



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

**Facultad de Ciencias Biológicas – Programa de Magister en
Ciencias con mención Microbiología**

**“Rol de la proteína codificada por el marco de
lectura BAB2_0534 en la producción de melanina
como un nuevo factor de virulencia en *Brucella
abortus* 2308.”**

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias con mención
Microbiología

ROBERTO FELIPE COLOMA RIVERO

MARZO-2024

Concepción-Chile

Profesor Guía: Dr. Ángel Oñate Contreras

Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dr. Ángel Oñate Contreras
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dr. Patricio Godoy
Facultad de Medicina
Universidad Austral

Dr. Gerardo González Rocha
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Carlos Smith Gallardo
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción
Director de Programa

Dr. Gerardo González Rocha
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
<i>Brucella</i> y factores de virulencia.	8
Infección por <i>Brucella</i>	11
Eventos y tránsito a nivel intracelular.	13
Inmunidad frente a <i>Brucella</i>	17
Macrófagos y especies reactivas de oxígeno (ERDOS).....	19
Cambio metabólico en infección por <i>Brucella</i>	23
Melaninas y Lacasas: su participación en la evasión del sistema inmune	26
HIPOTESIS DE TRABAJO	40
OBJETIVOS	41
Objetivo General:	41
Objetivos específicos:	42
MATERIALES Y METODOS.	43
Animales	43
Líneas celulares	44
Cepas y condiciones de cultivo.	44
Análisis Bioinformático.	46
Construcción de mutante para el marco de lectura BAB2_0534 en <i>B. abortus</i> 2308.....	48
Curva de Crecimiento	50
Medición de la producción de biomasa	51

Ensayo de susceptibilidad al cobre.....	52
Sobrevida intracelular	53
Ensayo de colonización bacteriana en ratones BALB/c	54
Medición de especies reactivas del oxígeno (ERDOS)	54
Cuantificación de Lactato Intracelular	56
Medición de citocinas en células RAW 264.7	57
Producción de pigmento tipo melanina en <i>B. abortus</i> 2308 <i>in vitro</i>	58
Análisis por espectroscopia de infrarrojo (FTIR) de pigmento tipo melanina purificada desde cultivos bacterianos de estudio	59
Detección histológica de la producción de melanina en tejido infectado	61
Análisis Estadístico	63
RESULTADOS	64
Caracterización <i>in silico</i> de la proteína codificada en el marco de lectura abierto BAB2_0534 de <i>B. abortus</i> 2308	64
Interacción proteína-proteína del producto del gen BAB2_0534 de <i>B. abortus</i> 2308.....	67
Curva de crecimiento de diferentes cepas de <i>B. abortus</i>	70
Producción de biomasa.....	71
Tolerancia al cobre en <i>B. abortus</i> 2308.....	73
Supervivencia intracelular de <i>B. abortus</i> 2308 Δ BAB2_0534 en células fagocíticas profesionales y no profesionales	75
Supervivencia de <i>B. abortus</i> 2308 Δ BAB2_0534 en ratones BALB/c	77
Medición de especies reactivas de oxígeno.	79
Medición de Lactato en cultivo de macrófagos RAW 264.7	81
Medición de citoquinas IL-10, TNF- α e IL-4 en Macrófagos RAW 246.7.....	82
Cultivo de las cepas bacterianas en sustrato de L-DOPA para estudio de melanina	86
Resultado de espectros infrarrojo de pigmentos tipo melanina post extracción desde cultivos de <i>Brucella abortus</i> con diferentes sustratos.	88

Análisis histológico de órganos de ratones infectados con cepas <i>Brucella</i> en estudio para pesquisa de melanina.	95
DISCUSIÓN.	115
CONCLUSIÓN.	130
BIBLIOGRAFÍA.	131
ANEXOS	164
Anexo 1. Diseño esquema de plásmido pVB1 vector de inserto <i>BAB2_0534</i> presente en cepa <i>B. abortus</i> 2308 complementada.	164
Anexo 2	165
Protocolo modificado de extracción de melanina desde cultivos con diferentes sustratos precursores de melanina (Dopamina, L-DOPA y Acido Homogentísico HA).	165
2. Secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el marco de lectura <i>BAB2_0534</i> de <i>B. abortus</i> 2308 obtenido por plataforma UniProt (Q2YKW0_BRUA2).	166
Anexo 3	167
Tejidos BALB/c infectados con diferentes cepas de estudio de <i>Brucella</i> teñidos con técnica de Hematoxilina-Eosina.	167
Anexo 4	178
Alineamiento de secuencias de aminoácidos entre <i>Brucella abortus</i> 2308 (ORF <i>BAB2_0534</i>) y <i>Orobachtrum sp.</i>	178

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 2. DETERMINANTES DE VIRULENCIA DE <i>BRUCELLA</i> QUE INFLUYEN EN LA CAPACIDAD DE LOS MACRÓFAGOS PARA MODULAR LA RESPUESTA INMUNITARIA DEL HUÉSPED.	10
FIGURA 3 CONTRIBUCIONES DE LOS EFECTORES DEL T4SS, LA CADENA O DEL LPS, OMP22, OMP25D Y EL B-1,2-D-GLUCANO CÍCLICO (CBG) AL DESARROLLO DE LA VACUOLA REPLICATIVA DE <i>BRUCELLA</i> EN LOS MACRÓFAGOS DEL HUÉSPED.....	13
FIGURA 4. FUENTES DE ROS EN MACRÓFAGOS.	22
FIGURA 5. MODELO DE <i>B. ABORTUS</i> CÓMO INFLUYE EN UN CAMBIO METABÓLICO HACIA UN METABOLISMO SIMILAR AL DE WARBURG EN LAS CÉLULAS HUÉSPED.....	25
FIGURA 6. GRUPOS AROMÁTICOS SUSTRATO DE MELANINAS PRESENTES EN COMPLEJOS QUÍMICOS AROMÁTICOS EN LA MATERIA VIVA. A. GRUPO INDOL B. GRUPO FENOL.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
FIGURA 8. INTERACCIÓN ESTRECHA ENTRE NEUROTRANSMISORES Y LAS CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE.....	36
FIGURA 9. MODELADO DE LA PROTEÍNA OXIDASA DE COBRE MÚLTIPLE TIPO LACASA CODIFICADA EN EL ORF BAB2_0534 DE <i>B. ABORTUS</i>.....	66
FIGURA 10. INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA A NIVEL SUBCELULAR EN <i>B. ABORTUS</i> 2308.	69
FIGURA 11. CURVAS DE CRECIMIENTO DE CEPAS DE <i>B. ABORTUS</i>.	71
FIGURA 12. GRÁFICO DE EXPRESIÓN DE FORMACIÓN DE BIOMASA ADHERENTE.....	72
FIGURA 13. CURVAS DE CRECIMIENTO DE <i>BRUCELLA</i> EN MEDIO DE CULTIVO CON CUCL₂.	74
FIGURA 14. SUPERVIVENCIA INTRACELULAR DE <i>B. ABORTUS</i> Δ BAB2_0534 EN FAGOCITOS PROFESIONALES Y NO PROFESIONALES.	77

FIGURA 15. PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.	80
FIGURA 16. PRODUCCIÓN DE LACTATO INTRACELULAR EN MACRÓFAGOS RAW 246.7.	81
FIGURA 17. PRODUCCIÓN DE IL-10 <i>IN VITRO</i> POST SENSIBILIZACIÓN CON CEPAS DE ESTUDIO.	83
FIGURA 18. PRODUCCIÓN DE TNF-A <i>IN VITRO</i> POST SENSIBILIZACIÓN CON CEPAS DE ESTUDIO.	84
FIGURA 19. PRODUCCIÓN DE IL-4 <i>IN VITRO</i> POST SENSIBILIZACIÓN CON CEPAS DE ESTUDIO.	85
FIGURA 20. RESULTADOS DE CULTIVOS CON SUSTRATO DE L-DOPA.	87
FIGURA 21. CULTIVOS DE LAS CEPAS EN ESTUDIO CON SUSTRATOS PARA MELANINA.	87
FIGURA 22. CULTIVO DE <i>B. ABORTUS</i> 2308 Y CEPAS MUTANTES PARA BAB2_0534.	89
FIGURA 22. PERFIL DEL ESPECTRO INFRARROJO ESTÁNDAR DE MELANINA (EUMELANINA, M2649, SIGMA-ALDRICH).	91
FIGURA 23. PERFIL DEL ESPECTRO INFRARROJO OBTENIDO DESDE CULTIVO CON DOPAMINA (L-DOPA) COMO SUSTRATO.	91
FIGURA 24. PERFIL DEL ESPECTRO INFRARROJO OBTENIDO DESDE CULTIVO CON ÁCIDO HOMOGENTÍSICO (HA) COMO SUSTRATO.	92
FIGURA 25: PERFIL DEL ESPECTRO INFRARROJO OBTENIDO DESDE CULTIVO USANDO COMO SUSTRATO HA Y L-DOPA.	93
FIGURA 26. SUPERPOSICIÓN DE ESPECTROS DE INFRARROJO CON EL ESTÁNDAR DE MELANINA.	94
FIGURA 27 A. MUESTRA (10X) CONTROL DE HÍGADO BALB/C SANO.	96

FIGURA 27 B. MUESTRA (10X) CORTE DE HÍGADO BALB/C INFECTADO CON <i>B. ABORTUS</i> 2308 ΔBAB2_0534 (INFECTADA) HEMATOXILINA-EOSINA.....	99
FIGURA 27 C. MUESTRA (40X) CORTE DE HÍGADO BALB/C INFECTADO CON <i>B. ABORTUS</i> 2308.....	100
FIGURA 27 D. MUESTRA (10X) CORTE DE HÍGADO BALB/C INFECTADO CON <i>B. ABORTUS</i> ΔBAB2_0534 (PVB1- BAB2_0534). HEMATOXILINA EOSINA.	101
FIGURA 28 A1. MUESTRA (10X) CONTROL SANO.....	103
FIGURA 28 A2. MUESTRA (40X) CONTROL SANO.....	104
FIGURA 28 B1. MUESTRA (10X) INFECTADA <i>B. ABORTUS</i> 2308.	105
FIGURA 28 B1. MUESTRA (40X) INFECTADA <i>B. ABORTUS</i> 2308.	106
FIGURA 28 B1. MUESTRA (40X) INFECTADA <i>B. ABORTUS</i> Δ BAB2_0534.....	108
FIGURA 28 C1. MUESTRA (10X) INFECTADA <i>B. ABORTUS</i> 2308 ΔBAB2_0534.	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
FIGURA 28 C2. MUESTRA (40X) INFECTADA <i>B. ABORTUS</i> 2308 ΔBAB2_0534.	109
FIGURA 28 D1. MUESTRA (10X) INFECTADA <i>B. ABORTUS</i> ΔBAB2_0534 (PVB1- BAB2_0534).....	110
FIGURA 28 D2. MUESTRA (40X) INFECTADA <i>B. ABORTUS</i> ΔBAB2_0534 (PVB1- BAB2_0534).....	111
FIGURA 29 A1. MUESTRA (10X) INFECTADA <i>B. ABORTUS</i> 2308.....	112
FIGURA 29 A2. MUESTRA (10X) INFECTADA <i>B. ABORTUS</i> 2308.....	112
FIGURA 30 A1. MUESTRA (10X) CONTROL SANO.....	113
FIGURA 30 A2. MUESTRA (10X) INFECTADO CON <i>B. ABORTUS</i> 2308.....	113

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. BACTERIAS Y PLÁSMIDOS UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO. 45

TABLA 2. SECUENCIAS DE GENES Y DE PARTIDORES USADOS EN ESTE TRABAJO. 49

TABLA 3. COLONIZACIÓN DEL BAZO DE RATONES BALB/C CON *B. ABORTUS* DE TIPO SALVAJE 2308, *B. ABORTUS* 2308 Δ BAB2_0534 MUTANTE Y *B. ABORTUS* 2308 Δ BAB2_0534 (PVB1- BAB2_0534) COMPLEMENTADO..... 78

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

Brucella abortus es una bacteria Gram negativa facultativa e intracelular, causante de brucelosis bovina y humana, una enfermedad zoonótica que es responsable de pérdidas económicas considerables para los propietarios de animales con destino comercial. El proceso de infección de *Brucella* no está claro del todo, contemplando el alto número de rutas que tiene para infectar, establecer su nicho replicativo y evadir la respuesta inmune del hospedador, logrando sobrevivir a la acción de especies reactivas de oxígeno en células profesionales presentadoras de antígenos como macrófagos. Este mecanismo de evasión se presenta también en otros organismos de vida intracelular como *Cryptococcus neoformans*, una levadura que por acción de proteínas multi cobre oxidasa, como las lacasas forman pigmentos de melanina, ambos elementos considerados factores de virulencia. Las melaninas son compuestos químicos aromáticos coloreados con una alta carga negativa, presentes en diversos organismos tanto plantas, hongos y bacterias (*Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas* spp., *Bacillus subtilis*, etc); y participan en el mecanismo defensivo contra antibióticos y estrés oxidativo, atenuando la acción de células del sistema inmune y participando activamente, en ciertos casos; en el cambio de polaridad de los macrófagos a M2, y también en el cambio metabólico de ellos hacia una metabolismo de Warburg. *B. abortus*

posee múltiples factores de virulencia descritos, pero aún no están del todo claros. Este trabajo tiene como objetivo identificar la función de la proteína multi cobre oxidasa, codificada en el marco de lectura BAB2_0534 de *B. abortus* 2308; vincularla a procesos de crecimiento bacteriano, tolerancia al cobre y al estrés ambiental, siendo su producto génico un potencial factor de virulencia, así como también el pigmento melanina que se formaría como producto enzimático en presencia del sustrato L-DOPA. El producto génico de BAB2_0534 participaría tanto en la evasión de la respuesta inmune en células macrofágicas, como en el cambio de polaridad de macrófagos a M2.

ABSTRACT

Brucella abortus is a facultative, intracellular, gram-negative bacterium that causes bovine and human brucellosis, a zoonotic disease that is responsible for considerable economic losses for owners of commercial animals. The infection process of *Brucella* is not entirely clear, considering the high number of routes it has to infect, establish its replicative niche and evade the immune response of the host, managing to survive the action of reactive oxygen species in professional antigen-presenting cells such as macrophages. This evasion mechanism is also present in other organisms of intracellular life such as *Cryptococcus neoformans*, a yeast that by the action of multi-copper oxidase proteins, such as laccases, form melanin pigments, both elements considered virulence factors. Melanin are colored aromatic chemical compounds with a high negative charge, present in various organisms both plants, fungi and bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas* spp, *Bacillus subtilis*, etc); and participate in the defensive mechanism against antibiotics and oxidative stress, attenuating the action of immune system cells and actively participating, in certain cases, in the change of polarity of macrophages to M2, and also in the metabolic change of them to a Warburg metabolism. *B. abortus* has multiple virulence factors described, but they are

still not entirely clear. This work aims to identify the function of the multi-copper oxidase protein, encoded in the reading frame BAB2_0534 of *B. abortus* 2308; to link it to bacterial growth processes, tolerance to copper and environmental stress, being its gene product a potential virulence factor, as well as the melanin pigment that would be formed as an enzymatic product in the presence of the L-DOPA substrate. The gene product of BAB2_0534 would participate in the evasion of the immune response in macrophage cells, as well as in the change of polarity of macrophages to M2.

