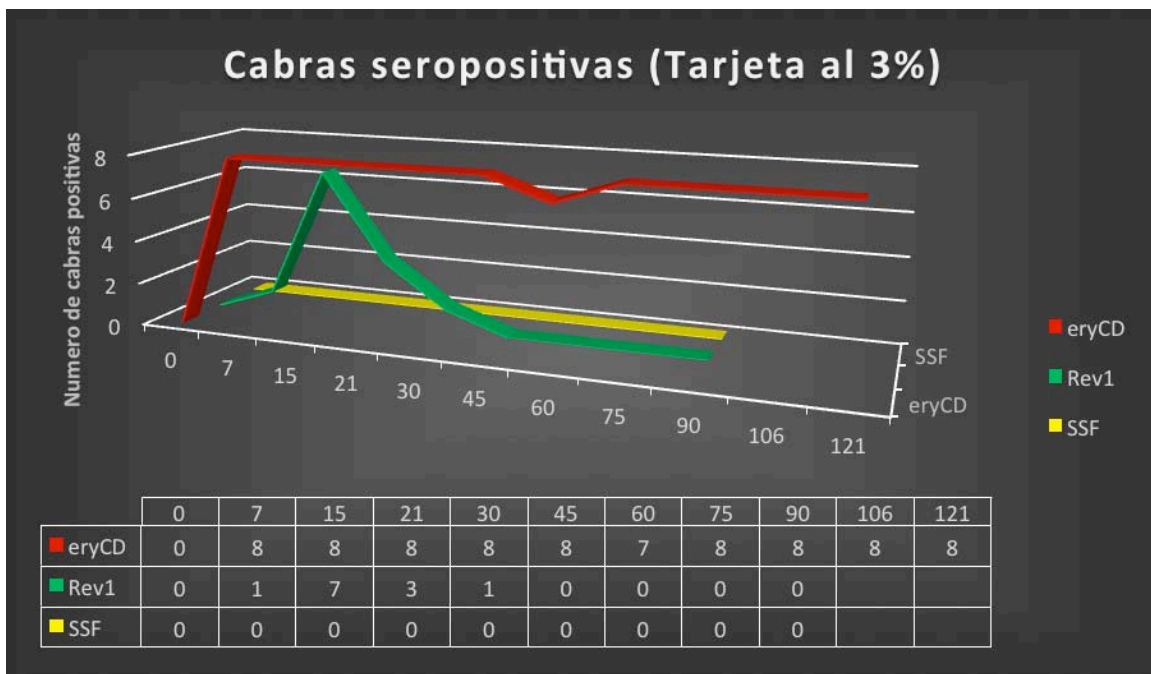


Figura 1. Respuesta serológica de cabras vacunadas, empleando la prueba de tarjeta al 3%, a diferentes tiempos post-vacunación.

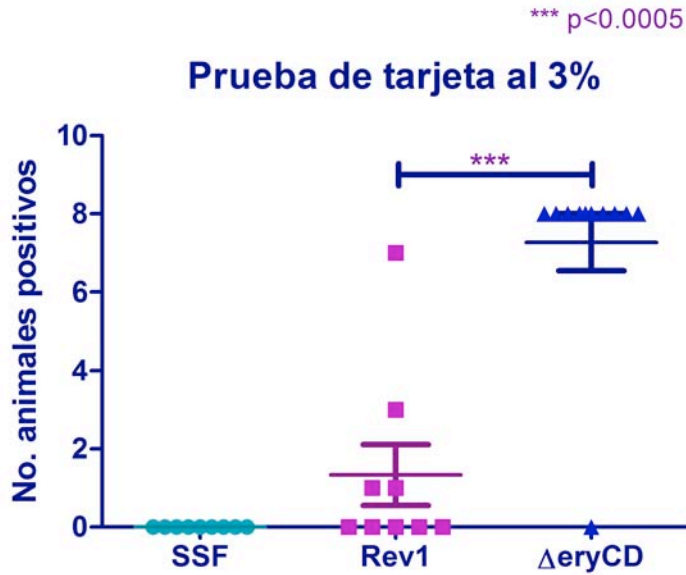


Figura 2. Número de animales positivos a la prueba de Tarjeta al 3% entre los grupos $\Delta eryCD$ y Rev 1 que muestra ser significativa ($P < 0.0005$) a la respuesta serológica desde el día 0 al 121 para el grupo de $\Delta eryCD$ y desde el día 0 al 90 para los grupos Rev1 y grupo control (SSF).

10.3 Resultados de la prueba de Inmunodifusión Radial (IDR) post-vacunación

Los resultados obtenidos post-vacunación en la prueba de IDR para diferenciar animales vacunados de infectados utilizando el Hapteno Nativo como antígeno de *B. melitensis* 16 M, en el grupo $\Delta eryCD$ se muestreó del día 0 al día 121 en el que solo una cabra resultó positiva del día 21 al 121, en relación a los grupos Rev 1 y grupo control (SSF) se mantuvieron negativos durante todo el experimento (Figura 3). La Figura 4 muestra solo un animal positivo a la prueba de IDR, en el que resultó estadísticamente significativa ($P < 0.0005$) entre los grupos $\Delta eryCD$ y Rev1.

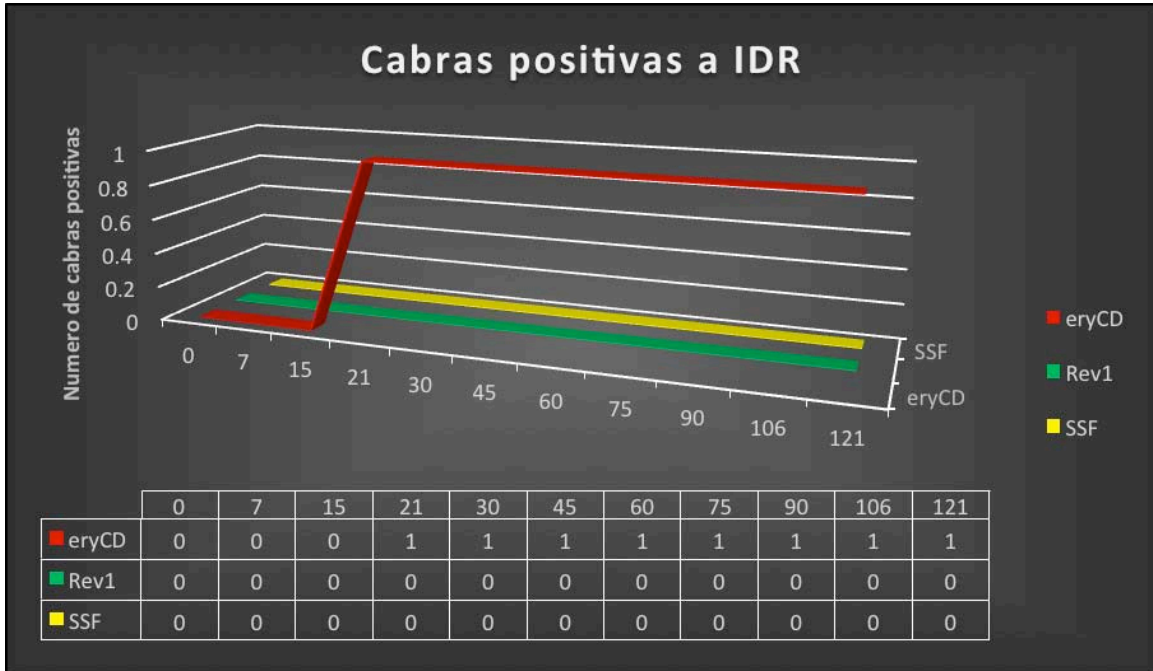


Figura 3. Resultados de diferenciación entre vacunados e infectados de las cabras vacunadas, empleando la prueba de Inmunodifusión Radial, a diferentes tiempos post-vacunación.

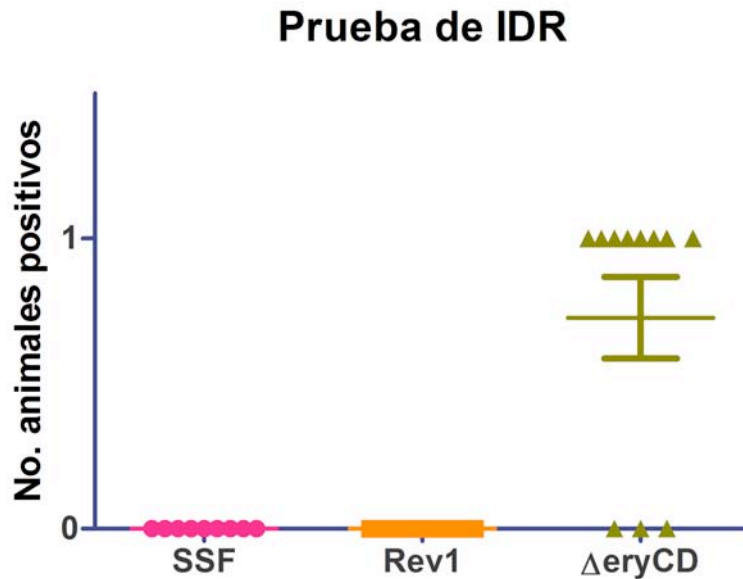


Figura 4. Número de animales positivos empleando la prueba de IDR post vacunación mostrando que el grupo Δ eryCD, una cabra dio positiva a la prueba resultando ser significativa ($P < 0.0005$) entre los grupos Δ eryCD y Rev 1 del día 0 al 121.

10.4 Protección ante el desafío

Los tres grupos de animales fueron desafiados aproximadamente a los 110 días de gestación, con la cepa virulenta de *B. melitensis* 16 M a 4×10^5 UFC/ml por vía conjuntival. En los animales del grupo $\Delta eryCD$ no se presentó el aborto. En el grupo Rev 1 no se presentó aborto, las cabras 17 y 23 parieron antes del desafío experimental, las cabras 19 y 21 presentaron parto normal, las cabras 18, 20, 22 y 24 fueron sacrificadas de manera humanitaria, ya que su parto se retrasó y no se presentó el aborto después de los 30 días de post-desafío. En el grupo control (SSF) se presentó aborto solo en la cabra 25, las demás cabras restantes presentaron parto y se les realizó la necropsia de manera humanitaria.

Grupo	Tratamiento	No. de Cabra ID	Aborto, Parto O Necropsia	No. de Fetos o cabritos
A	<i>eryCD</i>	9	Parto	2 cabritos
		10	Necropsia	1 feto vivo
		11	Parto	2 cabritos
		12	Necropsia	No gestante
		13	Parto	2 cabritos
		14	Necropsia	1 feto vivo
		15	Parto	1 cabrito
		16	Parto	1 cabrito
B	Rev 1	17	Parto	1 cabrito
		18	Necropsia	1 feto vivo
		19	Parto	2 cabritos
		20	Necropsia	1 feto vivo
		21	Parto	2 cabritos
		22	Necropsia	1 feto vivo
		23	Parto	1 cabrito
		24	Necropsia	1 feto vivo
C	SSF	25	Aborto	2 fetos
		26	Necropsia	No gestante
		27	Parto	2 cabritos
		28	Parto	2 cabritos
		29	Muerte	2 fetos
		30	Necropsia	No gestante
		32	Parto	2 cabritos
67	Necropsia	No gestante		

10.5 Aislamiento bacteriológico y susceptibilidad a antibióticos del grupo de cabras vacunados con Rev 1 de *B. melitensis* y grupo control

Para el grupo grupo $\Delta eryCD$, se aislo del nódulo supramamario la cepa mutante $\Delta eryCD$ en la cabra 13.

En el grupo Rev 1, de la cabra 23 se aisló la cepa de desafío a partir del nódulo submandibular, en la cabra 24 hubo aislamiento a partir de útero identificando cepa vacunal de Rev 1, identificando las cepas mediante la prueba a sensibilidad de antibióticos.

Para el grupo control (SSF) se aisló de 6 cabras, de las cuales se logró aislar del nódulo preescapular la cepa de desafío de la cabra 26; se aisló del nódulo parotídeo la cepa desafío en la cabra 27, donde a la vez de un cabrito se aisló a partir de bazo la cepa de desafío; de la cabra 29 se aisló la cepa de desafío a partir de la glándula mamaria además de placenta, del feto 1: se aisló la cepa de desafío 16 M del hígado y del bazo; así como del feto 2: del pulmón; de la cabra 31 se aisló del nódulo submandibular la cepa de desafío, de la cabra 32 se aisló la cepa desafío a partir de nódulo parotídeo, submandibular, mesentérico, útero y bazo; del cabrito se aisló la cepa de desafío de hígado y pulmón y de la cabra 25 se presentó el aborto pero no hubo aislamiento (Cuadro 8).

Grupo	Tratamiento	Cabra	Órgano o Nódulo	Aborto	Aislamiento
A	<i>ΔeryCD</i>	13	Supramamario	No	<i>ΔeryCD</i>
B	Rev 1	23	Submandibular	No	16 M
		24	Útero	No	Rev1
		25	-----	Si	-----
		26	Preescapular	No	16 M
		27	Parotídeo	No	16 M
		29	Cabrito 2: Bazo Glándula mamaria y placenta, Feto1: Hígado, Bazo y Feto 2: Pulmón	No	16 M
C	SSF	31	Submandibular Parotídeo	No	16 M
		32	Submandibular mesentérico, Hisopo uterino y Bazo. Cabrito: Hígado y Pulmón	No	16 M/Rev1

Cuadro 6 Aislamiento bacteriológico de los diferentes grupos experimentales.

10.6 Identificación de cepa mutante $\Delta eryCD$ de *Brucella melitensis* Rev1, mediante PCR punto final

El producto de amplificación a partir de la cepa mutante $\Delta eryCD$ fue de 361 pb. En la cepa control (*B. melitensis* 16 M), se obtuvo una banda de 1063 pb. (Figura 5).

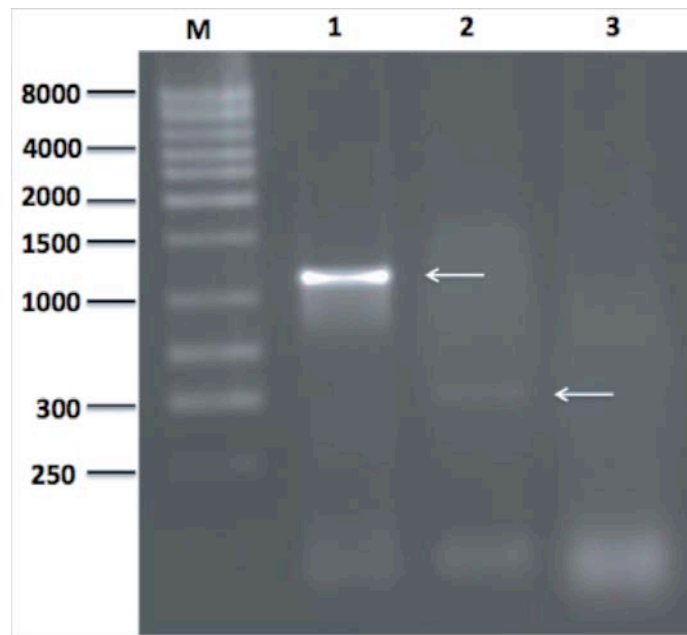


Figura 5. Gel de agarosa al 1% mostrando los productos de amplificación por PCR para la identificación de *B. melitensis* y de la cepa mutante $\Delta eryCD$ a partir de ADN extraído de cultivo puro a una concentración de 250 ng/ μ L. Donde M: Marcador de peso molecular 1 kb ADN Ladder. 1: *Brucella melitensis*. 2: cepa mutante $\Delta eryCD$ (Cabra 13). 3: control negativo (agua).

10.7 Secuencias de los oligos sintetizados específicos para cada citocina

Los oligos se sintetizaron a partir de la secuencia base obtenida del GenBank y diseñados en el Software Serial Cloner Versión 6 mediante una PCR *in silico*, (Cuadro 9).

Citocina	Iniciadores Sentido (F) y Anti sentido (R)	Amplicon pares de base (bp)
GAPDH	F, CAAGGCAGAGAACGGGAAG R, GCCTTCTCCATGGTAGTGAAG	144 bp
IL4	F, GAATTCATGCATGGAGCTGCC R, CCTGTAGATACGCCTAAGCTC	108 bp
IL10	F, CTGCCCTGCGAAAACAAGAG R,GTAGTTGATGAAGATGTCAAACCTC	114 bp
IL12	F, ACCAGAACATGCTGGCAGCT R, TGAAGAAGGATGCAGAGCTTGA	133 bp
IFN γ	F, GCTGATTCAAATTCCGGTGG R, TGACTTCTCTTCCGCTTTCTG	117 bp
TNF α	F, GTACGAACCCATCTACCAGG R, ATGATCCCAAAGTAGACCTGC	123 bp

Cuadro 7. Oligos utilizados para la evaluación de la respuesta inmune en los grupos inmunizados

10.8 Gradientes de temperaturas de alineamiento de cada una de las citocinas en PCR punto final

El gradiente de temperatura corresponde a GAPDH, con una banda de 144 pares de bases (pb), se muestra en la Figura 6 las temperaturas que se utilizaron fueron 56.9 °C, 2. 55.3 °C, 3. 53.7 °C, 4. 57.6 °C, 5. 59.0 °C, 6. 60.3 °C, 7. 52.2 °C, 8. 61.3 °.

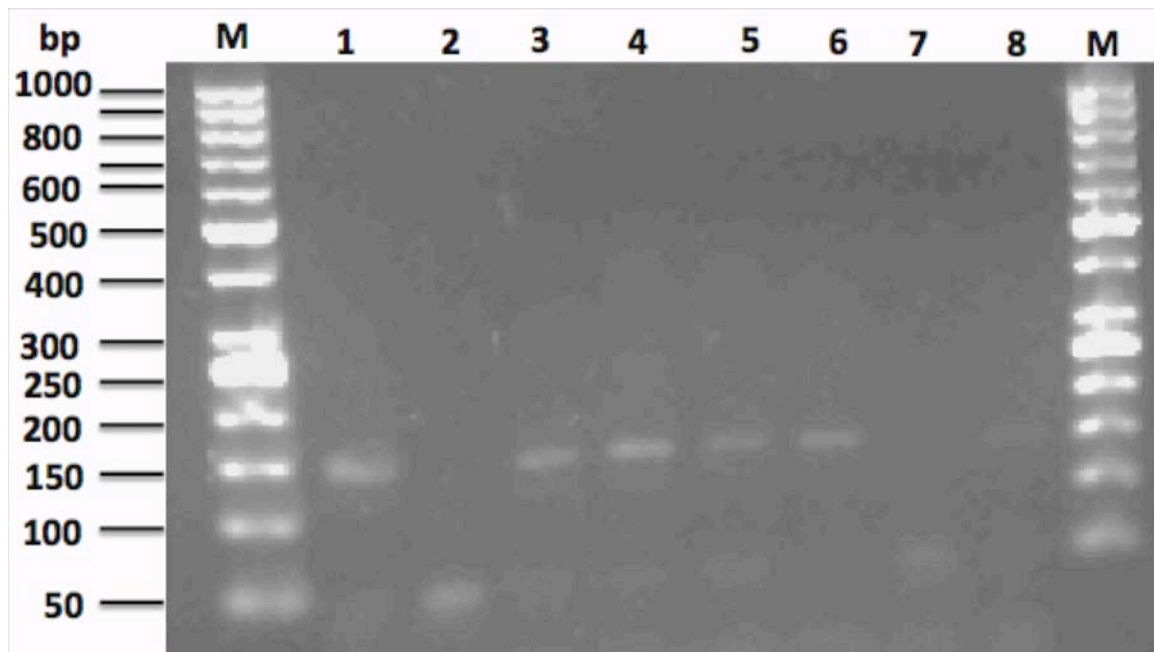


Figura 6. Gradiente de temperatura de alineamiento para el gen GAPDH visualizado en un gel de agarosa al 2.5% obteniendo una banda de 144 pb. De izquierda a derecha: M es Marcador de peso molecular 50 pb. 1. 56.9 °C, 2. 55.3 °C, 3. 53.7 °C, 4. 57.6 °C, 5. 59.0 °C, 6. 60.3 °C, 7. 52.2 °C, 8. 61.3 °.

El gradiente de temperatura por PCR punto final para Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α), con una banda de 123 pares de bases (pb) se visualiza en la Figura 7, donde se muestra el gradiente de las ocho temperaturas evaluadas para determinar la óptima.

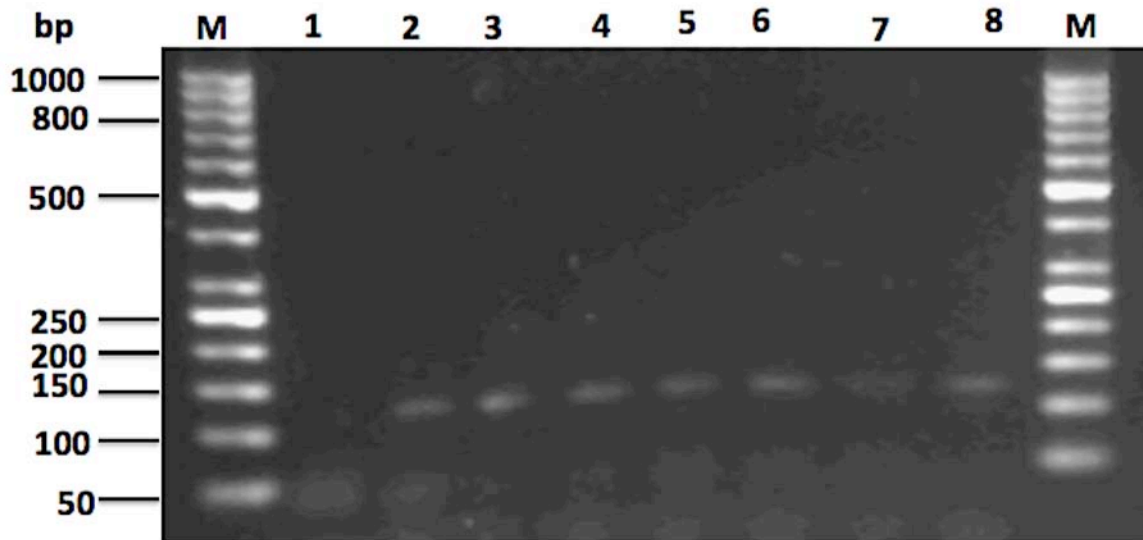


Figura 7. Gradiente de temperatura de alineamiento para el gen TNF- α visualizado en un gel de agarosa al 2.5% obteniendo una banda de 123 pb. De izquierda a derecha: M es Marcador de peso molecular 50 bp. 1. 56.9 °C, 2. 55.3 °C, 3. 53.7 °C, 4. 57.6 °C, 5. 59.0 °C, 6. 60.3 °C, 7. 52.2 °C, 8. 61.3 °.