INTRODUCCIÓN

***Brucella* y brucelosis.**

Brucella está descrita como una bacteria Gram negativa facultativa e intracelular, causante de brucelosis bovina, una enfermedad zoonótica que es responsable de pérdidas económicas considerables para los propietarios de animales domesticados y puede afectar de forma grave a humanos (Gheibi y col., 2018). Los miembros del género bacteriano *Brucella* colonizan una variedad de mamíferos (Moreno y col., 2014; Olsen y col., 2014). También se han encontrado en reptiles (Soler-Lloréns y col., 2016; Eisenberg y col., 2012) y peces (Eisenberg y col., 2017; El-Tras y col., 2010). Actualmente hay 12 especies de *Brucella* reconocidas (Moreno y col., 2022), y aunque estas bacterias están muy relacionadas a nivel genético, muestran un grado notable de especificidad de huésped (**Figura 1**). Las especies de *Brucella* están estrechamente relacionadas y muestran un comportamiento patogénico muy similar, aunque varían en virulencia y afinidad con el hospedador (Von Bargen y col., 2015). Para los humanos, las especies más patógenas son *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* y *Brucella suis* (Atluri y col., 2011). Los análisis genómicos comparativos han proporcionado una imagen fascinante, de cómo evolucionaron estas bacterias a partir de una alfaproteobacteria

ancestral, para convertirse en patógenos adaptados al huésped, y varios estudios describen este camino evolutivo (Coloma-Rivero y col., 2021; Suárez- Esquivel y col., 2020; Wattam y col., 2014). Tomando en cuenta lo anterior existen hipótesis que proponen que el antepasado de *Brucella* era probablemente una bacteria de vida libre, con un cromosoma (Godfroid y col., 2017), que se convirtió en un parásito celular eucarionte con dos cromosomas separados, un cromosoma de gran tamaño y un plásmido más pequeño, en donde este último contendría genes accesorios ancestrales, adquiridos desde otros organismos, ya sea por islas genómicas, secuencias genómicas en tándem o enzimas que le permitieran protegerse de ambientes más hostiles, expresando proteínas responsables de la utilización de nutrientes derivados de plantas, o genes asociados a actividades de transporte y actividades metabólicas, similares a las de ciertas bacterias asociadas al suelo (Wattam y col., 2014). Dentro de este proceso evolutivo, fue común para *Brucella* adquirir diferentes fragmentos de ADN extraño por vía de transferencia horizontal, fragmentos que se distribuyen por todo el genoma y codifican varias proteínas, principalmente con función desconocida (Wattam y col., 2014). Esto permite hipotetizar que no sólo se comparten proteínas con funciones similares de otros microorganismos, sino que también las vías metabólicas de sobrevida son similares.

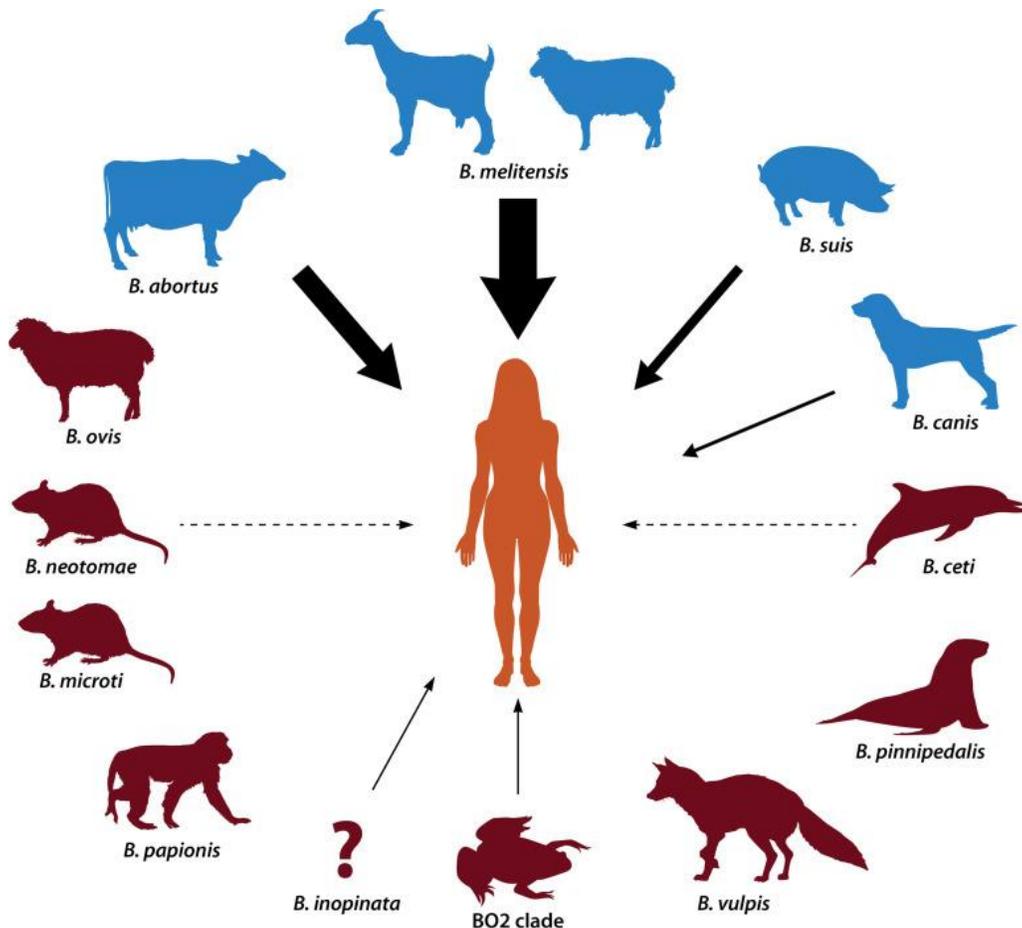


Figura 1. Huéspedes naturales y potencial zoonótico de las cepas de *Brucella*. Las especies de *Brucella* que se muestran en azul son patógenos zoonóticos reconocidos, y el grosor de las flechas sólidas representa la frecuencia relativa con la que estos huéspedes sirven como fuentes de infección humana. Las flechas discontinuas indican que estas cepas de *Brucella* han sido aisladas de enfermedades humanas, pero no se ha documentado la transmisión directa del huésped natural correspondiente a los humanos. El signo de interrogación indica que se desconoce el huésped natural de *B. inopinata*. (Roop y col., 2021)

***Brucella* y factores de virulencia.**

El proceso de infección por *Brucella* no está claro del todo, considerando el alto número de rutas que tiene para evadir la respuesta inmune del hospedero (De Figueiredo y col., 2015). Para esto *Brucella* utiliza diferentes factores de virulencia. Estos se definen como moléculas o mecanismos producidos por un patógeno, participando directamente en la capacidad infectiva e influyendo específicamente en las funciones del hospedador para permitir instalarse, crecer y dividirse. Esto aumenta su capacidad patogénica y les permite eventos tales como: colonización de un nicho en el hospedador, evasión y/o inhibición de la respuesta inmune del hospedador, entrada y salida desde las células y obtención de nutrientes (Wang y col., 2020).

Brucella no posee factores de virulencia clásicos, tales como: exotoxinas, citolisinas, exoenzimas, plásmidos, fimbrias y formas resistentes a los medicamentos (Ahmed y col., 2016). En *Brucella* los principales factores de virulencia son; su lipopolisacárido (LPS), el que se reconoce como “no convencional y no endotóxico” (Cardoso y col., 2006), condición dada entre otras características por el lípido A de *Brucella* que se presenta más largo (de hasta 28 carbonos), del común de otras bacterias; lo que lleva a la no detección por el receptor tipo toll cuatro (TLR4), reduciendo de esta forma sus

propiedades endotóxicas (Lapaque y col., 2006). Estas propiedades hacen que el LPS de *Brucella* sea un factor de virulencia importante para contrarrestar la fagocitosis y mejorar la supervivencia en macrófagos (Tian y col., 2014). Su sistema de secreción tipo cuatro (T4SS) y el sistema BvrR / BvrS, le permite a *Brucella* la interacción con la superficie de la célula hospedadora y la formación de una vacuola contenedora de *Brucella* (BCV) temprana, para su posterior interacción con el retículo endoplásmico (ER) donde las bacterias se multiplican (Glowaka y col., 2018).

La presencia de la proteína **flagelina** (FliC), que forma parte de la estructura del flagelo bacteriano, y que está presente en el genoma de *Brucella* aun cuando se ha descrito que *B. abortus* es una bacteria inmóvil (Abdallah y col., 2003). El flagelo bacteriano es una estructura compleja; que se asocia principalmente con bacterias Gram-negativas, es un órgano locomotor y consta de al menos tres elementos estructurales; el anillo MS (Motor Structure) formando el cuerpo basal, el gancho y el filamento; codificados por los genes *fliF*, *flgE* y genes *fliC* (flagelina) respectivamente entre otros (Macnab, 2003).

Flagelina es el componente estructural del filamento del flagelo bacteriano, en general esta proteína se caracteriza por dominios N- y C-terminal altamente conservados (dominios D1 y D2) con una región hipervariable (D3)

intermedia la que genera una inmunidad específica (Coloma-Rivero y col., 2021) (**Figura 2**). *Brucella melitensis* posee la capacidad de producir flagelo; bajo ciertas condiciones; identificándose en este caso un nuevo e importante rol de las proteínas que conforman el flagelo en la capacidad de infección y persistencia en el hospedador (Fretin y col., 2005). Dentro de estos factores de patogenicidad y que participan directamente en los mecanismos de infección ya descritos, la flagelina y el flagelo bacteriano figuran como un nuevo factor de virulencia con una gran proyección dentro del estudio de *Brucella* (Coloma-Rivero y col., 2021).

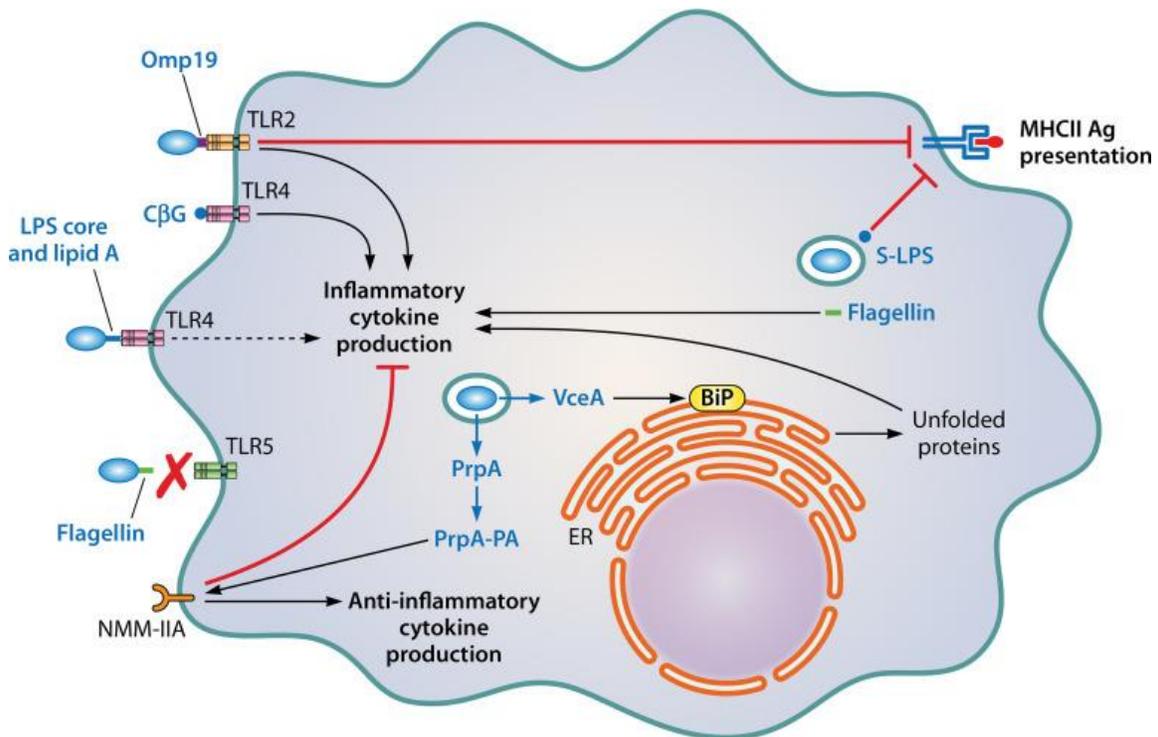


Figura 2. Determinantes de virulencia de *Brucella* que influyen en la capacidad de los macrófagos para modular la respuesta inmunitaria del

huésped. →, activación; ⇢, inhibición. La flecha discontinua indica que el LPS de *Brucella* no señala fuertemente a través de la vía TLR4 y estimula una respuesta inflamatoria disminuida. La X roja indica que la flagelina de *Brucella* no es reconocida por el TLR5 (Roop y col., 2021).

Infección por *Brucella*

Para la inducción de la enfermedad, *Brucella* debe; adherirse, invadir y sobrevivir dentro de las células hospederas (Gheibi y col., 2018). Los genes necesarios para tal propósito codifican principalmente factores de virulencia de *Brucella* como los ya nombrados y otros tales como el sistema de secreción tipo cuatro (T4SS), algunas proteínas de membrana externa (omp31) y genes de resistencia al medio ácido en el fagosoma (hpaE) (Lavigne y col., 2005; Audic y col., 2009) (**Figura 3**). Con todo lo anterior, *Brucella* sobrevive y se replica dentro de células fagocíticas profesionales y no profesionales hasta 72 horas (h) posterior a su infección en ensayos *in vitro* y, se ha descrito en ensayos *in vivo* que logra atravesar la barrera de la mucosa epitelial para facilitar la migración a otros tejidos, este proceso inicia una débil respuesta inmune innata con actividad proinflamatoria (Barquero-Calvo y col., 2007; Rossetti y col., 2013). Luego de realizada esta migración, *Brucella* es

endocitada por macrófagos y células dendríticas (DCs) ahí presentes (Rosseti y col., 2013); donde sobrevive y se replica dentro de ellas, evadiendo y modulando la respuesta inmune del hospedador, permitiendo su diseminación a otros tejidos por tropismo celular, por ejemplo; trofoblastos placentarios, pulmón fetal, sistema retículo endotelial y reproductor (Gheibi y col., 2018). Esta infección puede alcanzar un cuadro crónico y atravesar la barrera hematoencefálica por medio de monocitos infectados a manera de caballo de Troya y lograr reinfectar a nivel del mesencéfalo, causando neurobrucelosis (Miraglia y col., 2018).