El gradiente de temperatura de alineamiento corresponde a IL12, (Figura 8) con una banda de 133 pares de bases (pb). Usando un marcador de peso molecular de 50 kb mezclado con buffer DNA 6 XD se muestra el gradiente de las ocho temperaturas en la que se determinó la temperatura de alineación del iniciador.

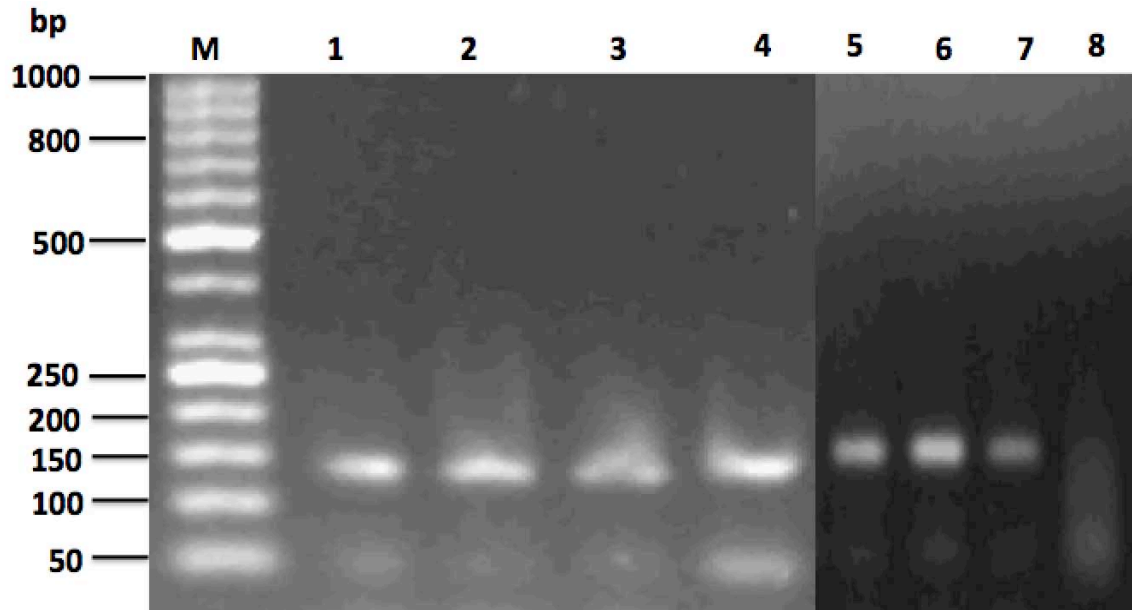


Figura 8. Gradiente de temperatura de alineamiento para el gen IL12 visualizado en un gel de agarosa al 2.5% obteniendo una banda de 133 pb. De izquierda a derecha: M es Marcador de peso molecular 50 pb. 1. 56.9 °C, 2. 55.3 °C, 3. 53.7 °C, 4. 57.6 °C, 5. 59.0 °C, 6. 60.3 °C, 7. 52.2 °C, 8. 61.3 °.

En la Figura 9 se muestra el gradiente de las ocho temperaturas en las que se determinó la temperatura de alineación del iniciador. Las amplificaciones corresponden a Interleucina 4 (IL4), con una banda de 108 pares de bases (pb). Usando un marcador de peso molecular de 50 kb mezclado con buffer DNA 6 XD.

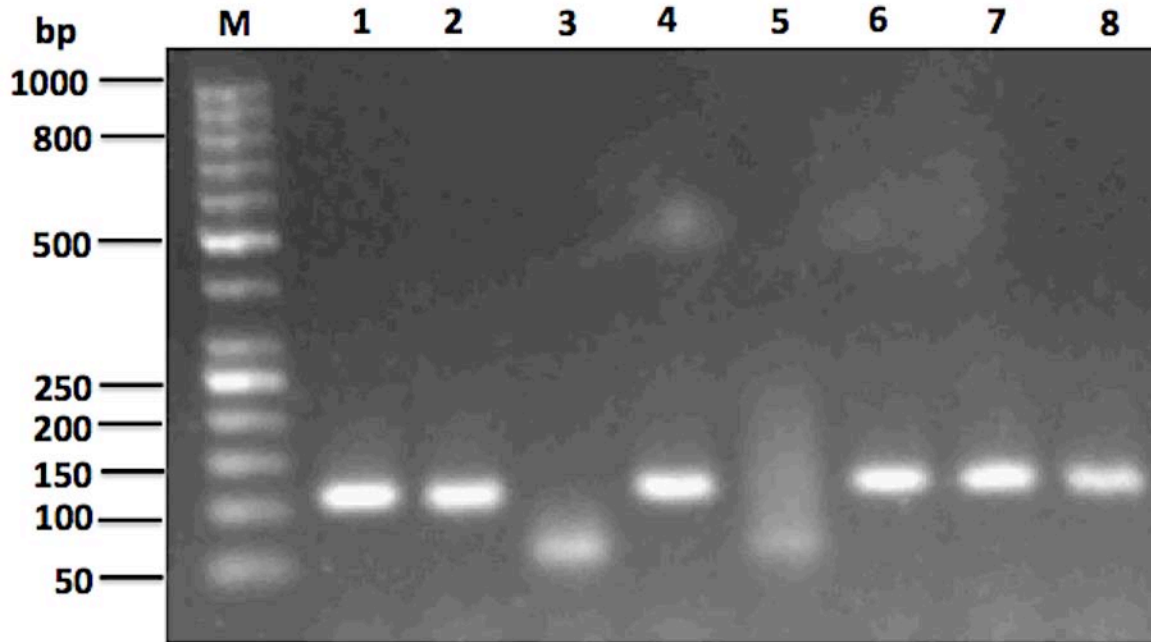


Figura 9. Gradiente de temperatura de alineamiento para el gen IL4 visualizado en un gel de agarosa al 2.5% obteniendo una banda de 108 pb. De izquierda a derecha: M es Marcador de peso molecular 50 pb. 1. 56.9 °C, 2. 55.3 °C, 3. 53.7 °C, 4. 57.6 °C, 5. 59.0 °C, 6. 60.3 °C, 7. 52.2 °C, 8. 61.3 °.

El gradiente de temperaturas de alineamiento (Figura 10) por PCR punto final corresponde a Interferón gamma (INF- γ), con una banda de 117 pares de bases (pb). Usando un marcador de peso molecular de 50 kb mezclado con buffer DNA 6 XD.

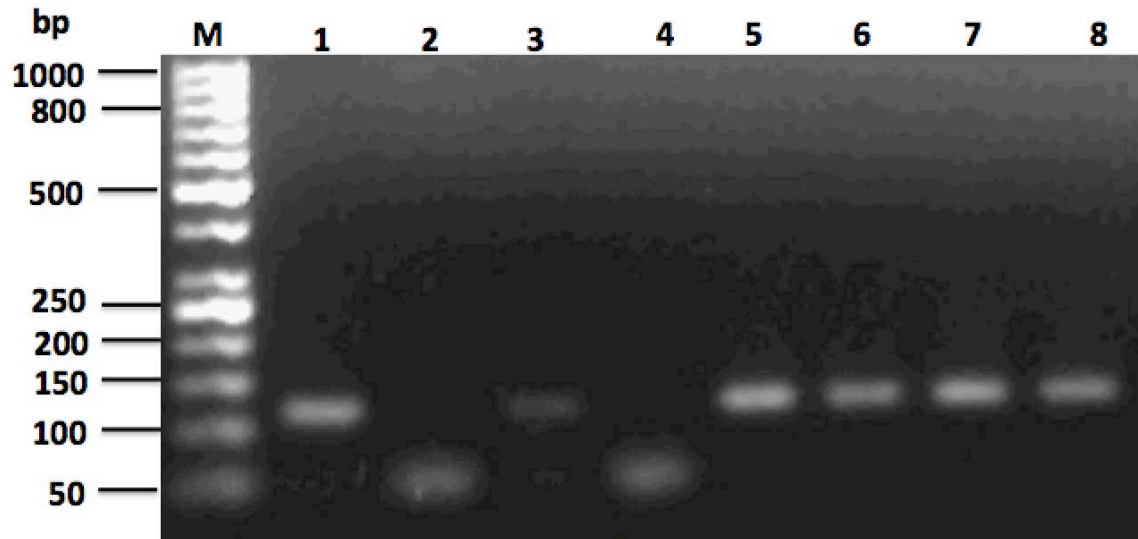


Figura 10. Gradiente de temperatura de alineamiento para el gen INF- γ , visualizado en un gel de agarosa al 2.5% obteniendo una banda de 117 pb. De izquierda a derecha: M es Marcador de peso molecular 50 bp. 1. 56.9 °C, 2. 55.3 °C, 3. 53.7 °C, 4. 57.6 °C, 5. 59.0 °C, 6. 60.3 °C, 7. 52.2 °C, 8. 61.3 °.

El gradiente de temperaturas por PCR punto final que corresponde a Interleucina 10 (IL10), con una banda de 114 pares de bases (pb). Usando un marcador de peso molecular de 50 kb mezclado con buffer DNA 6 XD. En la Figura 11 se muestra el gradiente de las ocho temperaturas en la que se la temperatura de alineación de los iniciadores.

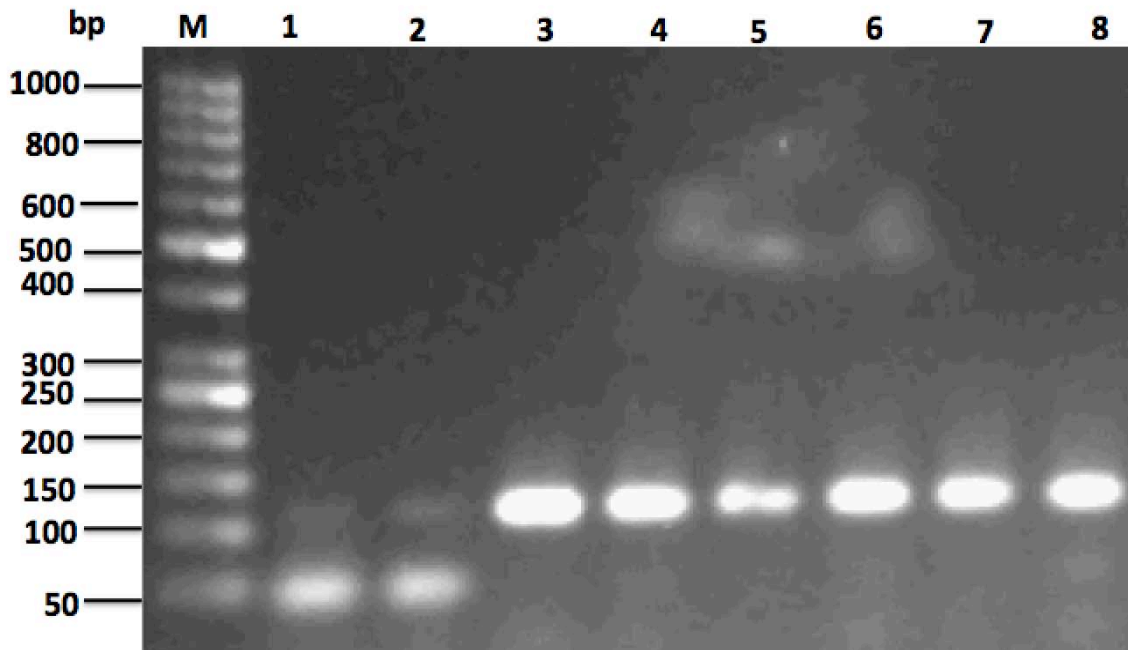


Figura 11. Gradiente de temperatura de alineamiento para el gen IL10 visualizado en un gel de agarosa al 2.5% obteniendo una banda de 114 pb. De izquierda a derecha: M es Marcador de peso molecular 50 pb. 1. 56.9 °C, 2. 55.3 °C, 3. 53.7 °C, 4. 57.6 °C, 5. 59.0 °C, 6. 60.3 °C, 7. 52.2 °C, 8. 61.3 °C.

Después de la estandarización en PCR punto final, se determinó que la temperatura de alineación de todos los iniciadores utilizados fue de 60 °C.

10.9 Resultados de la estandarización en qPCR (tiempo real) de las citocinas

En la Figura 12 se visualizan los fragmentos amplificados por duplicado de cada una de las citocinas, obteniendo la estandarización del qPCR, utilizando PBMC estimulados con Pokeweed en el que uso la plantilla en el LightCycler 480 Software de Roche, considerando una temperatura de alineación de 60 °C para todos los iniciadores, se seleccionó un *touch down* para minimizar la inespecificidad, reduciendo así la cantidad de dímeros.

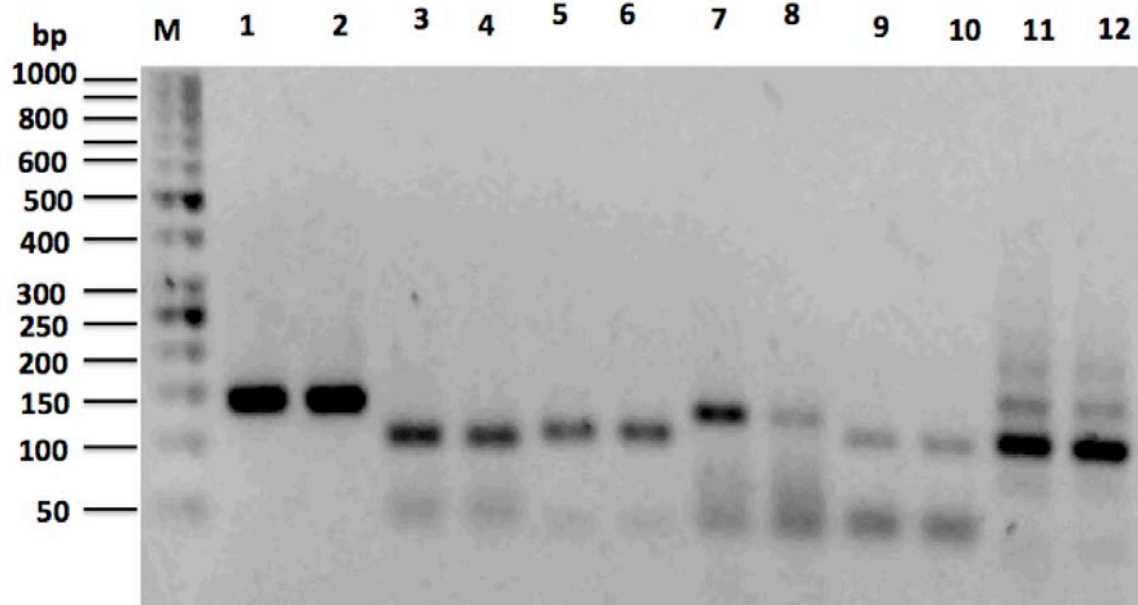


Figura 12. Gel de agarosa al 2.5 % mostrando los productos de amplificación por qPCR de los genes de respuesta inmune celular (citocinas) y un gen endógeno a partir de los oligos diseñados. De izquierda a derecha: M Marcador de peso molecular 50 kb ADN Ladder. 1 y 2 GAPDH; 3 y 4 IL4; 5 y 6 IL10; 7 y 8; IL12; 9 y 10 INF- γ ; 11 y 12 TNF- α .

10.10 Respuesta Inmune celular

La expresión de la citocinas proinflamatorias como TNF- α , (Figura 13) a partir de PBMC mediante el ARNm; la cepa mutante $\Delta eryCD$ induce una expresión de TNF- α a partir del día 5 al día 11 manteniéndose estable hasta el día 13. En el grupo vacunado con Rev 1, no hubo una expresión notoria de TNF- α en comparación con la cepa mutante, resultando ser no significativo ($P > 0.005$) entre los grupos $\Delta eryCD$ y Rev 1 valorando la expresión de TNF- α post vacunación.

La cepa mutante $\Delta eryCD$ (Figura 14) provocó una inducción de IFN- γ , cabe mencionar que en el día 0 se observa un pico elevado en relación a la cantidad relativa en un individuo en relación al grupo $\Delta eryCD$, en el que probablemente esta citocina reaccionó hacia alguna infección, bajando su expresión para el día 1 y 3. Pero, para el día 5 la inducción de IFN- γ tuvo una expresión elevada mostrándose constante hasta el día 11, en el día 13 su expresión empezó a bajar. Para el grupo Rev 1 en el día 5 mostró mayor expresión IFN- γ , hasta el día 11, en el día 13 su expresión fue débil, resultando ser no significativo $P > 0.05$ entre los grupos $\Delta eryCD$ y Rev 1 post vacunación.

Con respecto a la inducción de IL12 (Figura 15), en el grupo $\Delta eryCD$ se presentó con mayor expresión IL12 en el día 5, bajando su expresión para el día 9, mientras tanto para el día 13 dejó de expresarse. Para el grupo Rev 1 la expresión de IL12 se mantuvo los días 5 y 7, disminuyendo en el día 9 y expresándose de nuevo en el día 11, el día 13 no manifestó expresión resultando ser no significativo entre el grupo $\Delta eryCD$ y Rev 1 post vacunación.

IL4 (Figura 16) presentó expresión durante el día 5 en solo 3 cabras del grupo control (SSF), por lo que en el día 7 los grupos $\Delta eryCD$ y Rev 1 hubo inducción de esta citocina, en el Día 9 expresión de IL4 para el grupo $\Delta eryCD$ y

algunos animales del grupo Rev 1, cabe mencionar que el grupo control (SSF) no hubo secreción de esta citocina por lo que no se pudo realizar la cuantificación en este día. Para el día 13 hubo inducción entre los grupos Δ eryCD y Rev 1, en el que resultaron ser no significativo $P > 0.05$ entre el grupo Δ eryCD y Rev 1, evaluando esta citocina por trece días

IL10 solo tuvo expresión en el grupo Δ eryCD en el Día 11, para el día 13 el grupo control (SSF) solo hubo inducción de esta citocina.

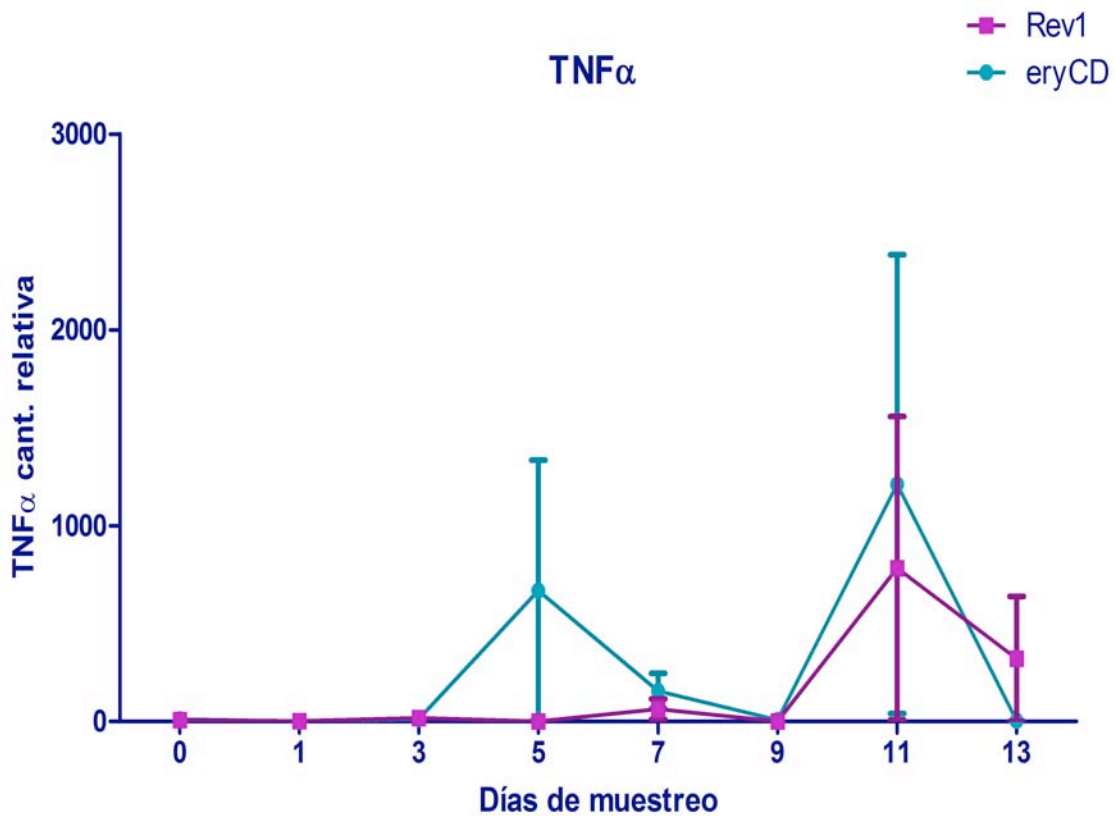


Figura 13. Expresión de TNF- α por qPCR a partir de PBMC después de ser vacunados con Δ eryCD y Rev1 del día 0 al 13 post vacunación.

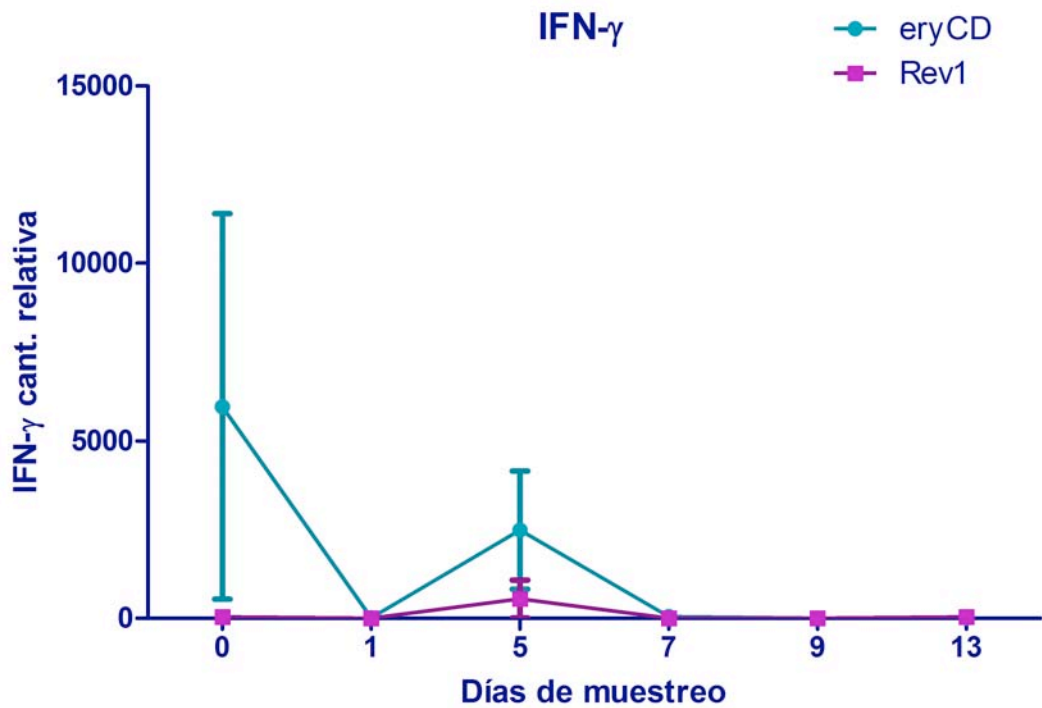


Figura 14. Expresión de IFN- γ por qPCR a partir de PBMC después de ser vacunados con Δ eryCD y Rev 1 del día 0 al 13 post-vacunación.