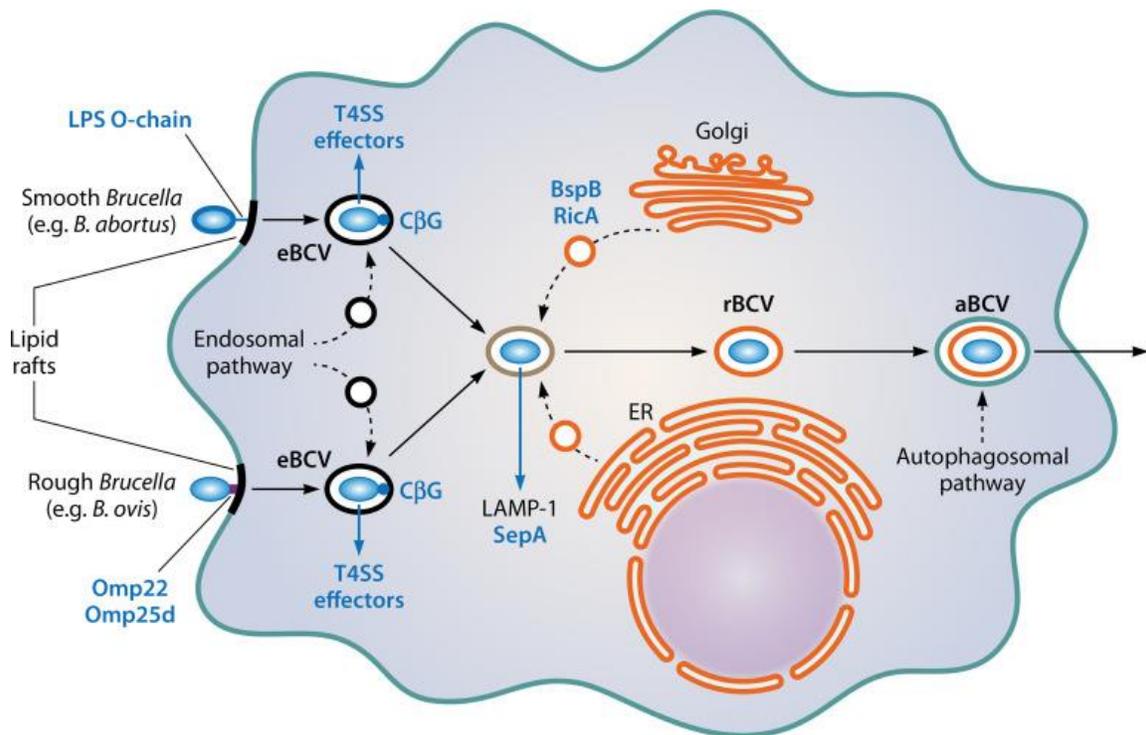


Figura 3 Contribuciones de los efectores del T4SS, la cadena O del LPS, Omp22, Omp25d y el β -1,2-d-glucano cíclico (C β G) al desarrollo de la vacuola replicativa de *Brucella* en los macrófagos del huésped.

Los círculos negros y naranjas vacíos representan el tráfico de vesículas de membrana desde la vía endolisosomal, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi hasta las vacuolas que contienen *Brucella* (BCV). El cambio de color de las membranas de las BCV representa su cambio de composición en la transición de las eBCV a las rBCV. La membrana azul más externa de las aBCV representa el engullimiento de las rBCV por la vía autofagosomal de la célula huésped. eBCV, BCV endosomal; rBCV, BCV replicativa; aBCV, BCV autofagosomal. (Roop y col., 2021).

Eventos y tránsito a nivel intracelular.

Los estudios *in vitro* utilizados como modelos para comprender la adhesión, internalización, tráfico intracelular, supervivencia, y replicación de *Brucella*, logran establecer que luego de la fijación a la superficie de las células epiteliales de la mucosa, *Brucella* se une a receptores de la superficie celular epitelial, que contienen ácido siálico y residuos sulfatados (Castañeda-Roldan

y col., 2004). Esta unión promueve la activación de GTPasas, que activan una cascada de señalización que reorganiza el citoesqueleto de actina, en donde participa el calcio intracelular y calmodulina, induciendo un reordenamiento de la membrana de la célula hospedadora a lo largo de la superficie del patógeno, aumentando la invasión bacteriana (Rossetti y col., 2012). Esto provoca cambios en la expresión de complejos proteicos de membranas, como la retención de moléculas MHC-I en linfocitos T CD8+ (Barrionuevo y col., 2012). Estas modificaciones no son propias sólo de las células hospedadoras, sino que también existen cambios en *Brucella* ya que ésta; reduce, modifica y/o oculta algunos de su patrones moleculares asociados a patógenos (Barquero-Calvo y col., 2007); sin embargo, algunos receptores tipo Toll (TLRs; principalmente TLR2, TLR4 y TLR9) inician una señalización intracelular limitada, que activa el factor de transcripción NF- κ B, para controlar la expresión de citoquinas asociadas a inflamación (Oliveira y col., 2010).

Dentro de las células fagocíticas mononucleares, *Brucella* reside en una vacuola contenedora especial, llamada vacuola contenedora de *Brucella* (BCV), donde se modifica el tráfico intracelular, y la vacuola se transforma en un compartimento replicativo, con un microambiente de disponibilidad limitada de nutrientes, al que *Brucella* se adapta poco después de la invasión

(Kohler S. y col., 2002). Inicialmente, el patógeno sufre una reducción cuantitativa de la expresión génica y la síntesis de proteínas involucradas en el metabolismo anabólico, cambiando a fuentes de energía alternativas, y alterando la respiración para adaptarse a la baja tensión de oxígeno (Lamontague y col., 2009). Por otro lado, *Brucella* evade la destrucción intracelular restringiendo la fusión de BCV con el compartimento lisosómico (Delrue y col., 2001). Proteínas como VirB y T4SS regulan el tráfico intracelular de *Brucella* y permiten alcanzar el nicho replicativo (Comerci y col., 2001; Delrue y col., 2001; de Barsey y col., 2011), previa asociación a marcadores tempranos como el antígeno endosómico temprano 1 (EEA1), Rab5 (Lee y col., 2013) y endosomas tardíos (Rab7) (Smith y col., 2013), logrando establecer su estado de replicación bacteriana dentro de la célula hospedadora en vacuolas contenedoras de *Brucella* replicantes (rBCV) (Dohmer y col., 2014).

Este mecanismo de replicación no es exclusivo de *Brucella*, existen otros géneros bacterianos y por cierto también fúngicos, que tienen como hospedador a mamíferos o células eucariontes (Kellerman y col., 2021). La internalización de algunos de estos, residen en vacuolas que se desconectan de la vía endocítica y se encaminan hacia el exterior de la célula por la vía secretora (Omodate y col., 2019). Aunque la divergencia de la vía endocítica

protege a un patógeno de la degradación lisosomal, existen desafíos asociados con esta adaptación, donde las vacuolas contenedoras de patógenos (VCP) que se ramifican desde la vía endocítica, aún deben adquirir proteínas de membranas para su buen funcionamiento en la contención y protección de *Brucella* (Omodate y col., 2019).

Una estrategia común utilizada por estos patógenos es modular y manipular el transporte y la fusión de vesículas en la vía secretora del huésped (Pizarro-Cerdá y col., 1998).

La bifurcación exitosa de la vía endocítica, acompañada de amplias interacciones en el retículo endoplásmicos confiere muchas ventajas a un patógeno vacuolar.

Primero, la conversión del fagosoma naciente en un compartimento que se asemeja a un orgánulo en la vía secretora puede brindar protección contra los sistemas de vigilancia inmunitaria, en la célula que detectan determinantes bacterianos en la luz de los orgánulos endocíticos (Rivas-Solano, 2015).

En segundo lugar, las vesículas que emergen de la vía secretora contienen cargas como proteínas y lípidos que pueden utilizarse para la replicación bacteriana, como en los patógenos intracelulares *Legionella pneumophila*, *B. abortus* y *Chlamydia trachomatis*, que ocupan vacuolas que divergen de la vía

endocítica, y tienen la capacidad de convertir los fagosomas en orgánulos que son más similares al R.E. del huésped o al aparato de Golgi (Omodate y col., 2019).

Inmunidad frente a *Brucella*.

La inmunidad frente a microorganismos patógenos depende de la respuesta inmune innata y adaptativa (Ferrero y col., 2020). En el caso de *Brucella*, ambas respuestas trabajan en conjunto y de forma coordinada para su eliminación (Skendros y Boura, 2013). Algunas bacterias son capaces de multiplicarse dentro de células del sistema inmune como macrófagos y células dendríticas, creando un nicho de replicación inaccesible para los anticuerpos circulantes, haciendo que su eliminación requiera de la inmunidad mediada por células (Ferrero y col., 2020). Este tipo de respuesta involucra la participación de las células T CD4+ de tipo Th1 que secretan interferón gama (INF- γ), una citoquina que estimula la actividad bactericida de los macrófagos y también incrementa la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+ (Ferrero y col., 2020). Estos últimos, son capaces de destruir las células infectadas por *Brucella* u otro patógeno intracelular (Skendros y Boura, 2013; Oliveira y col.,

2010). Para que ocurra una respuesta celular, es necesaria la activación de la respuesta inmune innata (como primera fase), la cual depende de las células fagocíticas, células NK y proteínas del sistema del complemento (Skendros y Boura, 2013). Las células fagocíticas, ingieren y destruyen a estos microorganismos, sin embargo, existen bacterias patógenas tales como *Brucella*, que resisten o escapan a la degradación intracelular (Roy y col., 2005; Celli y col., 2003).

Algunas bacterias intracelulares activan las células NK, induciendo la producción de IFN- γ , el cual a su vez activa macrófagos y promueve la muerte de las bacterias fagocitadas; así, las células NK y los macrófagos proveen una defensa temprana contra estos microorganismos, antes del desarrollo de la inmunidad adaptativa (Skendros y Boura, 2013). La respuesta inmune adaptativa, como segunda fase, representa el principal mecanismo de protección frente a *Brucella*. En esta respuesta, las principales células encargadas de coordinar la defensa frente a este patógeno dependen de las células T CD4+, las que reclutan a macrófagos activándolos mediante moléculas co-estimuladoras (CD40 ligando) y citoquinas (IFN- γ) en donde la activación de los fagocitos da como resultado la muerte de los microorganismos fagocitados (Quan y Yang, 2016). Además, las células T

CD4+ también activan a los linfocitos T citotóxicos CD8+ que lisan células infectadas (Skendros y Boura, 2013; Oliveira y col, 2002).

Las células T CD4+, bajo la influencia de IL-12 (citoquina producida por macrófagos y células dendríticas) pueden diferenciarse a células T CD4+ Th1 efectores que secretan IFN- γ , molécula que activa a los macrófagos para producir sustancias microbicidas, incluyendo especies reactivas del oxígeno, óxido nítrico y enzimas lisosomales, que permiten eliminar a los microorganismos fagocitados (Skendros y Boura, 2013). A pesar del robusto arsenal utilizado por el hospedero para eliminar a los microorganismos patógenos, *Brucella* ha desarrollado diversas estrategias y factores de virulencia que le permiten adherirse, invadir, proliferar y persistir dentro de diversos tipos celulares (Arellano-Reynoso y col., 2004).

Macrófagos y especies reactivas de oxígeno (ERDOS).

Los macrófagos son células grandes y especializadas que reconocen, fagocitan y destruyen rápidamente patógenos o células apoptóticas donde una de las características fundamentales de los macrófagos es su alta plasticidad, lo que les permite responder a los estímulos del complejo microambiente tisular,

cambiando rápidamente su perfil funcional a través de un proceso denominado “polarización”, donde inicialmente adoptan un fenotipo proinflamatorio y luego adquieren un perfil antiinflamatorio para reparar el daño tisular (Viola y col., 2019; Arnold y col., 2007). Debido a la gran cantidad de estímulos necesarios, el proceso de polarización de macrófagos *in vivo* no puede ser resumido a una visión estática de polarización M1/M2 adoptada de experimentos *in vitro* alcanzada por estimulación con lipopolisacárido (LPS)/interferón- γ (IFN- γ) o interleucina (IL)-4/IL-13, respectivamente (Castegna y col., 2020).

Sin embargo, los macrófagos con propiedades predominantemente proinflamatorias se denominan comúnmente M1, mientras que aquellos con una función profibrótica y antiinflamatoria se denominan M2 (Canton y col., 2021). Las especies reactivas de oxígeno se conocen desde hace muchos años como fundamentales para que los macrófagos eliminen los microorganismos invasores a través del estallido oxidativo mediado por la NADPH oxidasa (Nathan y col., 2013). Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que las **especies reactivas de oxígeno** (ERDOS) mitocondriales juegan un papel esencial en varias funciones inmunitarias innatas, a través de cambios sutiles en el estado redox intracelular (Sies y col., 2020).

El oxígeno es un elemento altamente electronegativo que acepta fácilmente los electrones generados por el metabolismo oxidativo normal dentro de las células, produciendo así ERDOS. El término "ERDOS" incluye anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo y oxígeno singlete (Sies y col., 2020) (**Figura 4**). Si bien los ERDOS se han considerado durante mucho tiempo como subproductos peligrosos del metabolismo mitocondrial, ahora se acepta ampliamente que desempeñan funciones cruciales como moléculas de señalización, que regulan el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis (Martinez-Reyes y col., 2020). Los ERDOS parecen desempeñar roles diferentes, a veces opuestos, según su origen y niveles subcelulares (Nathan y col., 2013).

Entre las ERDOS, el H_2O_2 es, con mucho, el oxidante celular más prevalente y mejor estudiado y desempeña un papel importante en la regulación redox de las actividades biológicas (Winterbourn y col., 2018). Diferentes estímulos, como factores de crecimiento o quimiocinas, desencadenan un aumento fisiológico de H_2O_2 , que se dirige a proteínas específicas que conducen a su oxidación reversible, alterando así su actividad, localización e interacciones.

Por otro lado, es probable que los niveles altos de ERDOS (que alcanzan concentraciones aproximadamente micromolares) causando daño a las macromoléculas, alterando su función y desencadenando mecanismos de

respuesta al estrés, como inflamación, fibrogénesis, crecimiento tumoral, metástasis y, en niveles más altos, muerte celular (Sies y col., 2020)

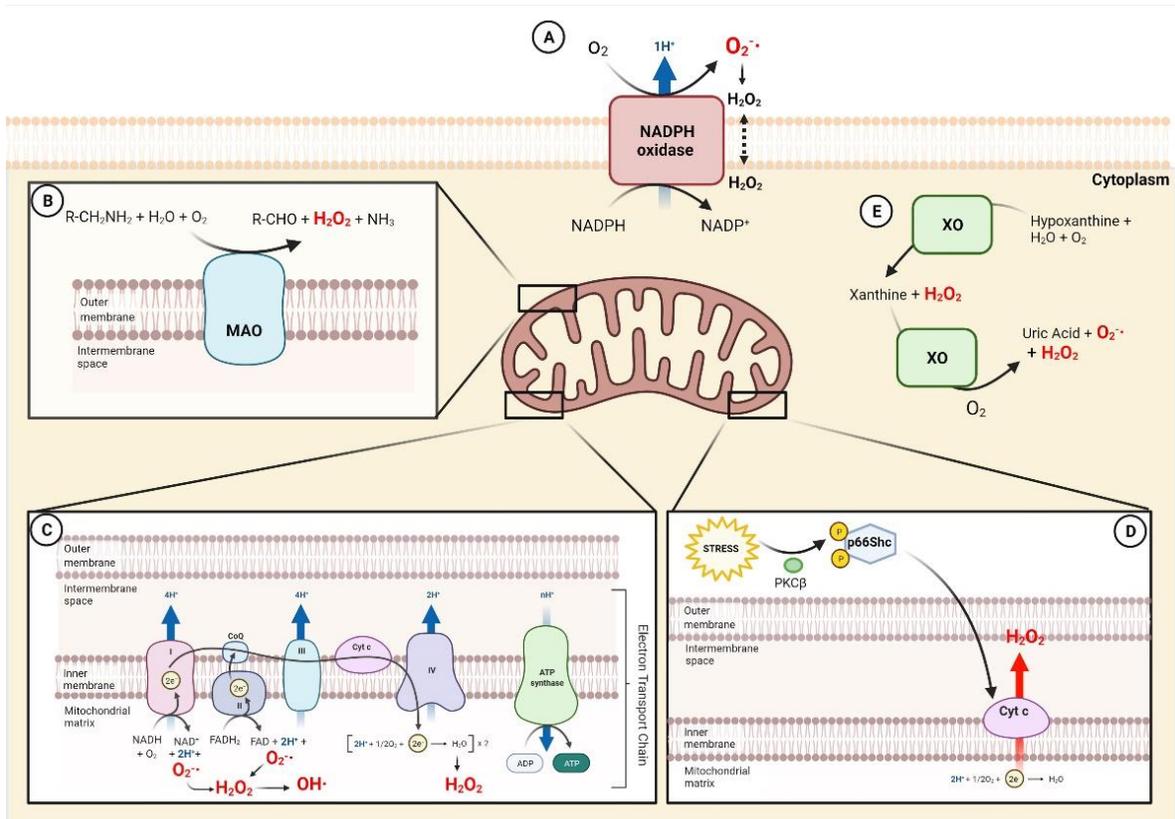


Figura 4. Fuentes de ERDOS en macrófagos. Generación de $O_2^{\cdot-}$ y formación consecutiva de H_2O_2 por NADPH oxidasa (NOX) en la membrana celular externa. **(B)** Producción de H_2O_2 en la membrana mitocondrial externa por desaminación oxidativa de aminas biogénicas y xenobióticas por MAO. **(C)** La cadena de transporte de electrones en la membrana mitocondrial interna genera $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y OH^{\cdot} en la matriz mitocondrial. **(D)** El citocromo *c* en la membrana mitocondrial interna produce H_2O_2 luego de la activación de p66Shc por estrés. **(E)** El metabolismo de la xantina produce

H_2O_2 y $\text{O}^{\cdot-}$ por XO en el citoplasma. NADP^+ , fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina; MAO, monoaminoxidasas; CoQ, coenzima Q; FAD, dinucleótido de flavina y adenina; Cyt *c*, citocromo *c*; ADP Difosfato de adenosina; ATP, trifosfato de adenosina; PKC β , proteína quinasa C β ; XO, xantina oxidasa. (Canton y col., 2021).