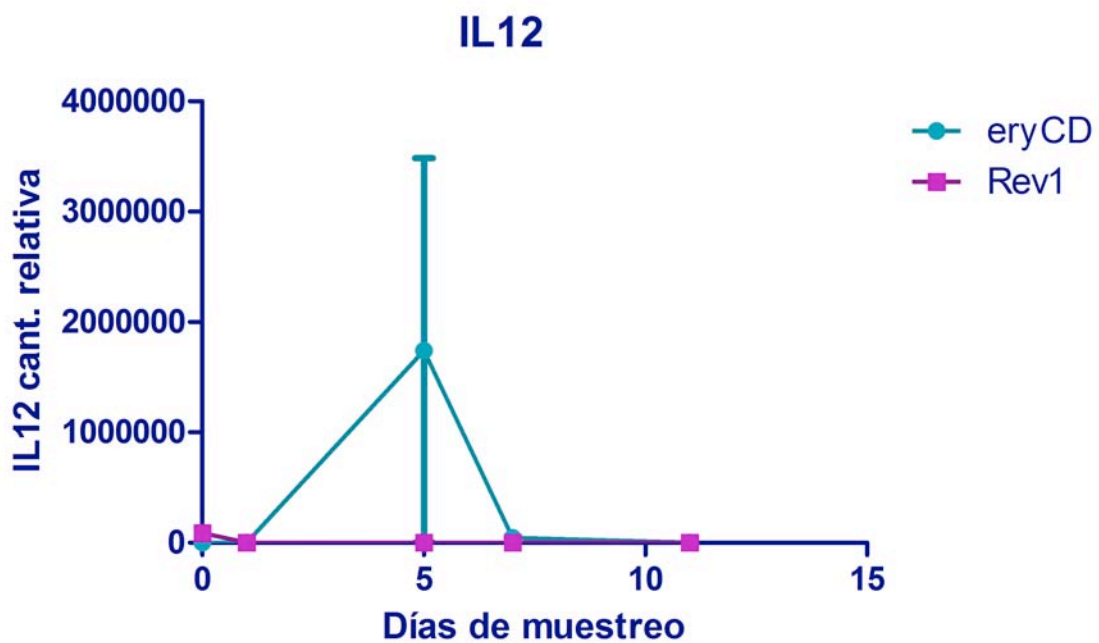


Figura 15. Expresión de IL12 por qPCR a partir de PBMC después de ser vacunados con Δ eryCD y Rev 1 del día 0 al 13 post-vacunación.

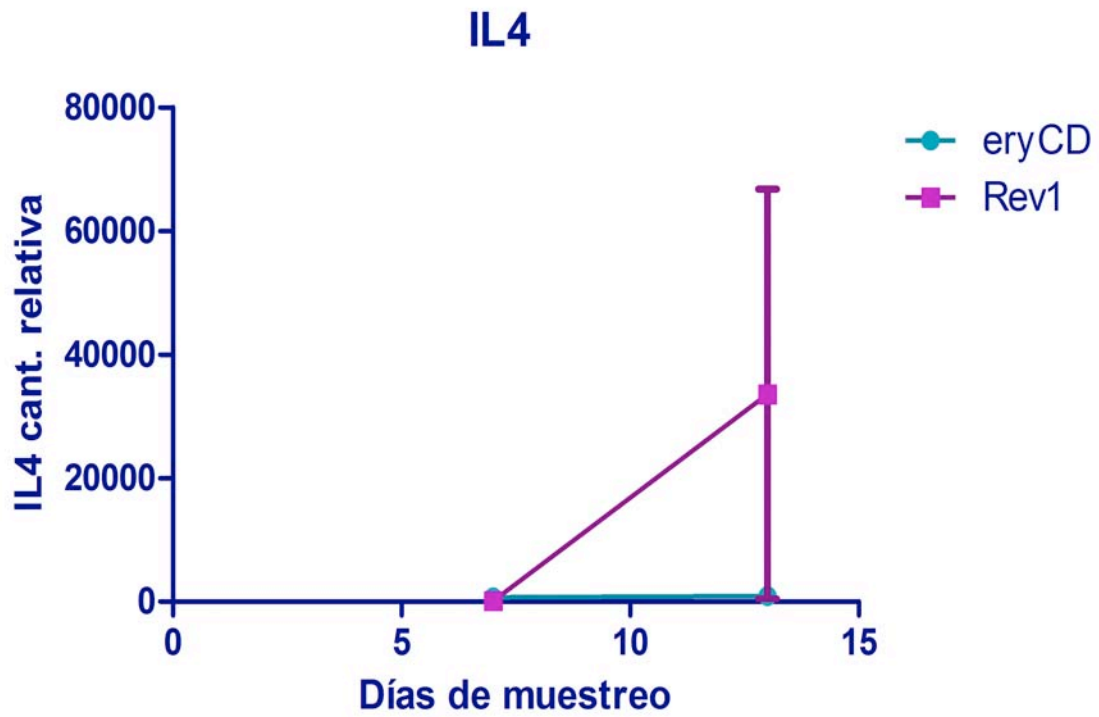


Figura 16. Expresión de IL4 por qPCR a partir de PBMC después de ser vacunados con $\Delta eryCD$ y Rev 1 del día 0 al 13 post-vacunación.

11. DISCUSIÓN

El objetivo de una buena vacunación contra *B. melitensis*, es una eficiente inmunidad celular y humoral sin desencadenar la enfermedad. Las principales metas de los diferentes programas de vacunación son el control, la prevención y la erradicación, especialmente en países en vías de desarrollo (Alva-Pérez, 2014; Blasco, 2006; Cassataro et al., 2007). Sin embargo, es fundamental que el inmunógeno sea una cepa viva atenuada, ya que de esta forma se recrean las condiciones pertinentes de una inmunidad celular, produciendo una infección controlada que genera una respuesta inmune eficaz y duradera (Schuring et al., 2002).

De acuerdo con esto, se evaluó la capacidad de la cepa mutante $\Delta eryCD$ de *B. melitensis* Rev 1, para inducir una respuesta inmune celular, además de proteger contra el aborto frente al desafío experimental en un modelo de cabras gestantes.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, demostraron la presencia de anticuerpos vacunales por la mutante $\Delta eryCD$ desde el día 7 hasta el día 121, comprobando ser una vacuna con cierto grado de protección en base a su atenuación y respuesta inmune. Ya que estos resultados son similares a los obtenidos por Edmonds et al. (2002), donde emplearon la prueba de tarjeta a los 126 días post-vacunación, donde el 56% del grupo vacunado por la mutante *BM25* expresaron anticuerpos, mientras que los animales vacunados con la cepa Rev 1 no presentaron la inducción de anticuerpos. Hernández-Andrade & Díaz-Aparicio (2001), hacen referencia que en animales vacunados la respuesta humoral incluye las clases de IgM e IgG; sin embargo, esta respuesta se mantiene de 6 a 8 meses disminuyendo IgG₂ y solamente persistiendo bajos niveles de IgM e IgG₁.

Por otra parte, Guilloteau et al. (2006) han estudiado la inmunogenicidad de las mutantes *CGV26* y *CGV2631* de *B. melitensis* Rev 1, comparados con la cepa parental de Rev 1 en ovejas, a una dosis de 1×10^9 UFC/mL, por dos vías de administración: subcutánea y conjuntival, en el que la respuesta humoral se evaluó por medio de la prueba de ELISA indirecta, para detectar anticuerpos tipo IgG, donde los anticuerpos fueron significativamente más altos y persistentes por ambas mutantes así como la Rev 1, en los animales inoculados por vía subcutánea (día 7 al 182); en comparación a nuestros resultados, se evaluó la respuesta serológica, empleando la prueba de tarjeta al 3%, donde el grupo vacunado con la cepa mutante $\Delta eryCD$ mostró aglutinaciones más fuertes y persistentes en la prueba detectándose desde el día 7 al 121, viendo que los resultados son similares a los mencionados. Sin embargo, para el grupo vacunado por Rev 1 se presentó una respuesta muy baja y poco persistente teniendo para el día 7 solo una cabra con anticuerpos vacunales; pero para el día 15, 7 cabras fueron positivas a la prueba de tarjeta, en el día 21 solo 3 cabras presentaron anticuerpos vacunales y después para el día 30 solo una cabra, a partir del día 45 hasta el día 90 todas las cabras vacunadas con Rev 1 no presentaron anticuerpos vacunales, deduciendo que fue por la dosis encontrada en la vacuna Rev 1 de nuestro experimento que fue de 1×10^3 UFC/mL, a diferencia de la cepa mutante $\Delta eryCD$ en el que su dosis fue 1×10^6 UFC/mL.

Fue posible la diferenciación entre las cabras vacunadas e infectadas post vacunación, empleando la prueba de IDR usando el HN como antígeno (Díaz-Aparicio et al., 1993). Al inicio del estudio, una de las cabras del grupo $\Delta eryCD$ dio positiva a IDR, y negativa a la prueba de tarjeta al 3%. Sin embargo esta cabra quedó gestante y se mantuvo hasta el desafío experimental, además no presentó aborto. Díaz-Aparicio (2013), hace referencia en que las bacterias persisten sin inducir una respuesta inmunitaria detectable, y los animales que los padecen son portadores silenciosos de la enfermedad.

Estudios con respecto a la protección conferida por las vacunas contra el aborto y la colonización. Edmonds et al. (2002), evaluaron la mutante de *B. melitensis* $\Delta omp25$ comparada con Rev 1, en cabras gestantes frente al desafío experimental, donde la cepa mutante y Rev 1 son protectoras hacia el aborto, encontrando la misma relación con nuestros resultados en ambos grupos. Con respecto a la infección de $\Delta omp25$ y Rev 1, un cabrito de cada grupo vacunado fue infectado por cada una de estas cepas, mientras que en nuestro trabajo, en el grupo vacunado con $\Delta eryCD$, una cabra se infectó con la cepa mutante y no causo abortos. Mientras que el grupo vacunado con Rev 1 se obtuvo el aislado de *B. melitensis* 16 M y la cepa Rev1.

En otro estudio, Phillips et al. (1997) evaluaron una mutante con requerimiento de alta temperatura A (*htrA*) de *B. melitensis*, en donde determinaron la eficacia de la cepa mutante y Rev 1 en cabras gestantes, desafiadas a los 110 días de gestación con *B. melitensis* 16M, donde 7 de 10 animales del grupo control abortaron. Mientras que ninguna cabra vacunada con la cepa mutante *htrA* y Rev 1 abortaron, coincidiendo aquí con el grupo $\Delta eryCD$ y Rev 1 de nuestro experimento. Por lo tanto, *B. melitensis* 16M fue recuperada de todo el grupo de animales vacunados con la cepa mutante *htrA*, así como el grupo control, en cambio el grupo vacunado con $\Delta eryCD$ solo fue recuperada la misma cepa ($\Delta eryCD$), mientras del grupo vacunado con Rev 1 la cepa de desafío fue recuperada en un 25% (2 animales de un grupo de 8), reduciéndose el grado de colonización en la cepa de desafío a una cabra de nuestro grupo vacunado con la Rev 1.

En la búsqueda de obtener inmunógenos seguros y que protejan contra *B. melitensis*, el grupo de Thomas A. Ficht; (Kahl-McDonagh et al. 2006) evaluaron en cabras gestantes diferentes cepas mutantes, como candidatos a ser inmunógenos *BM Δ asp24*, *BM Δ cydBA* y *BM Δ virB2*, determinando la protección conferida contra la cepa de desafío (16 M). Se concluyó que *BM Δ asp24* y *BM Δ virB2* fueron consideradas como vacunas seguras en el

modelo de cabras gestantes, porque no se presentó aborto y colonización en tejidos fetales y nódulos linfáticos. Indicando que *BMΔasp24* fue más efectiva que *BMΔvirB2* contra el desafío experimental. Por lo que a diferencia con nuestra cepa mutante *ΔeryCD* no hubo abortos, en cambio con los resultados realizados por Kahtl-McDonagh et al. (2006), la colonización de *ΔeryCD* fue desarrollada en una cabra siendo diferente en cuanto al grado de colonización.

Por lo tanto, llama la atención los sitios de colonización de cada una de las cepas (*ΔeryCD* y Rev1); porque es destacable que la cepa mutante *ΔeryCD* no colonizó en el aparato reproductor, aun con la presencia de eritritol. Smith & Ficht (1990), hacen referencia que los sitios ricos en eritritol atraen la colonización de *Brucella* spp., pues es de esperarse que la cepa Rev 1 quien posee los genes favorecen tanto al tropismo como la utilización del eritritol y los aproveche.

Los genes (*eryCD*) del operón del eritritol son responsables del catabolismo de este azúcar para beneficio de la bacteria como lo indica Sangari et al., (1994); por lo que la delección de éstos, da como resultado la reducción de la colonización de *Brucella* en nichos, donde la abundancia de este azúcar es mayor. Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que la interrupción de los genes mencionados está relacionada con la ausencia de tropismo de la bacteria hacia lugares ricos en eritritol, así como en los trabajos realizados por Martínez-Chavarría et al., (2006); Martínez-Herrera et al., (2012).

En cuanto a la respuesta inmune y la cuantificación de Interleucinas, la obtención de los PBMC es importante para la expresión de citocinas a partir de células polimorfonucleares, en su mayor caso leucocitos, obtenidos de los animales experimentalmente inmunizados con la cepa mutante *ΔeryCD*, Rev1 y grupo control (SSF) evaluando su perfil de citocinas Th1 y Th2. Se ha demostrado que en varios laboratorios, utilizan la cuantificación relativa de citocinas para la evaluación de la respuesta inmune celular, la que se aplica

cuando desean evaluar los cambios en la expresión de genes en distintos estados fisiológicos. Estos cambios se basan en los niveles de ARNm del gen blanco comparados con un gen de referencia (gen *housekeeping*) (Tamay de Dios et al., 2013).

La qPCR para amplificar productos de cDNA a partir de ARNm por medio de la retro transcriptasa, fue la forma de comenzar la expresión de genes y así obtener el perfil de la respuesta inmune celular Th1, mediante la obtención de (PBMC) guiado por trabajos ya descritos cuantificando el perfil de citocinas en varios modelos de animales (Chamizo et al. 2005; Saldarriaga et al., 2006; Antunes et al., 2013).

Las diferentes vacunas que actualmente existen, inducen diversos grados de protección, pero cada una de ellas posee una o más desventajas, que van desde una baja capacidad para inducir un nivel adecuado de inmunidad, hasta interferencias en el diagnóstico que se utiliza en el control de la enfermedad.

Recientemente se están creando mutantes atenuadas como *B. melitensis* vjbr::Tn5 (BMEII1116) del grupo de investigación de Arenas-Gamboa et al. (2008) que generan protección e inmunogenicidad en ratones y cabras frente al desafío experimental, donde una cepa mutante encapsulada muestra una inducción elevada de IgG. La secreción de citocinas fue a partir de células de bazo de ratón, vacunados con la cepa encapsulada vjbrR::Tn5 en que se reveló una secreción de IFN- γ e IL12, mientras que no hubo expresión de las citocinas de tipo Th2 como IL4 a los 30 días postvacunación, sugiriendo una inducción tipo Th1. En comparación con nuestro experimento, se empleó la cuantificación de citocinas en la que resultó una ligera expresión de IFN- γ e IL12.

Por otro lado, Zhang et al. (2014), demostraron que la cepa mutante Δ ery de *B. abortus* 2308 tiene una protección significativa en ratones (BALB/c), ya que se induce IFN- γ a los 70 días post vacunación evaluado por ELISA,

teniendo similitud a la cepa mutante $\Delta eryCD$ de *B. melitensis* Rev 1 que también induce IFN- γ pero en el modelo cabra detectándose por qPCR a los 5 días post vacunación. En particular, una respuesta tipo Th1 caracterizada por IFN- γ que en este caso fue secretada por la cepa mutante $\Delta eryCD$, se puede inferir a que está asociada a una protección hacia *Brucella* spp. Sin embargo, Golding et al. (2001) mencionan que una secreción de IFN- γ por una vacuna viva atenuada es la mejor respuesta estimulada que se puede dar en contra *Brucella* spp.

Las citocinas evaluadas en el presente trabajo son bien conocidas por ser reguladas transcripcionalmente, por lo que la medición del índice de expresión de ARNm es un enfoque válido. Además, los reactivos de anticuerpos no están fácilmente disponibles para la mayoría de las citocinas caprinas, sin embargo la evaluación del ARNm es el único enfoque que pudo ser utilizado.

En el estudio realizado por Antunes et al. (2013), evalúan la respuesta inmune ocasionada por una infección experimental por *B. ovis* en carneros, determinando citocinas pro y anti – inflamatorias por qPCR en tejidos reproductivos y no reproductivos, desde el 30 al 240 días post infección, realizando la cuantificación de citocinas como IL6, IL1- B, IL1 α , TNF- α , IL12 e IFN- γ en la fase aguda (día 30 al 60) la respuesta inmune fue notable demostrando la mayor expresión de estos genes en varios tejidos reproductivos. Por lo tanto, en la fase crónica (día 120 al 240) TNF- α e IL6 fue persistente, aquí hacen referencia que la expresión de citocinas en esté experimento está asociado con la activación de macrófagos. En comparación con nuestro trabajo fue que nosotros evaluamos que tipo de respuesta desencadenaba la cepa mutante $\Delta eryCD$ como vacuna, en comparación con Rev 1, donde el resultado obtenido fue que la cepa mutante $\Delta eryCD$ induce TNF- α , IL12 e IFN- γ desde el día 5 hasta el 13, estando más persistente TNF- α de acuerdo a la cuantificación.

La respuesta celular y su detección por qPCR también ha sido evaluada por Saldarriaga et al. (2006) en el modelo canino, cuantificando los niveles de citocinas (Th1 y Th2) a partir de PBMC, usando una vacuna de ADN anti-*Leishmania*, donde la vacunación intramuscular induce la secreción de IFN- γ desde las 6 horas hasta las 48 horas post vacunación, por tal modo en nuestro experimento la evaluación de citocinas se cuantificó de igual manera expresando los niveles de ARNm a partir de PBMC, pero los tiempos empleados fueron diferentes ya que nosotros utilizamos días para la evaluación de la respuesta inmune y la vía de administración fue subcutánea, despertando de igual forma la secreción de IFN- γ al igual que una vía intramuscular. En relación a IL12, IL4 e IL10 solo mencionan que hubo una expresión significativa en las mismas horas indicando que hubo una amplificación lineal. En nuestro experimento se infiere a que IL12 se induce a tal grado que despierte IFN- γ y que IL4 e IL10 tiende a dar a origen al desarrollo de anticuerpos.

Así mismo, Warford et al. (2003), hacen referencia que la producción de IL12 es importante porque su expresión regula la respuesta inmune innata, a la vez induce IFN- γ y así como la activación de células dendríticas (CD) y macrófagos. Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente trabajo, la expresión de IL12 estuvo a la par con la expresión de IFN- γ , demostrando que en base a la expresión de IL12, hubo secreción de IFN- γ .

Con respecto a la expresión de IL4 en el presente trabajo, se puede coincidir con lo mencionado por Carvalho et al. (2002), en que IL4 es secretada por las células T CD4+ que a la vez son esenciales para el desarrollo de CD8+. En la que se demuestra que la IL4 es un mediador entre CD4/CD8 que conduce al desarrollo de la inmunidad contra un patógeno infeccioso.

Sin embargo, en nuestro experimento la expresión de IFN- γ fue descendiendo en los días 13 y 15 post vacunación, lo cual Fernandes & Baldwin (1995), hacen referencia que en algunas inmunizaciones en ratones con *B.*

abortus, se induce un incremento simultáneo de la expresión de genes de IL-10 y de IFN- γ en células TCD4+, sugiriendo que en la respuesta inmune primaria en ambos patrones de respuesta de citocinas son producidos.

Golding et al. (2001), hacen referencia de que la IL-10, puede ser producida por linfocitos CD4+, macrófagos activados y algunas poblaciones de células B, en el que pueden inhibir la proliferación de citocinas Th1, llevando a la pobre capacidad de presentar antígenos y la secreción de IFN- γ , lo que probablemente causó que está citocina descendiera en los días 11 y 13, de igual forma IL10 está involucrada en la regulación de IL12 por los macrófagos y las células dendríticas activadas, teniendo similitud con su expresión en el día 11, donde IL12 ya no fue detectable en los grupos vacunados.

12. CONCLUSIONES

1. La cepa mutante $\Delta ery-CD$ indujo una respuesta humoral, por un periodo más largo que la cepa vacunal *B. melitensis* Rev 1.
2. La cepa mutante $\Delta ery-CD$, desencadena una aceptable respuesta inmune celular.
3. Se demostró que la cepa mutante $\Delta ery-CD$ de *B. melitensis* Rev1, induce una protección aceptable frente al aborto, desafiando experimentalmente con *B. melitensis* 16M.
4. La cepa mutante $\Delta ery-CD$ de *B. melitensis* Rev 1, posee un menor grado de colonización en órganos reproductores ricos en eritritol, que la cepa vacunal Rev 1.
5. Nuestra cepa mutante es un buen candidato vacunal, ya que se comporta como una vacuna protectora al aborto y estimuladora de una respuesta inmune celular.

13. ANEXO

Prueba de Inmunodifusión Radial

- Obtención de Células

1. Se preparó el inóculo de 48 horas (36-37°C) de *B. melitensis* 16M, en un tubo con tapón de rosca, en agar papa .
2. Trabajando en una campana de bioseguridad, se procedió a añadir 4 ml de solución salina estéril al tubo, para posteriormente resuspender las células con una pipeta.
3. Las células se incubaron en un agitador orbital a 37°C durante 48 h a 180-200 rpm en un matraz de 2 litros, con 800 ml de caldo tripticasa soya (TSB).
4. Las células se centrifugaron en tubos BD Falcon de 50 ml a 7500 xg por 15 minutos, la pastilla se volvió a resuspender para después de nuevo centrifugarse a 7500 xg por 15 minutos, para finalmente decantar el sobrenadante.