Cambio metabólico en infección por *Brucella*.

B. abortus invade las células huésped y es transportado a un compartimento conocido como la vacuola contenedora de *Brucella*, donde se replica. Para lograr esto con éxito, *B. abortus* debe evitar numerosas agresiones químicas por parte de la célula huésped y adaptarse a los recursos de nutrientes disponibles dentro de ésta (Rivas-Solano, 2015).

B. abortus induce un cambio metabólico similar al de Warburg (aumento de la producción de ácido láctico) en las células huésped de mamíferos y se ha demostrado que la inhibición química del metabolismo de Warburg, atenúa la supervivencia de *B. abortus* en células huésped similares a macrófagos (CzyZ y col., 2017). El ácido láctico es el producto final de la glucólisis, y su presencia en los mamíferos se observó por primera vez en el tejido muscular a

principios del siglo XIX (Certo y col., 2022). El ácido láctico juega diferentes roles fisiológicos como señales activas en varios procesos biológicos, en lugar de simplemente como un subproducto del metabolismo (Sun y col., 2017), incluyendo la regulación transcripcional de genes, la transducción de señales, la transformación fenotípica funcional de las células inmunitarias (Ivashkiv y col., 2020).

En muchas enfermedades los macrófagos se activan en diferentes fenotipos en respuesta a infecciones bacterianas, fúngicas o parasitarias, en tumores, enfermedades metabólicas y de tipo inmunológicas (Biswas y col., 2012). En condiciones fisiológicas, los macrófagos mantienen un estado fisiológico intermedio estable en el tiempo entre macrófagos M1 y macrófagos M2, mientras que un cambio de M1 a M2 o viceversa conduce a la progresión de la enfermedad, por lo tanto, la transformación fenotípica de los macrófagos es una forma potencial de tratar enfermedades (Chen y col., 2020). En la actualidad, los estudios han encontrado que el ácido láctico juega un papel importante en la regulación de la polarización funcional de los macrófagos (Zhang y col., 2019). Los macrófagos pueden ser activados por moléculas proinflamatorias asociadas a patógenos, como el lipopolisacárido (LPS) y éstos macrófagos activados clásicamente (es decir, M1), experimentan un cambio metabólico importante donde el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA)

se regula a la baja y la producción de energía pasa de la fosforilación oxidativa a un proceso menos eficiente llamado glucólisis aeróbica (Galván-Peña y col., 2014; Pearce y col., 2013) (**Figura 5**). Este cambio metabólico permite que las células inicien defensas antimicrobianas generales, al aumentar las concentraciones de ROS (Nathan y col., 1991).

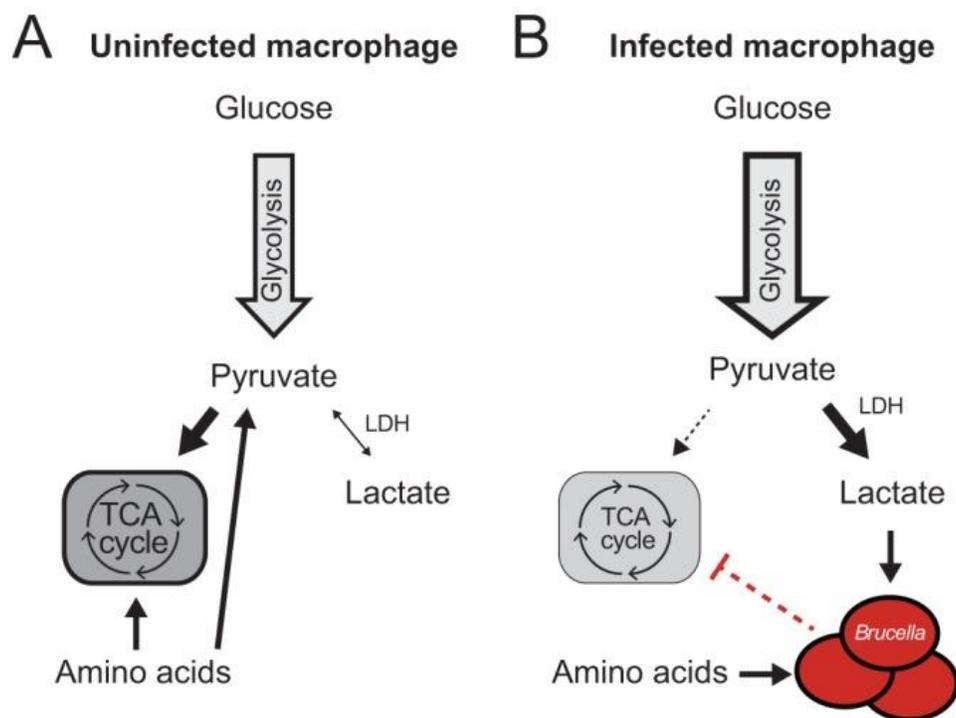


Figura 5. Modelo de *B. abortus* cómo influye en un cambio metabólico hacia un metabolismo similar al de Warburg en las células huésped.

La inhibición del metabolismo del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) tras la infección desvía a la célula huésped del catabolismo de aminoácidos hacia la producción de ácido láctico. **(A)** Los macrófagos no infectados presentan un

metabolismo de carbono central típico en el que el piruvato entra en el ciclo del TCA. **(B)** La infección por *B. abortus* sesga al macrófago hacia la glucólisis aeróbica y la producción de lactato y disminuye el catabolismo de aminoácidos. *B. abortus* puede utilizar aminoácidos seleccionados como sustratos de carbono y energía y también puede utilizar ácido láctico a través de la enzima LldD de lactato deshidrogenasa (LDH) (CzyZ y col., 2017).

Melaninas y Lacasas: su participación en la evasión del sistema inmune

Las melaninas son pigmentos heterogéneos formados por la polimerización oxidativa de compuestos indólicos o fenólicos (**Figura 6**), químicamente aromáticos, negativamente cargados, de color oscuro y ampliamente distribuidos en la naturaleza (Casadevall y col., 2000). Existen distintos tipos de melaninas: eumelaninas, feomelanina, alomelaninas y piomelaninas (Carreira y col., 2001; Plonka y Grabacka, 2006), estos biopolímeros se clasifican en diferentes tipos teniendo en cuenta su naturaleza química, las vías de síntesis y de las enzimas implicadas (Solano, 2014), encontrándose en muchos animales, plantas, algunos hongos y bacterias. Esta amplia distribución de las melaninas sugiere que tienen un rol biológico importante en muchos organismos (Toledo y col. 2017), estos pigmentos son sintetizados por diferentes vías metabólicas por enzimas cobreoxidadas llamadas lacasas

(Janusz y col., 2020). Las enzimas de tipo lacasas son proteínas con actividad fenoloxidasa, pertenecientes al grupo de las multicobre oxidorreductasas, caracterizadas por poseer átomos de cobre en su centro activo, donde catalizan la oxidación monoelectrónica de una gran variedad de sustancias fenólicas y aminas aromáticas con el oxígeno molecular como aceptor final de electrones (Eisenman y col., 2012). Estas enzimas son ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido descritas en hongos, plantas, insectos, bacterias e incluso en arqueas. Las lacasas son enzimas que están involucradas en los procesos de pigmentación, morfogénesis, oxidación de toxinas y protección contra agentes oxidantes y luz UV (Mate y col., 2017). El interés actual de estas enzimas se debe a su gran potencial para ser utilizadas con fines biotecnológicos y/o medioambientales (Chauhan y col., 2017) como son la detoxificación de suelos contaminados con diesel u otros componentes orgánicos aromáticos (Shokri y col., 2022).

Los estudios de melaninas y lacasas se han realizado en diferentes microorganismos, uno de ellos y de vida intracelular es el hongo *Cryptococcus neoformans*, donde la interacción de este patógeno y el sistema inmune del hospedador es muy compleja y bastante similar a las bacterias del género *Brucella*, en cuanto al proceso infeccioso (tránsito a nivel intracelular y mecanismo de control por parte del sistema inmune del hospedador), siendo

macrófagos y neutrófilos las primeras células encargadas de enfrentar la infección tras la inhalación del hongo (Heitman y col., 2011; Vecchiarelli, 2000a; Vecchiarelli, 2000b). La fagocitosis de este microorganismo tiene lugar tras el ingreso a nivel de las vías aérea superiores y seguida de la unión a receptores de los macrófagos pulmonares a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), presentes principalmente en la pared celular (Vecchiarelli, 2007). Aunque los macrófagos tienen capacidad microbicida, existen patógenos que son capaces de evadir la muerte y proliferar intracelularmente (**Figura 7**).

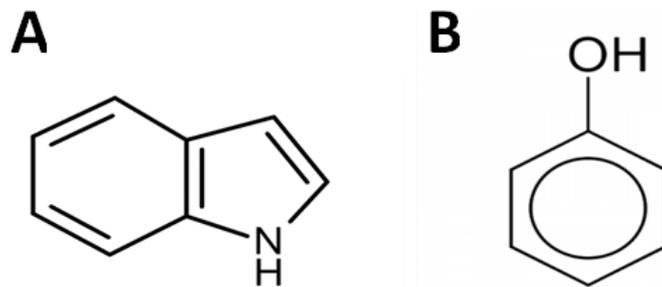


Figura 6. Grupos aromáticos sustrato de melaninas presentes en complejos químicos aromáticos en la materia viva. A. Grupo Indol B. Grupo Fenol (Figura de confección propia).

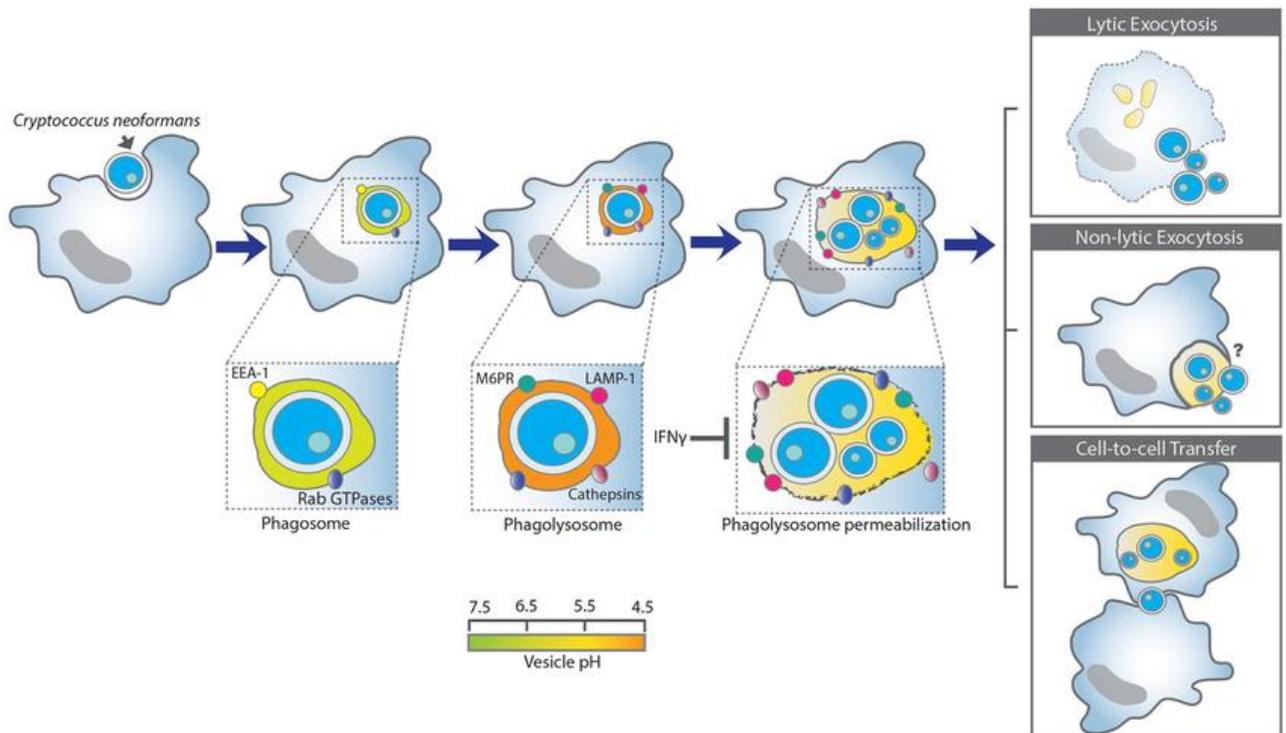


Figura 7: Resumen esquemático de la interacción de *Cryptococcus neoformans* y macrófagos (Davis y col., 2015). Tras la internalización, el hongo reside dentro de fagosomas que maduran hasta convertirse en fagolisosomas al interactuar y fusionarse con el endosoma temprano y tardío y, por último, con el lisosoma. Los fagolisosomas que contienen *Cryptococcus* se acidifican en poco tiempo hasta aproximadamente un pH de 4,3, pero aumentan más tarde a 5,3, menos ácido que el fagolisosomal normal de pH 4,5 (Levitz y col., 1999). La permeabilización de la membrana fagolisosomal podría contribuir al aumento del pH, posiblemente afectando el gradiente de protones necesario para mantener la acidificación y/o promoviendo la fuga de contenidos hacia el citoplasma y viceversa. El daño de la membrana

fagosómica favorece la replicación y supervivencia de *Cryptococcus*. Por el contrario, el IFN- γ reduce el daño a la membrana fagolisosomal y promueve la destrucción de *Cryptococcus* (Davis y col., 2015). La integridad de la membrana fagosómica parece ser un determinante clave de si el *Cryptococcus* vive o muere después de la ingestión. La supervivencia y replicación de *Cryptococcus* intracelular pueden tener tres resultados principales: **(1)** lisis del macrófago y liberación de *Cryptococcus*; **(2)** exocitosis no lítica en la que tanto el macrófago como el Cn sobreviven (la exocitosis no lítica puede ser completa o parcial), y **(3)** transferencia de célula a célula en la que un macrófago puede pasar un *Cryptococcus* previamente ingerido a otro macrófago (Davis y col., 2015).

De hecho, *Cryptococcus* una vez internalizado, puede sobrevivir y replicar al interior de los macrófagos (Del Poeta, 2004), al igual que lo hace *Brucella*. La cápsula de *Cryptococcus* es imprescindible para la supervivencia al interior del macrófago, ya que participa activamente de su replicación al interior de la célula fagocítica protegiendo al hongo de los radicales libres y otros ataques del sistema inmune (Feldmesser y col., 2000).

Cryptococcus produce melanina y esta melanina se acumula en su superficie entre la pared y la cápsula, sirviendo de escudo biológico, disminuyendo la

acción de radicales libres producidos por la célula fagocítica (Tajima y col., 2019; Zaragoza y col., 2008) (**Figura 8**). Una estrategia distinta para adaptarse al ambiente del fagolisosoma y así evadir la respuesta inmune (Levitz y col., 1999).

Es claro que la melanina forma parte del arsenal de factores de virulencia que los microorganismos poseen para defenderse de las agresiones, cuando entran en contacto con un huésped diferente a su medio ambiente (Pérez-Cuesta y col., 2019; Plonka y Grabacka, 2006; Langfelder y col., 2003; Gomez y col., 2003; Butler y col., 1998; 120,152). Estas proteínas tienen actividad catalítica denominándose también "polifenol oxidasas", "oxidasas de cobre múltiple" o "enzimas similares a la lacasa", todas catalizan la oxidación de sustratos típicos de las enzimas tipo lacasa (Claus, 2003).

La primera proteína procariótica con actividad de polifenol oxidasa (LMCO) se detectó en *Azospirillum lipoferum*, bacteria no móvil aislada de raíces de plantas (Givaudan y col., 1993). La lacasa aislada se presenta como una enzima multimérica y su actividad se correlaciona con la producción de un pigmento marrón oscuro (Diamantidis y col., 2003). Los microorganismos procariontes mejor conocidos productores de lacasa, incluyen bacterias Gram positivas y Gram negativas del suelo y acuáticas pertenecientes a los phylla α -

y γ -proteobacteria, *Firmicutes*, *Cyanobacteria*, *Aquificota* y *Deinococcus-Thermus*, así como miembros de las Arqueas (Janusz y col., 2020).

Las células bacterianas deben tener una estrategia para hacer frente a la presencia intracelular de lacasa, debido a sus posibles subproductos tóxicos, por lo que se ha sugerido que la reorganización del sistema de transporte de electrones, es una forma en la que las células positivas para lacasa, se adaptan a las quinonas reactivas endógenas generadas por las lacasas (Alexandre y col., 1999).

La localización extracelular de lacasa se demuestra en algunos bacilos y actinomicetos filamentosos (Sondhi y col., 2014). La presencia de lacasa, muy probablemente contribuye a la virulencia de estas especies (Claus y col., 2010).

Las melaninas pueden proteger contra las agresiones del ambiente y del huésped, y pueden actuar como componente antigénico modulando la respuesta inmune del hospedero; así mismo, pueden bloquear algunos de los mecanismos inmunes que el huésped utiliza para superar la agresión de estos microorganismos como la acción de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (Mohaghehpour y col., 2000; Avramidis y col., 1998).

Por otro lado, las bacterias que poseen enzimas tipo lacasas productoras de melanina pueden pertenecer a muchos géneros, incluyendo *Aeromonas* (Aurstad y col., 1972; Hamilton-Miller y col., 1975), *Alteromonas* sp. (Sanchez-Amat y col., 1997), *Bacillus* (Alexandre y Zhulin., 2000), *Legionella* (Chatfield y col., 2007), *Mycobacterium* (Prabhakaran y col., 1985), *Proteus* (Agodi y col., 1996), *Pseudomonas* (Barshtein y col., 1983), *Streptomyces* (Zhang y col., 1998)78-80) y *Vibrio* (Ruzafa y col., 1995).

En *Vibrios*, la producción de melanina ha sido descrita en *Vibrio tyrosinaticus* y *Vibrio cholerae* (Coyne y al-Harhi., 1992), donde colonias hipertoxigénicas producen una considerable cantidad de un pigmento oscuro difusible, mientras que colonias de bacterias no mutantes nativas no producen dicho pigmento (Ruzafa y col., 1995).

La producción de melanina es inducida en respuesta al estrés, en donde este factor aumenta la sobreproducción de enzimas tipo lacasas, este estrés es particularmente al cambio hiperosmótico, elevadas temperatura, y se asocia a su capacidad de sobrevivir en estuarios durante el verano (Mekalanos y col., 1997). La producción de feomelanina en mutantes de *Vibrio* (productoras de melanina) las hace sustancialmente más virulentas que las cepas parentales no melánicas (Ivinis y col., 1980). La producción de lacasa por *Streptomyces*

galbus es inducida a 42° C, lo cual sugiere que la formación de melanina es una respuesta a las condiciones adversas del medio ambiente (Kuznetsov y col., 1984).

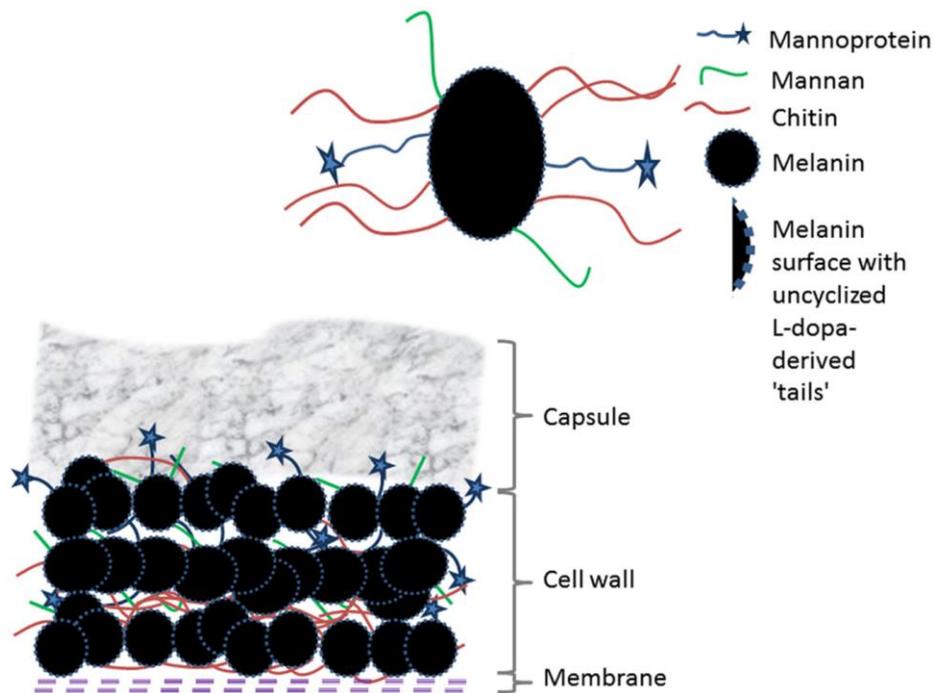


Figura 8. Acumulación de melanina entre la membrana y la cápsula de *Cryptococcus neoformans* (Plonka y Grabacka, 2006).

En particular, el hongo *Cryptococcus* sintetiza eumelanina a partir de neurotransmisores presentes en el huésped (Nurudeen y Ahearn, 1979). Uno de estos neurotransmisores que está presente en abundancia en el tejido nervioso es la catecolamina dopamina (DA) (3-hidroxitiramina; $C_8H_{11}NO_2$) y su

precursor metabólico llamado levodopa o L-DOPA, (L-3,4 dihidroxifenilalanina) (Meiser y col., 2013).

La DA es sintetizada en células presentadoras de antígeno profesionales, al igual que la expresión de los receptores de DA a nivel de membrana (DARs) en los mismos tipos celulares (Arreola y col., 2016; Nakano y col., 2009). Por otro lado, la señalización estrecha entre las catecolaminas y las células del sistema inmune sirve como fuente de producción intracelular de ERDOS (especies reactivas de oxígeno) (Días y col., 2013) y además regulan la secreción de citoquinas durante la respuesta inmune innata y adaptativa (Kawano y col., 2018) (**Figura 9**).

Se ha propuesto que las vías de producción de las catecolaminas son particularmente cruciales en la homeostasis de oxido-reducción (REDOX) en las células del sistema inmune (Cosentino y col., 2004). Así como el sistema inmune es abundante en DA, lo mismo ocurre con el sistema nervioso central. Por lo que se piensa que la mielinización del sistema nervioso le confiere a *Cryptococcus* una ventaja selectiva y un tactismo positivo hacia la colonización del sistema nervioso central, principalmente corteza cerebral (Eisenman y col., 2007). Evento similar que ocurre con la infección crónica por *Brucella*, que puede llegar a provocar neurobrucelosis, pero que no ha sido identificado hasta ahora el porqué de este cuadro (Gómez-Ruíz y col., 2018).

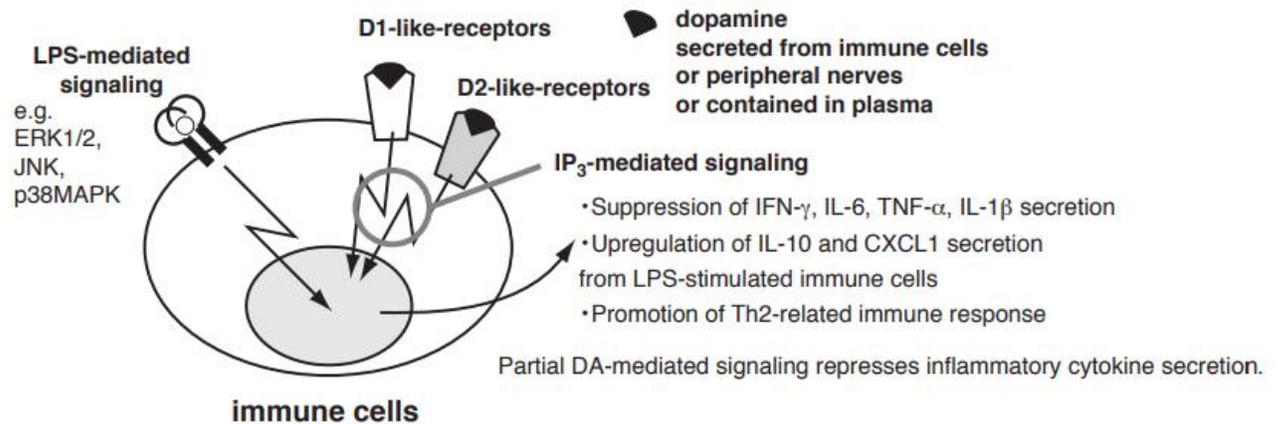


Figura 9. Interacción estrecha entre neurotransmisores y las células del sistema inmune.

El metabolismo normal de las catecolaminas sirve como fuente de producción intracelular de ERDOS (especies reactivas de oxígeno) (Días y col., 2013) y además regulan la secreción normal de citoquinas durante la respuesta inmune innata y adaptativa (Kawano y col., 2018).

Melanina y protección contra el estrés oxidativo

Uno de los usos más destacados de la melanina en biología se basa en su función como antioxidante y escudo contra radicales libres (Brenner y Hearing., 2008; Wang y col., 2006). Si bien la melanina y sus intermediarios

suelen ser tóxicos y altamente oxidativos, debido a los radicales libres que producen, al mismo tiempo está bien establecido que es un fuerte antioxidante, con una estructura de radicales libres estable, que es capaz de neutralizar otros radicales libres (Rózanowska y col., 1999; Jacobson y Tinnell., 1993). La melanina es capaz de disminuir la acción de los radicales libres y reducir los factores de estrés oxidativos del entorno que la rodea, lo que podría ser útil en el medio ambiente para ayudar a los microorganismos a manejar el estrés oxidativo (Jacobson y Tinnell., 2019; Gessler y col., 2007). Como resultado, muchos patógenos que sintetizan melaninas son resistentes a los estallidos oxidativos/respiratorios producidos por el sistema inmunitario innato, incluidos *C. neoformans* (Wang y Casadevall., 1994; Ruiz-Díez y Martínez-Suárez., 2003).

La propiedad antioxidante de la melanina, junto con otros factores de virulencia como la ureasa, puede permitir que la célula melanizada sobreviva una vez fagocitada al interior del fagosoma (Komarov y col., 2005). Mientras que la producción de melaninas crea moléculas de superóxido, las melaninas formadas pueden apagar y desintoxicar los iones superóxido (Tada y col., 2010). La melanina y la enzima superóxido dismutasa (SOD) pueden trabajar juntas en los patógenos microbianos, para evadir los estallidos oxidativos producidos por el huésped, ya que es posible que no estén localizados juntos:

la melanina a menudo es extracelular y se encuentra en la pared celular (Broxton y Culotta., 2016).

Un uso potencial interesante de la melanina es su comportamiento en entornos de alta temperatura donde la melanina es estable al calor y continúa extinguiendo los radicales superóxido y oxígeno, mientras que la actividad enzimática de la SOD disminuye y es incapaz de realizar sus funciones protectoras a altas temperaturas (Gleason y col., 2014; Rodrigues y col., 2008; Youseff y col., 2012).

En las bacterias que producen melanina mediante la oxidación de L-DOPA, la formación de pigmento está ligada a la regulación de la síntesis enzimática impulsada por factores nutritivos como la presencia de Cu, las fuentes de nitrógeno y la disponibilidad de oxígeno, pero también por redes reguladoras generales, como las que controlan la fijación del nitrógeno, las respuestas al estrés o la morfogénesis (Pavan y col., 2019).

La formación de melanina se ha estudiado ampliamente en rizobacterias, en las que se ha observado lo anteriormente dicho, por ejemplo, en *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, en el que los genes relacionados con la melanina se encuentran en un plásmido de simbiosis, la melanina se forma en medio

enriquecido, pero no en medio mínimo, incluso cuando se añaden tirosina y cobre (Borthakur y col. 1987).

B. abortus 2308 posee en su marco de lectura BAB2_0534 una proteína de tipo metalo cobre oxidasa (Database: T00304-K14588; GenBank: EC:1.16.3.4 Multicopper oxidase, type 1), que según su análisis de secuencia expresaría una proteína tipo lacasa bacteriana, que estaría relacionada en la producción de un pigmento tipo melanina, por ende esto podría participar en la evasión de la respuesta inmune y además en el cambio de polaridad inmunometabólica hacia macrófagos M2, con características antiinflamatorias. Proponiéndose la existencia de una proteína tipo lacasa en *B. abortus* 2308 que originaría un pigmento tipo melanina.