- Obtención de Hapteno Nativo

1. Las células se resuspendieron con 200 µl de PBS 1X en tubos de plástico cónicos de 50 ml y se inactivaron en la autoclave a 120°C por 30 minutos.
2. Los tubos se dejaron enfriar para retirar los restos celulares, centrifugando a 1200 xg por 30 minutos.
3. El sobrenadante se precipitó con tres volúmenes de etanol frío (4°C), durante 24 horas en agitación magnética.
4. Este sobrenadante se colocó en un tubo de plástico cónico de 50 ml y se centrifugó a 500 xg por 30 minutos, conservando el sedimento (primer precipitado). A este primer precipitado se le agregaron tres volúmenes de etanol, se dejó a -20 °C toda la noche en agitación.
5. A la pastilla se le agregaron 5 ml de agua destilada estéril, resuspendiendo lentamente.

6. Se cortó un pedazo de membrana de celulosa que se enjuagó con agua destilada estéril. La membrana se amarró con un hilo para convertirla en una bolsa, y colocándose en la membrana los 5 ml, colocándola en diálisis con abundante agua durante toda la noche en refrigeración. Posteriormente el segundo precipitado ya dializado, se colocó en un tubo de plástico cónico de 50 ml que se centrifugó por 500 xg por 30 min.
7. El sobrenadante se decantó y se reconstituyó con 2 ml de agua estéril.

El Primer precipitado contiene proteínas y LPS, además de una pequeña cantidad de Hapteno Nativo y puede emplearse para la Inmunodifusión doble en gel.

El segundo precipitado contiene principalmente el Hapteno Nativo y una pequeña cantidad de LPS y se utiliza como antígeno en la inmunodifusión radial.

Preparación de las soluciones

Solución A: Buffer de Glicina

1. Glicina (Glucosada) 7.13 gramos
2. Cloruro de Sodio 5.75 gramos
3. Agua destilada 450 ml

Se llevó el pH a 7.8, se aforó con agua destilada hasta 500 ml

Solución B (Agarosa)

1. Agarosa (pureza inmunoelectroforesis) 0.8 g
2. Azida de sodio 50 mg
3. Agua destilada 50 ml

Se calentó el agua añadiendo azida y la agarosa agitando circularmente en baño María, hasta que quedó transparente y sin grumos.

La preparación del gel fue suficiente para 3 placas (3 ml/placa), los cálculos son para 20 µg de HN/ml como concentración final.

- Se disolvió 1 gr de NaCl en 5 ml de solución A.

- Se añadieron 300 μ l del Segundo precipitado a los 5 ml de la solución A más NaCl y se mezclaron.
- En un horno de microondas se calentó la mezcla anterior.
- Se agregaron 5 ml de solución B, previamente fundida y mezclada.
- Se vertió la mezcla en las placas con un grosor aproximado de 2.5 mm.
- Las placas se dejaron solidificar por 15 min.
- Se perforaron pozos sobre el gel con un sacabocados, a una distancia mínima de 4 mm entre ellos y se extrajo el gel con una aguja.
- Se llenaron los pozos con 15 ml de suero y las placas se incubaron en un recipiente con algodón húmedo durante 24 horas en temperatura ambiente.

14. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, L. G. (2002). The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the *Brucella* genome. *Vet Microbiol*, 90(1-4), 553-561.
- Alton, G. G. (1987). Control of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats--a review. *Trop Anim Health Prod*, 19(2), 65-74.
- Alton, G. G., Jones, L. M., Garcia-Carrillo, C., & Trenchi, A. (1972). *Brucella melitensis* Rev. 1 and *Brucella abortus* 45-20 vaccines in goats: immunity. *Am J Vet Res*, 33(9), 1747-1751.
- Alva-Pérez, J. (2014). *Virulencia e Inmunogenicidad de la cepa mutante invA de Brucella melitensis*. (Tesis de Doctorado), UNAM, México, D.F.
- Anderson, J. D. , & Smith, H. (1965). The Metabolism of Erythritol by *Brucella abortus*. *J Gen Microbiol*, 38, 109-124.
- Antunes, J. M., Allendorf, S. D., Appolinario, C. M., Cagnini, D. Q., Figueiredo, P. R., Junior, J. B., . . . Megid, J. (2013). Rough virulent strain of *Brucella ovis* induces pro- and anti-inflammatory cytokines in reproductive tissues in experimentally infected rams. *Vet Microbiol*, 161(3-4), 339-343. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.07.024
- Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., Briones, G., Ciocchini, A. E., Ugalde, R., . . . Gorvel, J. P. (2005). Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol*, 6(6), 618-625. doi: 10.1038/ni1202
- Baldwin, C. L. and Goenka, R. (2006). Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? *Crit Rev Immunol*, 26(5), 407-442.
- Banai, M. (2002). Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine: laboratory aspects and field observations. *Vet Microbiol*, 90(1-4), 497-519.
- Barbier, Collard, F., Zuniga-Ripa, A., Moriyon, I., Godard, T., Becker, J., . . . Letesson, J. J. (2014). Erythritol feeds the pentose phosphate pathway via three new isomerases leading to D-erythrose-4-phosphate in *Brucella*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(50), 17815-17820. doi: 10.1073/pnas.1414622111
- Barbier, T., Nicolas, C. and Letesson, J. J. (2011). *Brucella* adaptation and survival at the crossroad of metabolism and virulence. *FEBS Lett*, 585(19), 2929-2934. doi: 10.1016/j.febslet.2011.08.011
- Bhagwat, A. A., & Mithofer, A. Pfeffer, P. E., Kraus, C., Spickers, N., Hotchkiss, A., Ebel, J. and Keister, D. L. (1999). Further studies of the role of cyclic beta-glucans in symbiosis. An NdvC mutant of *Bradyrhizobium japonicum* synthesizes cyclodecakis-(1-->3)-beta-glucosyl. *Plant Physiol*, 119(3), 1057-1064.
- Blasco, J. M. (1997). A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev Vet Med*, 31(3-4), 275-283.

- Blasco, J. M. (2006). Existing and future vaccines against brucellosis in small ruminants. *Small Rumin Res*, 62(1-4), 33-37.
- Burkhardt, S., Jimenez de Bagues, M. P., Liautard, J. P. and Kohler, S. (2005). Analysis of the behavior of *eryC* mutants of *Brucella suis* attenuated in macrophages. *Infect Immun*, 73(10), 6782-6790. doi: 10.1128/IAI.73.10.6782-6790.2005
- Carvalho, L. H., Sano, G., Hafalla, J. C., Morrot, A., Curotto de Lafaille, M. A., & Zavala, F. (2002). IL-4-secreting CD4+ T cells are crucial to the development of CD8+ T-cell responses against malaria liver stages. *Nat Med*, 8(2), 166-170. doi: 10.1038/nm0202-166
- Carvalho-Neta, A. V., Mol, J. P., Xavier, M. N., Paixao, T. A., Lage, A. P., & Santos, R. L. (2010). Pathogenesis of bovine brucellosis. *Vet J*, 184(2), 146-155. doi: 10.1016/j.tvjl.2009.04.010
- Cassataro, J., Velikovsky, C. A., Bruno, L., Estein, S. M., de la Barrera, S., Bowden, R., . . . Giambartolomei, G. H. (2007). Improved immunogenicity of a vaccination regimen combining a DNA vaccine encoding *Brucella melitensis* outer membrane protein 31 (Omp31) and recombinant Omp31 boosting. *Clin Vaccine Immunol*, 14(7), 869-874. doi: 10.1128/CVI.00472-06
- Castro, H.A., Gonzalez, M. I., & Prat, I. (2005). Brucellosis: A practical review. *Acta Bioquim Clin Latinoam*, 39(2), 203-216.
- Chamizo, C., Moreno, J., & Alvar, J. (2005). Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 103(1-2), 67-75. doi: 10.1016/j.vetimm.2004.08.010
- Cloekaert, A., Vizcaino, N., Paquet, J. Y., Bowden, R. A., & Elzer, P. H. (2002). Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Vet Microbiol*, 90(1-4), 229-247.
- Delrue, R. M., Lestrade, P., Tibor, A., Letesson, J. J. and De Bolle, X. (2004). *Brucella* pathogenesis, genes identified from random large-scale screens. *FEMS Microbiol Lett*, 231(1), 1-12.
- Dermine, J. F., Duclos, S., Garin, J., St-Louis, F., Rea, S., Parton, R. G. and Desjardins, M. (2001). Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *J Biol Chem*, 276(21), 18507-18512. doi: 10.1074/jbc.M101113200
- Detilleux, P. G., Deyoe, B. L., & Cheville, N. F. (1990). Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. *Infect Immun*, 58(7), 2320-2328.
- Díaz-Aparicio, E. (2013). Epidemiología de la brucelosis causada por *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus* en animales domésticos. *Rev. sci. tech. Off. inte. Epiz*, 32 (1), 43-51.
- Díaz-Aparicio, E., Aragon, V., Marin, C., Alonso, B., Font, M., Moreno, E., . . . Moriyon, I. (1993). Comparative analysis of *Brucella* serotype A and M and *Yersinia enterocolitica* O:9 polysaccharides for serological diagnosis of brucellosis in cattle, sheep, and goats. *J Clin Microbiol*, 31(12), 3136-3141.

- Díaz-Aparicio, E., Hernandez, L., & Suarez-Guemes, F. (2004). Protection against brucellosis in goats, five years after vaccination with reduced-dose *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine. *Trop Anim Health Prod*, 36(2), 117-121.
- Díaz-Aparicio, E., Marin, C., Alonso-Urmeneta, B., Aragon, V. Perez-Ortiz, S., Pardo, M., Blasco, J. M., Diaz, R. and Moriyon, I. (1994). Evaluation of serological tests for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats. *J Clin Microbiol*, 32(5), 1159-1165.
- Edmonds, M. D., Cloeckert, A., Hagius, S. D. , Samartino, L. E., Fulton, W. T., Walker, J. V., . . . Elzer, P. H. (2002). Pathogenicity and protective activity in pregnant goats of a *Brucella melitensis* Deltaomp25 deletion mutant. *Res Vet Sci*, 72(3), 235-239. doi: 10.1053/rvsc.2002.0555
- Franco, M. P., Mulder, M., Gilman, R. H., & Smits, H. L. (2007). Human brucellosis. *Lancet Infect Dis*, 7(12), 775-786. doi: 10.1016/S1473-3099(07)70286-4
- García-Samartino, C. (2010). *Interacciones de Brucella abortus con la inmunidad innata del sistema nervioso central como determinante de patogenesis de la neurobrucelosis*. (Tesis de Doctorado), Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Golding, B., Scott, D. E., Scharf, O., Huang, L. Y., Zaitseva, M., Lapham, C., . . . Golding, H. (2001). Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infect*, 3(1), 43-48.
- Golding, B., Scott, D. E., Scharf, O., Huang, L. Y., Zaitseva, M., Lapham, C., Eller, N. and Golding, H. (2001). Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infect*, 3(1), 43-48.
- Guilloteau, L. A. , Laroucau, K., Olivier, M., Grillo, M. J., Marin, C. M., Verger, J. M. , & Blasco, J. M. (2006). Residual virulence and immunogenicity of CGV26 and CGV2631 *B. melitensis* Rev. 1 deletion mutant strains in sheep after subcutaneous or conjunctival vaccination. *Vaccine*, 24(17), 3461-3468. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.02.007
- Hernandez-Andrade, L. , & Díaz-Aparicio, E. (2001). Prueba de Inmunodifusión radial con hapteno nativo para el diagnóstico de brucelosis. In E. Diaz-Aparicio, L. Hernández-Andrade, G. Valero- Elizondo, B. Arellano-Reynoso (Ed.), *Diagnóstico de Brucelosis Animal* (pp. 100-102). Mexico, DF: INIFAP.
- Hernández-Castro, R., Martínez Martínez, O. L., Suárez Güemes, F. , Díaz Aparicio, E. , de la Garza, M. , García-Lobo, J. M., & Sangari, F. J. . (2007). *Análisis del gen bra0173 de B. suis y BMEI0216 de B. melitensis*. Paper presented at the IV Foro Nacional de Brucelosis, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Ciudad Universitaria; D.F. .
- Jain, N. , Boyle, S. M. , & Sriranganathan, N. (2012). Effect of exogenous erythritol on growth and survival of *Brucella*. *Vet Microbiol*, 160(3-4), 513-516. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.06.014
- Jain, N., Boyle, S. M. and Sriranganathan, N. (2012). Effect of exogenous erythritol on growth and survival of *Brucella*. *Vet Microbiol*, 160(3-4), 513-516. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.06.014