HIPOTESIS DE TRABAJO

La proteína de *B. abortus* 2308 ubicada en el marco de lectura BAB2_0534 (una multi-cobre oxidasa tipo lacasa), codifica una proteína que es un factor de virulencia que induce la formación de un pigmento tipo melanina a nivel de la célula hospedadora. Esta multicobre oxidasa tipo lacasa bacteriana, participa en la disminución de la biodisponibilidad intracelular de catecolaminas, regulando la homeostasis de procesos REDOX; disminuyendo la acción antimicrobiana por las especies reactivas de oxígeno en macrófagos RAW 246.7 infectados e influye en el proceso asociado al cambio de fenotipo de macrófago tipo M2.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar el rol del marco de lectura BAB2_0534 de *B. abortus* 2308, en el crecimiento bacteriano y la producción de un pigmento tipo melanina como factor de virulencia y si participa en cambios fenotípicos en macrófagos RAW 264.7.

Objetivos específicos:

1. Realizar un análisis bioinformático para establecer parámetros normados en cuanto las cualidades del producto génico del marco de lectura BAB2_0534 tales como, (forma, estabilidad, interacciones con otras proteínas, etc.) y concluir importancias según bibliografía relacionada.
2. Determinar el efecto de la mutación del marco de lectura BAB2_0534, en el crecimiento bacteriano de *B. abortus* 2308 y en la expresión de pigmentos tipo melanina.
3. Analizar el efecto de la delección del marco de lectura BAB2_0534 en la sobrevivencia intracelular de *B. abortus* 2308, su mutante y la complementada en células macrofágicas y su efecto sobre la expresión de especies reactivas de oxígeno.
4. Evaluar la participación del marco de lectura BAB2_0534 de *B. abortus* 2308 en la capacidad infectiva mediante un ensayo de colonización bacteriana en un modelo murino como BALB/c.
5. Evaluar el rol del producto del marco de lectura BAB2_0534 en el cambio de fenotipo de macrófago proinflamatorio M1 a uno antiinflamatorio M2, en macrófagos infectados *in vitro*.

6. Realizar estudios cualitativos *in vitro* por métodos espectroscópicos e *in vivo* por análisis histológicos de los pigmentos tipo melanina encontrados.

MATERIALES Y METODOS.

Animales

Se obtuvieron ratones hembra isogénicos BALB/c de diez semanas de edad del Instituto de Salud Pública (Santiago, Chile). Los animales se mantuvieron en el Laboratorio de Inmunología Molecular (Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile) y después de su llegada se distribuyeron aleatoriamente en grupos experimentales y de control y se les permitió aclimatar. Los ratones se mantuvieron a temperatura controlada y se alimentaron con gránulos comerciales y agua *ad libitum*. Se cumplieron todas las normas del Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Concepción, certificación que está bajo el alero del proyecto FONDECYT 1180122.

Líneas celulares

En este trabajo se utilizaron células epiteliales HeLa y la línea celular de macrófagos RAW 264.7, obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC® TIB-71™). Las células se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco BRL, USA), suplementado con suero bovino fetal al 10% (Gibco BRL, USA.) y solución de antibiótico-antimicótico (100 UI de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina, y 0.25 µg/mL de anfotericina, (Invitrogen™, Auckland, New Zeland).

Cepas y condiciones de cultivo.

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio se enumeran en la **TABLA 1**. Las cepas de *Escherichia coli* y *B. abortus* se cultivaron en caldo Luria Bertani (LB), y caldo brucella, respectivamente (Becton, Dickinson and Company, BD, Sparks, MD, EE. UU.). Todas las cepas de *B. abortus* se cultivaron durante 48 a 72 h a 37 °C en condiciones microaerófilas. Cuando fue necesario, se complementaron los medios de cultivos con 50 µg/mL de kanamicina, 100 µg/mL de ampicilina o 30 µg/mL de cloranfenicol (Ortiz-Román y col., 2014).

Tabla 1. Bacterias y plásmidos utilizados en este estudio.

CEPAS O PLASMIDOS	CARACTERISTICAS	REFERENCIAS
<i>B. abortus</i> 2308	Cepa salvaje, suave y virulenta	Cepario del laboratorio
<i>B. abortus</i> 2308 Δ BAB2_0534	<i>B. abortus</i> 2308, eliminado en el ORF BAB2_0534	Este trabajo
<i>B. abortus</i> 2308 Δ BAB2_0534 (pVB1-BAB2_0534)	<i>B. abortus</i> Δ BAB2_0534, que contiene el plásmido pVB1-BAB2_0534, Am ^r , Km ^r	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i> K-12	(<i>rK</i> ⁻ , <i>mK</i> ⁺) <i>phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
pSIM7/pSIM9	Vector de clonación de amplio rango de huéspedes, Lambda Red Recombinase (λ -Red)	Cepario del laboratorio
pKD4	Secuencia Km ^r	Cepario del laboratorio
pVB1 (ANEXO 1)	Vector de clonación para expresión de productos de PCR	Cepario del laboratorio
pVB1-BAB2_0534	Vector recombinante que codifica el gen BAB2_0534 de <i>B. abortus</i> 2308	Este trabajo

*Am^r - Resistencia a la ampicilina; Km^r - Resistencia a la kanamicina.

Análisis Bioinformático.

En este trabajo para el estudio del marco de lectura BAB2_0534 de *B. abortus* 2308 y la proteína que conlleva su síntesis, se usaron plataformas y bibliotecas bioinformáticas disponibles en servidores científicos (Chimera UCSF Chimera 1.17.3 for Windows software, UNIPROT), con el objetivo de obtener datos e información relevantes (función enzimática, ubicación, interrelación con otras proteínas, forma, etc.).

Se analizaron los parámetros fisicoquímicos de la proteína hipotética codificada en el ORF BAB2_0534, como el peso molecular, el punto isoeléctrico, la estabilidad a la temperatura y la hidrofobicidad, utilizando la herramienta ProtParam de ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>). Los resultados se avalan adjuntando el número de código bioinformático para cualquier verificación del análisis en cuestión.

Por otro lado, el modelado de la estructura 3D de esta proteína se realizó utilizando los servidores I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (Yang y col., 2014), X-raptor y Swiss Model. Los modelos obtenidos se refinaron utilizando el servidor GalaxyRefine (<http://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE>). Este servidor

utiliza métodos de relajación moderada y agresiva para la reconstrucción de las cadenas laterales (Heo y col., 2013).

Para reconocer posibles errores en la estructura tridimensional inicial y final de los modelos obtenidos, la visualización de la estructura 3D se realizó con el software Chimera UCSF en formato PDB mediante la disposición geométrica de los ángulos de los aminoácidos utilizando el gráfico de Ramachandran y se evaluó su Z-score para saber si esta estructura se encuentra dentro del rango de valores típicamente encontrados para proteínas nativas con un tamaño similar al servidor ProSA-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>).

Este análisis se basa en la distribución de energía y en la comparación de la proteína hipotética con 40 estructuras nativas similares presentes en una base de datos estudiada mediante resonancia magnética nuclear (RMN) y rayos X (Wiederstein y Sippl, 2007). La visualización de la estructura 3D se realizó con el software Chimera UCSF. La localización subcelular de la proteína Cu-oxidasa tipo 2 en *B. abortus* se analizó utilizando el software CELLO v2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) (Yu y col., 2004). Para saber la interacción proteína-proteína en este estudio se utilizó la plataforma UNIPROT usando la

entrada con código Q2YKW0 la que ofrece una entrada al servidor STRING (Szkłarczyk y col., 2018).

Construcción de mutante para el marco de lectura BAB2_0534 en *B. abortus* 2308.

Para generar un mutante para el marco de lectura abierto BAB2_0534 (Δ BAB2_0534) de *B. abortus* 2308, se usó una modificación del sistema red fago lambda (λ) (Datsenko y Wanner, 2000). Para ello, se transformaron por electroporación 10^{10} UFC mL⁻¹ de *B. abortus* 2308 con 200 ng del plásmido recombinante pSIM7 (Sharan y col., 2009) y se incubaron a 30°C durante 72 h en caldo brucella suplementado con 30 μ g/ mL de cloranfenicol. Los transformantes se incubaron a 42 °C durante 30 min para inducir la expresión de la recombinasa λ red (Halling, 1998) y permitir que el casete de resistencia a la kanamicina (Km^r), previamente amplificado por PCR a partir del plásmido pKD4 (**Tabla 2**) pueda ser incorporado por recombinación homóloga. El producto de PCR fue purificado y electroporado en 10^{10} UFC mL⁻¹ de *B. abortus* 2308 previamente transformadas con pSIM7 y cultivadas a 37°C por 72 h en placas de agar brucella suplementadas con 50 μ g/mL de Km, para la selección de mutantes. Las colonias se examinaron mediante PCR utilizando los cebadores BAB2_0534 km^r (FW) y BAB2_0534 km^r (RV)

(**Tabla 2**). Con el fin de asegurar que los posibles cambios observados fueran únicamente en la cepa mutante $\Delta BAB2_0534$, esta cepa se complementó con el respectivo gen ligado al vector pVB1. Brevemente, el gen BAB2_0534 se amplificó a partir del ADN genómico de *B. abortus* 2308 utilizando cebadores que llevan secuencias específicas para las enzimas de restricción NdeI y BamHI en sus extremos (**Tabla 2**). Luego, el fragmento amplificado se purificó y clonó en pVB1 usando la enzima T4 ADN ligasa para generar la construcción pVB1-BAB2_0534. El plásmido pVB1- BAB2_0534 se electroporó en *B. abortus* 2308 Δ BAB2_0534, generando la cepa complementada con *B. abortus* 2308 Δ BAB2_0534 (pVB1-BAB2_0534) (Ortiz-Román y col., 2014).

Tabla 2. Secuencias de genes y de partidores usados en este trabajo.

Nombre	Secuencia	Enzima de Restricción	Tamaño (pb)
BAB2_0534			
Kmr (F)	<u>GCAAGCCTCGCCTAGATTTCCATGTCGTCA*</u>	NA	
BAB2_0534			
Kmr (R)	<u>CATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCC*</u>	NA	
BAB2_0534 (F)	AAA <u>AAGCTT</u> GCCACCATGGGATTGCCATATGAACA	†HinD III	
BAB2_0534 (R)	TCAAACGGTCACGAATTGCG <u>GGATCCTT</u> T	†BamH I	
BAB2_0534	ATGGGATTGCCATATGAACAAGCC....CGCAATTCGTGACCGTTTGA		1605

*La Secuencia utilizada para amplificar Km^r está subrayada.

†*NdeI* y *BamHI*, los sitios de escisión de endonucleasas de restricción están subrayados.

ND, no disponible; (F), Adelante; (R), marcha atrás.ç

Curva de Crecimiento

Para determinar si la mutación del gen BAB2_0534 afectó la tasa de crecimiento de *B. abortus* 2308, se realizaron curvas de crecimiento para *B. abortus* 2308 Δ BAB2_0534 y *B. abortus* Δ BAB2_0534 (pVB1-BAB2_0534) y se compararon con *B. abortus* 2308 de tipo salvaje. Para ello, se añadieron 100 μ l de cada cepa a matraces con caldo brucella y se cultivaron con agitación (150 rpm) a 37°C. Luego se fueron tomando alícuotas de estos cultivos cada 4 h durante un período de 144 h y se midió su densidad óptica a una longitud de onda de 600nm; por otro lado, se tomaron 10 μ L de cada alícuota y se cultivaron en agar brucella para realizar conteo en placa y hacer la relación de crecimiento de unidades formadoras de colonias (UFC μ L⁻¹) con el valor de absorbancias medidas.

Medición de la producción de biomasa

Para evaluar la participación de la proteína codificada por el marco de lectura BAB2_0534 en la formación de biomasa adherente, se añadieron 100 μl ($1,5 \times 10^8$ UFC mL^{-1}) de *B. abortus* 2308, *B. abortus* 2308 ΔBAB2_{0534} o *B. abortus* ΔBAB2_{0534} (pVB1-BAB2_0534), estas cepas se añadieron a microplacas de 96 pocillos y fueron cultivadas de forma independiente en un volumen total de 200 μL de caldo de brucella, utilizando *E. coli* cepa K-12 como un control externo de formación de biomasa adherente (Almirón y col., 2013). Las placas se incubaron durante 7 días a 37°C sin agitación, eliminando luego las bacterias no adherentes mediante tres lavados con solución salina fisiológica estéril (0,9% NaCl, p/v) y luego las bacterias adheridas (adheridas a la biomasa) se tiñeron durante 45 min con una solución de Cristal Violeta al 1 % (Sigma-Aldrich, p/v). Después se procedió a lavar la placa y secar al ambiente, luego a cada pocillo se le agregó etanol al 70% v/v para disolver la biomasa adherente y se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 550 nm, como índice indirecto de formación de biomasa adherente, usando un Multiskan GO Espectrofotómetro de microplacas (Thermo Scientific Lab.) (Stepanović y col., 2007; Spanò y col., 2016; Chai y col., 2017). Todos los experimentos de este estudio se realizaron en triplicado.

Ensayo de susceptibilidad al cobre

El producto génico de BAB2_0534 posee un centro de cobre como centro con este antecedente se realizó esta experiencia para determinar la tasa de crecimiento de las diferentes cepas en estudio, en un medio que contiene cobre como sustrato que proporciona estrés al medio, y así por analizar si esta proteína participa de procesos de detoxificación del ambiente cuando este aumenta su concentración en este metal. Se realizaron curvas de crecimiento para *B. abortus* 2308, *B. abortus* 2308 Δ BAB2_0534 y *B. abortus* Δ BAB2_0534 (pVB1-BAB2_0534), con cobre disuelto en el medio. Para esto, se añadieron 100 μ L ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹) de cada cepa a matraces con 200 mL de caldo brucella que contenían cantidades definidas de CuCl₂ (0, 50, 100 y 200 μ M), lo que fue cultivado en agitación (150 rpm) a 37°C. Se tomaron alícuotas de estos cultivos cada 12 h durante un período de 144 h y se midió su densidad óptica a 600 nm. Se usaron alícuota de 10 μ L de estos cultivos y se cultivaron en agar brucella (bajo las mismas condiciones según corresponda) con cantidades definidas de CuCl₂ (0, 50, 100 y 200 μ M), para realizar cálculo de unidades formadoras de colonias en placa, presentando los resultados en unidades formadoras de colonias por μ l (UFC mL⁻¹) (Sánchez-Venegas y col., 2016).

Sobrevida intracelular

Para ver el efecto de la mutación del gen BAB2_0534, en la sobrevida intracelular “*in vitro*”, se determinó la replicación intracelular de *B. abortus* 2308, *B. abortus* 2308 Δ BAB2_0534 y *B. abortus* 2308 Δ BAB2_0534 (pBV1-BAB2_0534) en líneas celulares fagocíticas profesionales (macrófagos RAW 246.7) y no profesionales (células epiteliales HeLa). Para esto, un cultivo de 48h de las cepas de *B. abortus* se ajustó a una concentración de 10^7 UFCmL⁻¹ en medio DMEM (suplementado con suero bovino fetal al 10% y glutamina 2 mM, libre de antibióticos). Las bacterias se co-cultivaron con las células HeLa o RAW 246.7 a una multiplicidad de infección (MOI) de 500:1 y 50:1, respectivamente. Después de 1 h de incubación en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C, la monocapa celular se lavó con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incubó durante 60 min con medio DMEM fresco, suplementado con 50 μ g mL⁻¹ de gentamicina y 100 μ g mL⁻¹ de estreptomicina para la eliminación de bacterias extracelulares. A las 4, 24, 48 y 72 horas después de la infección, las células se cosecharon, se lavaron una vez con PBS y se lisaron con 1 mL de Tritón X-100 al 0,1 %. El lisado celular se diluyó en serie y se determinó el número de UFC mL⁻¹ en placas de agar brucella (Céspedes y col., 2011; 2012).