- Jones, S. M. , & Winter, A. J. (1992). Survival of virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* in normal and gamma interferon-activated murine peritoneal macrophages. *Infect Immun*, 60(7), 3011-3014.
- Kahl-McDonagh, M. M., Elzer, P. H., Hagius, S. D., Walker, J. V., Perry, Q. L., Seabury, C. M., . . . Ficht, T. A. (2006). Evaluation of novel *Brucella melitensis* unmarked deletion mutants for safety and efficacy in the goat model of brucellosis. *Vaccine*, 24(24), 5169-5177. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.04.005
- Ko, J. and Splitter, G. A. (2003). Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev*, 16(1), 65-78.
- Lacerda, T. L., Salcedo, S. P. and Gorvel, J. P. (2013). *Brucella* T4SS: the VIP pass inside host cells. *Curr Opin Microbiol*, 16(1), 45-51. doi: 10.1016/j.mib.2012.11.005
- Mancera-Martínez, A., Díaz-Aparicio, E., Vazquez-Navarrete, J., Velazquez-Quezada, F., Suarez-Guemez, F., & Flores-Castro, R. (1992). Vacunacion de cabras con la cepa REV-1 de *Brucella melitensis* en diferentes dosis: Evaluacion serologica y desafio. *Veterinaria Mexico*, 23(2).
- Martínez-Chavarría, L.C. , Verdugo-Rodríguez, A., & Hernandez-Castro, R. . (2006). Identificación de la cepa vacunal *Brucella abortus* S19 en muestras de leche de vaca. *Veterinaria Mexico*, 37(4), 479-486.
- Martínez-Herrera, I. D., Padron-Tello, O., Peniche-Cardena, A., Villagomez-Cortes, J. A., Pulido-Camarillo, E., Lopez-Merino, A., . . . Flores-Castro, R. (2012). Identification of immunotolerance in the progeny of cows infected with *Brucella abortus*. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 6(29), 5841-5846.
- Martirosyan, A. and Gorvel, J. P. (2013). *Brucella* evasion of adaptive immunity. *Future Microbiol*, 8(2), 147-154. doi: 10.2217/fmb.12.140
- Martirosyan, A., Moreno, E. and Gorvel, J. P. (2011). An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. *Immunol Rev*, 240(1), 211-234. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00982.x
- Moreno, E. , Jones, L. M. , & Berman, D. T. (1984). Immunochemical characterization of rough *Brucella* lipopolysaccharides. *Infect Immun*, 43(3), 779-782.
- Moreno, E. , Speth, S. L., Jones, L. M., & Berman, D. T. (1981). Immunochemical characterization of *Brucella* lipopolysaccharides and polysaccharides. *Infect Immun*, 31(1), 214-222.
- Moriyon, I. , & Lopez-Goñi, I. (2000). Estructura, genética y fisiología del genero *Brucella* *Diagnostico de brucelosis animal* (pp. 9-15). Mexico, DF.: INIFAP.
- Murray, P. R. , Rosenthal, K. S. , & Pfaller, M. A. . (2009). *Medical Microbiology* (Sixth ed.). Philadelphia, USA: Elsevier Inc. .
- NOM-041-ZOO-1995. Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales. *Diario Oficial de la Federacion, Mexico*, 7 de noviembre de 1997.
- Palomares Resendiz, E. G. . (2010). *Estudio de la supervivencia intracelular de mutantes virB de Brucella canis, y determinación de su capacidad como*

- inmunógenos*. (Doctor en Ciencias), Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico D.F.
- Petersen, E., Rajashekara, G., Sanakkayala, N., Eskra, L., Harms, J., & Splitter, G. (2013). Erythritol triggers expression of virulence traits in *Brucella melitensis*. *Microbes Infect*, 15(6-7), 440-449. doi: 10.1016/j.micinf.2013.02.002
- Phillips, R. W. , Elzer, P. H., Robertson, G. T., Hagius, S. D., Walker, J. V., Fatemi, M. B., . . . Roop, R. M. (1997). A *Brucella melitensis* high-temperature-requirement A (htrA) deletion mutant is attenuated in goats and protects against abortion. *Res Vet Sci*, 63(2), 165-167.
- Plommet, M. (1987). Brucellosis and immunity: humoral and cellular components in mice. *Ann Inst Pasteur Microbiol*, 138(1), 105-110.
- Rambow-Larsen, A. A., Rajashekara, G., Petersen, E. and Splitter, G. (2008). Putative quorum-sensing regulator BlxR of *Brucella melitensis* regulates virulence factors including the type IV secretion system and flagella. *J Bacteriol*, 190(9), 3274-3282. doi: 10.1128/JB.01915-07
- Rivers, R., Andrews, E., González-Smith, A., Donoso, G. and Oñate, A. (2006). *Brucella abortus*: inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos. *Arch Med Vet*, 38(1), 7-18.
- Rodriguez, M. C., Viadas, C., Seoane, A., Sangari, F. J., López-Goni, I. and Garcia-Lobo, J. M. (2012). Evaluation of the effects of erythritol on gene expression in *Brucella abortus*. *PLoS One*, 7(12), e50876. doi: 10.1371/journal.pone.0050876
- Saldarriaga, O. A. , Travi, B. L., & Melby, P. C. (2006). Quantification of canine cytokines using real time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Biomedica*, 26 Suppl 1, 254-263.
- Salhi, I. , Boigegrain, R. A., Machold, J., Weise, C., Cloeckaert, A. , & Rouot, B. (2003). Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. *Infect Immun*, 71(8), 4326-4332.
- Sangari, F. and Aguero, J. (1991). Mutagenesis of *Brucella abortus*: comparative efficiency of three transposon delivery systems. *Microb Pathog*, 11(6), 443-446.
- Sangari, F. J. , Garcia-Lobo, J. M., & Aguero, J. (1994). The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. *FEMS Microbiol Lett*, 121(3), 337-342.
- Sangari, F. J. and Aguero, J. (1996). Molecular basis of *Brucella* pathogenicity: an update. *Microbiologia*, 12(2), 207-218.
- Schurig, G. G., Sriranganathan, N., & Corbel, M. J. (2002). Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol*, 90(1-4), 479-496.
- Seleem, M. N., Boyle, S. M. and Sriranganathan, N. (2008). *Brucella*: a pathogen without classic virulence genes. *Vet Microbiol*, 129(1-2), 1-14. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.11.023
- Smith, L.D. , & Ficht, T.A. (1990). Pathogenesis of *Brucella*. *Critical Reviews in Microbiology*, 17(3), 209-230. doi: 10.3109/10408419009105726
- Sperry, J. F. and Robertson, D. C. (1975a). Erythritol catabolism by *Brucella abortus*. *J Bacteriol*, 121(2), 619-630.

- Sperry, J. F. and Robertson, D. C. (1975b). Inhibition of growth by erythritol catabolism in *Brucella abortus*. *J Bacteriol*, 124(1), 391-397.
- Stevens, M. G., Olsen, S. C. and Cheville, N. F. (1995). Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB51. *Vet Immunol Immunopathol*, 44(3-4), 223-235.
- Stevens, M.G., Olsen, S. C., Palmer, M.V. , & Cheville, N.F. (1997). *Brucella abortus* strain RB51: A New brucellosis vaccine for cattla. *Compend Cont Ed Pract Vet*, 19(6), 766-774.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo en tiempo real. *Tecnología en salud*, 2(2), 70-78.
- Turse, J. E., Pei, J., & Ficht, T. A. (2011). Lipopolysaccharide-Deficient *Brucella* Variants Arise Spontaneously during Infection. *Front Microbiol*, 2, 54. doi: 10.3389/fmicb.2011.00054
- Uzureau, S., Godefroid, M., Deschamps, C., Lemaire, J., De Bolle, X. and Letesson, J. J. (2007). Mutations of the quorum sensing-dependent regulator VjbR lead to drastic surface modifications in *Brucella melitensis*. *J Bacteriol*, 189(16), 6035-6047. doi: 10.1128/JB.00265-07
- Uzureau, S., Lemaire, J., Delaive, E., Dieu, M., Gaigneaux, A., Raes, M., De Bolle, X. and Letesson, J. J. (2010). Global analysis of quorum sensing targets in the intracellular pathogen *Brucella melitensis* 16 M. *J Proteome Res*, 9(6), 3200-3217. doi: 10.1021/pr100068p
- Villa, R. , Perea Marcell, Diaz-Aparicio, E., Hernández, A.L., Suárez-Guemes, F., & Soberón-Mobarak, A. (2008). Presencia de abortos y mortinatos en cabras inmunizadas contra brucelosis con las vacunas RB51, rfbK Y Rev1. *Técnica Pecuaria México*, 46(3), 249-258.
- von Barga, K., Gorvel, J. P. and Salcedo, S. P. (2012). Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS Microbiol Rev*, 36(3), 533-562. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00334.x
- Watford, W. T., Moriguchi, M., Morinobu, A., & O'Shea, J. J. (2003). The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14(5), 361-368.
- Weeks, J. N., Galindo, C. L., Drake, K. L., .Adams, L.G., Garner, H. R. and Ficht, T. A. (2010). *Brucella melitensis* VjbR and C12-HSL regulons: contributions of the N-dodecanoyl homoserine lactone signaling molecule and LuxR homologue VjbR to gene expression. *BMC Microbiol*, 10, 167. doi: 10.1186/1471-2180-10-167
- Wright, P. F., Tounkara, K., Lelenta, M. and Jeggo, M. H. (1997). International reference standards: antibody standards for the indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Rev Sci Tech*, 16(3), 824-832.
- Xavier, M. N., Paixão, T. A., den Hartigh, A. B., Tsolis , R. M. and Santos, R. L. (2010). Pathogenesis of *Brucella* spp. *The Open Veterinary Science Journal*, 4, 109-118.
- Zhang, J., Yin, S., Guo, F., Meng, R., Chen, C., Zhang, H., . . . Zhang, K. (2014). A potent *Brucella abortus* 2308 Deltaery live vaccine allows for the

differentiation between natural and vaccinated infection. *J Microbiol*, 52(8), 681-688. doi: 10.1007/s12275-014-3689-9