Ensayo de colonización bacteriana en ratones BALB/c

En este caso, para evaluar el efecto de la mutación del gen BAB2_0534 en su capacidad para colonizar “*in vivo*”, se usaron las cepas mutantes y complementadas de *B. abortus* de tipo salvaje 2308 para infectar ratones, determinado luego la cantidad de bacterias en el bazo (Fretin y col., 2005). Para esto, ratones hembra BALB/c de nueve semanas de edad, libres de patógenos, fueron inoculados por vía intraperitoneal con 10^5 UFC mL⁻¹ de cada cepa de *Brucella* en 0,1 mL de PBS. Dos y cuatro semanas después de la infección, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y sus bazos fueron extraídos y homogeneizados en PBS. Los tejidos homogeneizados se diluyeron en serie en PBS y se sembraron en agar Columbia con sangre de carnero al 5% (Biomérieux, EE. UU.), para determinar el número de UFC por bazo (Blocker y col., 2003; Ortiz-Román y col., 2014).

Medición de especies reactivas del oxígeno (ERDOS)

Para evaluar el efecto del producto génico del marco de lectura BAB2_0534 de *B. abortus* en la producción de especies reactivas de oxígeno en

macrófagos, se infectaron macrófagos RAW 246.7 con las respectivas cepas en estudio. Para esto fue necesario cultivar 500 μ L de macrófagos RAW 246.7 a una concentración de 5×10^5 células por pocillo, en placa de 24 pocillos, las que luego fueron estimuladas por una hora con las tres cepas de *Brucella* en estudio a una multiplicidad de infección (MOI) de 1:50, para posteriormente eliminar las bacterias extracelulares mediante lavados con gentamicina. Pasadas 24 h de cultivo a 37°C y una atmósfera de 5% CO₂, se prepararon las células para la medición de ERDOS, utilizando el kit CellROX, siguiendo las especificaciones del fabricante, luego analizar los resultados mediante citometría de flujo. Para esto fue necesario definir algunas muestras como control negativo tratándolas por una hora con N-acetil-cisteína (NAC) (200-5000 μ M) e incubando a 37°C con atmósfera 5% CO₂. También se definieron muestras como control positivo tratándolas con ter-butil-hidroperóxido (TBHP) (100-400 μ M), por un tiempo de 30 a 60 minutos antes de marcar las células con CellROX. Para finalizar la tinción de detección de ERDOS, las células se lavaron 3 veces con PBS. Adicionalmente para realizar una exclusión de células muertas, se tiñeron con sonda de Viabilidad Zombie Violet según las indicaciones del fabricante (ThermoFisher, Kit de tinción de células muertas LIVE/DEAD™ Fixable Violet) (Chattopadhyay y col., 2008). También se tiñeron los macrófagos utilizando el anticuerpo anti CD11b de

ratón conjugado a APC/Cy7, a una dilución 1:1000 en PBS 5% SBF por media hora en hielo para posteriormente, se lavar 3 veces con PBS y se fijar las células con PBS- 0,5% de paraformaldheido (PFA). Los datos fueron adquiridos utilizando el citómetro de flujo BD LSR Fortessa TM X-20 y analizados con el software FlowJo (FlowJo™ v10.8, Bioscience).

Cuantificación de Lactato Intracelular

Como ya se ha señalado anteriormente *Brucella* participa de manera activa del cambio metabólico en macrófagos infectados (CysZ y col., 2018), por este motivo se medirá lactato intracelular para evaluar la incidencia del marco de lectura BAB2_0534 en este proceso, en macrófagos RAW246.7 infectados con las cepas de estudio. Para este ensayo se utilizó un kit de medición de lactato por absorciometría (Lactate Assay Kit Catalog Number MAK064, SIGMA-Aldrich) según especificaciones del fabricante. Primero se preparó una solución de 10 mL de estándar 1mmol/mL de lactato con la cual se preparó la curva de calibración del estándar en placa de 96 pocillos, generando una curva de calibración de 0 (blanco), 2, 4, 6, 8 y 10 nmol/pocillo. Luego se añadió desde un buffer tampón de lactato el volumen restante para completar a

200µL volumen total a cada pocillo excepto el blanco que sólo contiene 200µL del buffer tampon de lactato. Las células se homogenizan en tampón de lactato luego se centrifugan a 200 x g durante 10 minutos para eliminar el material insoluble. Los cultivos celulares infectados con las cepas de estudio y además los grupos controles, se lavarán con medio DMEM sin suero bovino fetal 3 veces en centrifuga a 200 x g a 4 °C, seguido eso se le añadirá 100 µL de solución de lisis más 50 µL de PBS 1X para homogenizar las células mecánicamente y mezclar. Previo a obtener el volumen final de trabajo (200 µL), se añaden 50 µL de Master Reaction Mix a cada uno de los pocillos, se mezcla bien pipeteando, luego se incubó la reacción durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se protege la placa de la luz durante la incubación, posterior a eso se mide la absorbancia a 570 nm y se grafican los valores de concentración según los valores de la curva de calibración.

Medición de citocinas en células RAW 264.7

Para evaluar la relación existente entre la mutación del marco de lectura BAB2_0534 en macrófagos infectados se realizó una medición de citoquinas IL-10, TNF- α e IL-4 en cultivos de macrófagos RAW 264.7 estimulados con las distintas cepas de *Brucella* en estudio, para ello se utilizó la técnica de

ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Brevemente, se sembraron 1×10^6 células macrofágicas/pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos (Thermo Scientific Nunc cell culture plates) y se cultivaron durante 72 h a 37°C bajo 5 % de CO_2 , luego de este tiempo las células fueron estimuladas con un volumen de $100\mu\text{L}$ con 10^5 UFC mL^{-1} , usando una dosis infectiva de 1:20 de las diferentes cepas en estudio de *Brucella*. Luego de cultivados los macrófagos DMEM sin antibiótico y sin antimicótico se lavaron con PBS tres veces, posterior a eso a las 2, 6 y 12 h post estimulación, se retiraron los sobrenadantes del cultivo, luego con buffer de lisis y RPMI se tomaron las células lisadas y con filtros de $0,22\mu\text{m}$ se limpiaron las muestras de impurezas, se centrifugaron a 16.000 g durante 10 min, y se determinó IL-10 utilizando un kit ELISA Invitrogen (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Producción de pigmento tipo melanina en *B. abortus* 2308 *in vitro*

Para evaluar la producción del pigmento tipo melanina *in vitro* en este trabajo se ocuparon dos sustratos comúnmente usados para el estudio de lacasas

bacterianas y fúngicas (L-DOPA precursor de melaninas que no generan efectos citotóxicos), con el objetivo de lograr evaluar la presencia y el tipo de melanina formada por las cepas en estudio en medio de agar y caldo brucella enriquecidos con estos sustratos a diferentes concentraciones. La melanina solubilizada se sintetizó usando L-Dopamina (LD). Luego la melanina se sintetizó mediante polimerización oxidativa de LD (Amano Enzyme Inc., Aichi, Japón catalizada por la proteína tipo lacasa de *B. abortus* 2308. La polimerización catalizada por lacasa se realizó de la siguiente manera: se disolvieron 45 mg de LD en 153 mL de agua Milli-Q (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) desgasificada en autoclave (121 °C, 20 min) luego este producto estéril se agregó a cultivos bacterianos tanto en caldo brucella, así como en agar (Tajima y col., 2019).

Análisis por espectroscopia de infrarrojo (FTIR) de pigmento tipo melanina purificada desde cultivos bacterianos de estudio

Para esta experiencia en primer lugar se purificaron los extractos del pigmento tipo melanina que están presentes en los cultivos realizados con diferentes sustratos como L-DOPA (Amano Enzyme Inc., Aichi, Japón) y Acido Homogentísico (HA, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd, Tokio, Japón), y la

combinación de ambos. Una vez realizado el cultivo y con el viraje de color presente en los cultivos se procedió a purificar estos pigmentos por el método modificado de extracción y purificación de melaninas (Choi, 2021) por filtración, cambio de pH (1,5) con HCl, centrifugados y lavados con alcohol y resuspensión con NaOH, repitiendo el proceso hasta lograr un precipitado purificado marrón presente en el extracto seco (**ANEXO 2** Esquema de Protocolo Modificado) (Choi, 2021). Obtenido el extracto deshidratado y seco de las tres muestras obtenidas (L-DOPA, HA, y L-DOPA+ HA) más un estándar de melanina (eumelanina, M2649, Sigma-Aldrich) se sometió a estudio por espectroscopia de infrarojo (FTIR) con el objeto de tener una idea del punto vista analítico que los pigmentos obtenidos pertenecen a la familia de las melaninas, brevemente la técnica de espectroscopía de infrarojo permite la identificación de los grupos funcionales de un compuesto. Esto debido a que cuando una molécula absorbe radiación infrarroja, la vibración intramolecular con frecuencia igual a la de la radiación, aumenta en intensidad, lo que genera señales con frecuencias que corresponden a la vibración de un enlace específico. El objetivo de este análisis es precisamente obtener información de la estructura y organización de enlace de los pigmentos y clasificarlos como melaninas propiamente tal (Song y col., 2023).

Detección histológica de la producción de melanina en tejido infectado

Con el objetivo de apreciar *in situ* la presencia de pigmentos tipo melanina producidos por *B. abortus* 2308 en diferentes tejidos se utilizaron ratones macho y hembras BALB/c, que fueron infectados por vía intraperitoneal con 10^8 UFC mL⁻¹ de las distintas cepas de *B. abortus*. Luego de 8 semanas desde la última infección, los ratones fueron eutanaziados por dislocación cervical y se extrajeron los tejidos infectados (cerebro, bazo, hígado, riñón y testículo) con las diferentes cepas de estudio de este trabajo. Los órganos fueron conservados hasta su procesamiento en formaldehído al 10 %.

La técnica utilizada para el estudio de melaninas a nivel histológico fue el Método de Fontana -Masson específico para analizar los gránulos de argentafina en secciones histológicas, basado en la reducción del nitrato de plata a plata elemental (González y Ramírez., 2014). Para tal efecto los tejidos aislados fueron deshidratados en primera instancia con formaldehído al 10% y luego de eso fueron expuesto a una serie de alcoholes de diferente concentración para una deshidratación paulatina y lograr preservar los tejidos y los pigmentos de interés junto con la morfología del tejido (Joly-Tonetti y col., 2016). Seguido este proceso las muestras se sometieron al proceso de

tinción anteriormente señalado y luego a diferentes cortes con microtomo, para posteriormente fijarlos en vidrio portaobjeto.

Para mejorar la tinción con Fontana-Masson se realizó en todos los tejidos de estudio una tinción previa con la técnica de Hematoxilina-Eosina y así poder dar un contraste a las muestras de tejidos en estudio logrando en primer lugar resaltar la presencia del pigmento tipo melanina (Figura 27 A, B, C, D) y así descartar depósitos de lipofuscina (pigmento de desgaste, de color pardo-amarillento con fluorescencia propia, compuesto por polímero de lípidos y fosfolípidos, derivados de la peroxidación de los lípidos poliinsaturados de las membranas subcelulares) (Snyder y col., 2023). Este pigmento está presente en hígado y también marcaría como falso positivo dentro de los cortes histológicos realizados. Se realizaron en todos los tejidos se adjuntan en **ANEXO 3** pero sólo se muestra los cortes de hígado, cerebro y testículo ya que en estos tejidos fue más fácil apreciarlos. En cerebro y testículo se utilizó otra tinción de melanina, ya que el método Fontana-Masson resultaba con muchos falsos positivos para la identificación correcta de la melanina, escogiendo el método de Captación del ion Ferroso que utiliza en su procedimiento Ferricianuro de Potasio para tal propósito (González y Ramírez., 2014). Para el Método Schmorl, (Bancroft, 2008) se utiliza 1 parte de cloruro férrico al 3% o sulfato ferroso al 25% y 1 parte de ferricianuro

potásico al 1% para preparar la solución. Se mezcló y se aplicó el tinte durante 3 minutos, hasta que las láminas adquirieron un color verde claro (cuando se utilizó sulfato ferroso al 25%, es necesario teñir la muestra durante 30 minutos). Las muestras se lavaron con agua, se deshidrataron con alcohol al 95% y al 100%, se vuelven transparentes con xileno y se sellan con bálsamo (Shataer y col., 2022). Este trabajo y su análisis se realizó por profesional a cargo de la Sección Patología, Departamento especialidades, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción.

Análisis Estadístico.

El análisis de datos para establecer diferencias significativas en la formación de biomasa adherente y el tráfico intracelular entre las cepas *B. abortus* 2308 Δ BAB2_0534, *B. abortus* 2308 Δ BAB2_0534 (pVB1-BAB2_0534) y *B. abortus* 2308 se analizó mediante ANOVA unidireccional, mientras que la supervivencia intracelular en células fagocíticas profesionales y no profesionales y los ensayos de infección en ratones se analizaron usando un ANOVA de dos vías. La prueba de comparación múltiple de Tukey analizó todos los resultados. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Todos los experimentos cuantitativos se realizaron tres veces en

días separados por triplicado y los resultados mostrados son la media de esos experimentos.

Resultados

Caracterización *in silico* de la proteína codificada en el marco de lectura abierto BAB2_0534 de *B. abortus* 2308

Los resultados bioinformáticos muestran que el ORF BAB2_0534 (**Identificación de taxonomía NCBI: 359391**) contiene una secuencia de nucleótidos de 1896 pb, que codifica una proteína hipotética de 631 aminoácidos (**ANEXO 4**), tiene un peso molecular de 68.423,09 Da y un punto isoeléctrico (p.i.) de 6,04. Su índice de inestabilidad es de 38,97, clasificándola como una proteína estable, mientras que su índice alifático es de 82,65 mostrando estabilidad en un amplio rango de temperaturas para su expresión y debido a que el valor GRAVY (Gran promedio de hidropaticidad) es de - 0,136 esta proteína es considerada hidrofílica (estos valores fueron obtenidos por plataforma bioinformática UniProt código Q2YKW0-Q2YKW0_BRUA2). Luego se obtuvo un alineamiento realizado a partir de SwissModel (**Figura 10A**), que muestra una similitud de la proteína hipotética de *B. abortus* del 80,04% (**ANEXO 5**) contra la proteína bacteriana “Laccase-

like multi-copper oxidase CueO” de la bacteria degradadora de lignina *Ochrobactrum* sp, donde se puede observar que una gran parte de ambas proteínas se superponen (**Figura 10B**). El modelo seleccionado fue validado por un análisis de Ramachandran, que presentó un 97,52% de sus aminoácidos en regiones favorecidas y un 0% en regiones no favorecidas (**Figura 10C**) y por una puntuación Z de -8,19 que sitúa a esta proteína de *B. abortus* en la categoría de proteínas nativas estudiadas por rayos X (**Figura 10D**). La localización subcelular de la proteína Cu-oxidasa tipo 1 en *B. abortus* mostró que esta proteína se expresa con alta probabilidad en el citoplasma y periplasma de *B. abortus* (Q2YKW0; Q2YKW0_BRUA2). Con estos resultados es posible predecir que esta proteína codificada por el marco de lectura BAB2_0534 de *B. abortus* 2308 es una multicobre oxidasa tipo I que presenta una alta homología con otra proteína de *Ochrobactrum* sp y presentando ciertas características de estabilidad en sus dominios que la hacen funcional para *Brucella*.

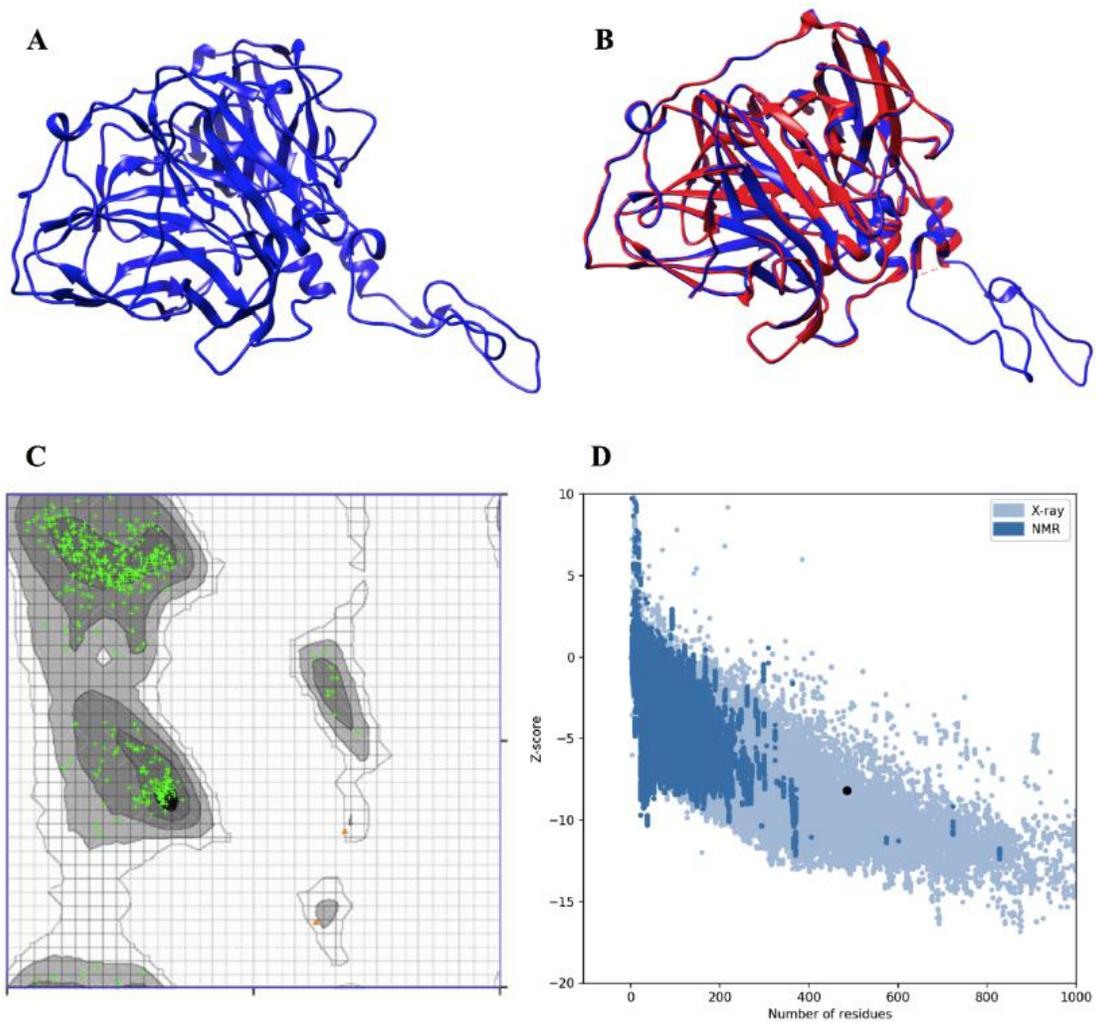


Figura 10. Modelado de la proteína oxidasa de cobre múltiple tipo lacasa codificada en el ORF BAB2_0534 de *B. abortus*.

A) Estructura 3D de la proteína hipotética según SwissModel después del refinamiento. B) Superposición de la proteína modelada de *B. abortus* con la proteína oxidasa de cobre múltiple similar a la de *B. abortus* de estudio de *Ochrobactrum* sp. Las estructuras 3D se visualizaron utilizando el software

Chimera UCSF. Validación de la estructura 3D refinada por C) Diagrama de Ramachandran que muestra la disposición geométrica de los átomos en la estructura y D) por un puntaje Z de -8.19 representado por el punto negro.

Interacción proteína-proteína del producto del gen BAB2_0534 de *B. abortus* 2308

Según el metaanálisis realizado se pueden apreciar diferentes interacciones entre el producto del marco de lectura asociado a BAB2_0534 de *B. abortus* 2308 y otras proteínas propias de la bacteria. Como se puede observar, la proteína codificada por el marco de lectura BAB2_0534 tiene relación con diez proteínas; la proteína Serina/treonina deshidratasa, enzima dependiente de piridoxal-5'-fosfato (codificada por el marco de lectura BAB1_0510), con la subunidad pequeña de la Acetolactato sintasa (codificada por BAB1_1407, abreviación *ilvN*), con la glutamato sintasa amidotransferasa (codificada por el marco de lectura BAB2_0053, abreviación *gltB*), con la proteína reguladora transcripcional (codificada por el marco de lectura BAB1_0636), con la permeasa de hierro FTR1 (codificada por el marco de lectura BAB2_0838), con adenosina desaminasa específica de ARNt que cataliza la desaminación de adenosina a inosina en la posición de bamboleo 34 del ARNt(Arg2)

(codificada por el marco de lectura BAB2_0197, abreviación *tadA*), con la proteína translocasa TatC-Sec independiente que es parte del sistema de translocación doble de arginina (Tat) la que transporta grandes proteínas plegadas que contienen un motivo característico de doble arginina en su péptido señal a través de membranas, junto con TatB, TatC forma parte de un receptor que interactúa directamente con los péptidos señal de Tat (codificada por el marco de lectura BAB1_0903 abreviación *tatC*), interacciona con la proteína translocasa de proteína TatB-sec independiente que forma parte del sistema de translocación de doble arginina (Tat) que transporta grandes proteínas plegadas que contienen un motivo característico de doble arginina en su péptido señal a través de las membranas. Junto con TatC, TatB forma parte de un receptor que interactúa directamente con los péptidos señal de Tat (codificada por el marco de lectura BAB1_0902, abreviatura *tatB*), interacciona con la proteína de cobre azul (tipo 1) también llamada plastocianina (codificada por el marco de lectura BAB2_0921), y por último también interacciona con un dominio de condensación codificado por el marco de lectura BAB2_0016 (**Figura 11**).

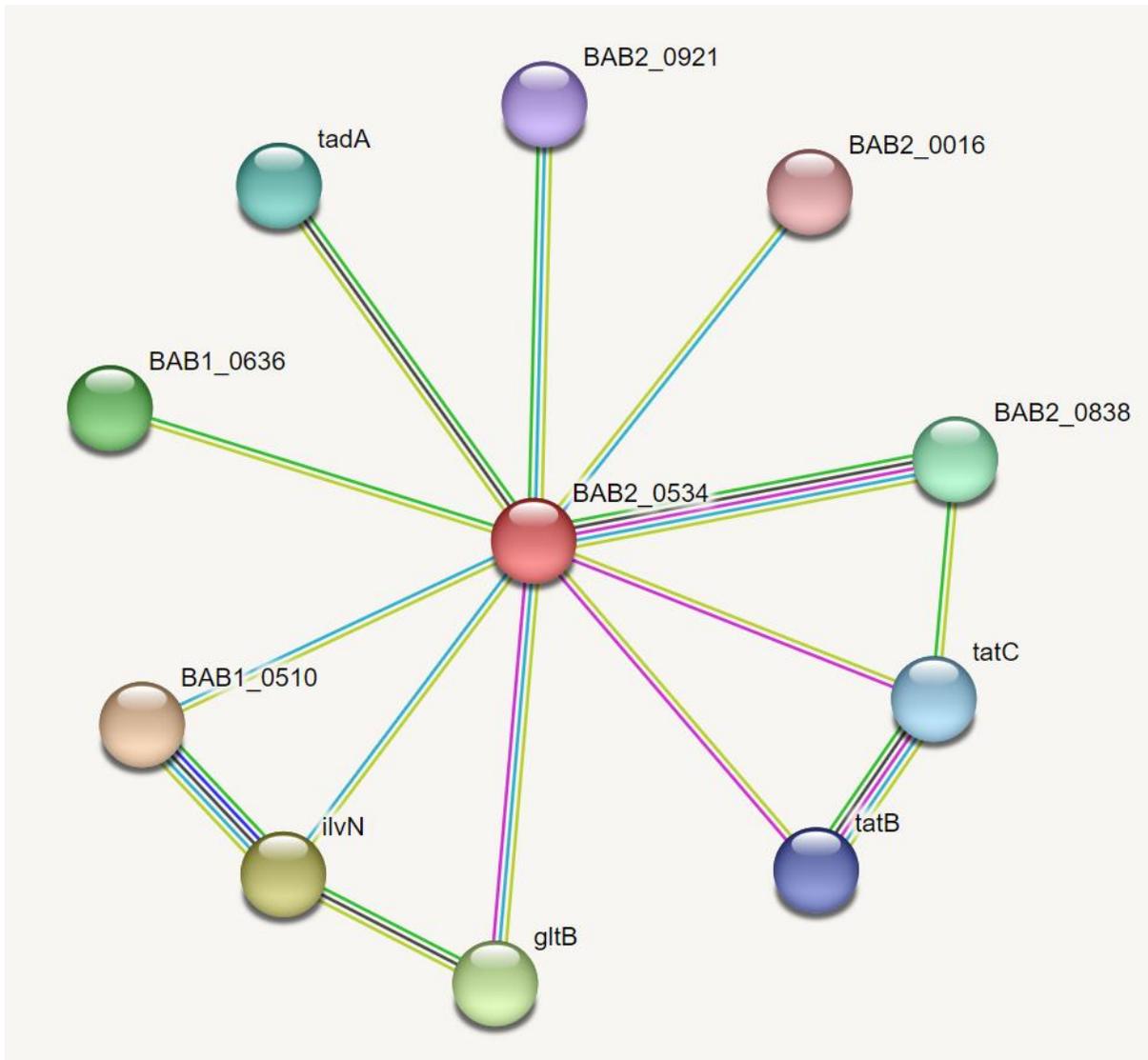


Figura 11. Interacción proteína-proteína a nivel subcelular en *B. abortus*

2308. La proteína codificada desde el producto génico del marco de lectura BAB2_0534 interactúa con otras proteínas que participan tanto en el metabolismo propio de *B. abortus* 2308 como en la interacción con el hospedador.

Curva de crecimiento de diferentes cepas de *B. abortus*

El efecto de la mutación del gen BAB2_0534 sobre el crecimiento bacteriano se evaluó cultivando las cepas en estudio en caldo brucella y realizando el conteo de colonias en agar brucella. La bacteria mutante para el ORF BAB2_0534 (*B. abortus* 2308 Δ BAB2_0534) mostró una desaceleración en su crecimiento de 48 h desde su cultivo comenzando la fase logarítmica en comparación con la cepa de tipo salvaje. Además, al observar la fase logarítmica de crecimiento de la cepa mutante, ésta fue mucho menor en el crecimiento que la cepa salvaje *B. abortus* 2308. La cepa de tipo salvaje entró en la fase estacionaria después de 72 h de crecimiento en cambio que la mutante alcanzó la fase estacionaria después de 96 h de cultivo. No se observaron diferencias entre las curvas de crecimiento de *B. abortus* 2308 y *B. abortus* 2308 Δ BAB2_0534 (pBV1-BAB2_0534) indicando estos resultados que la proteína codificada por BAB2_0534 está involucrada en el crecimiento normal de *B. abortus* 2308 (Figura 12).

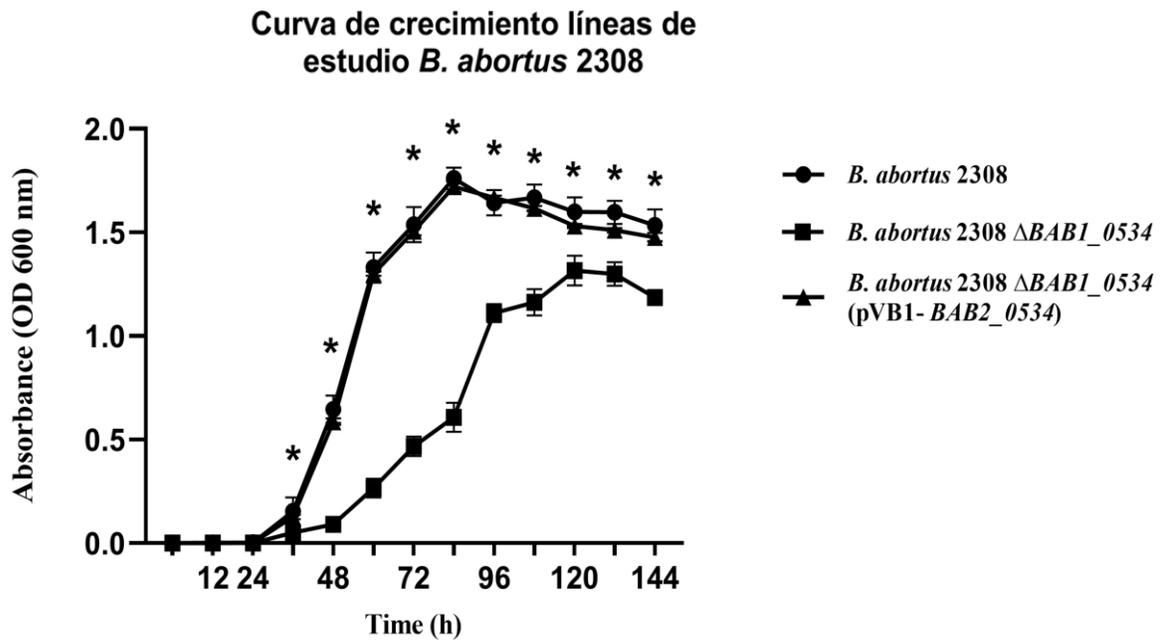


Figura 12. Curvas de crecimiento de cepas de *B. abortus*.

B. abortus 2308, *B. abortus* 2308 Δ BAB2_0534 y 2308 Δ BAB2_0534 (pBV1-BAB2_0534) complementada. La eliminación del gen *BAB2_0534* en *B. abortus* 2308 da como resultado una deficiencia en el crecimiento. Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar (DE) (* $P < 0,05$).

Producción de biomasa

En cuanto a la capacidad de la cepa *B. abortus* 2308 para formar biomasa adherida en placas de poliestireno, los resultados muestran que a los 7 días *B.*

abortus 2308 Δ BAB2_0534 (cepa mutante para BAB2_0534) desarrolló una producción de biomasa significativamente menor que la biomasa producida por *B. abortus* 2308 Δ BAB2_0534 (pVB1-BAB2_0534) y *B. abortus* 2308 ($P < 0,001$) (Figura 13).

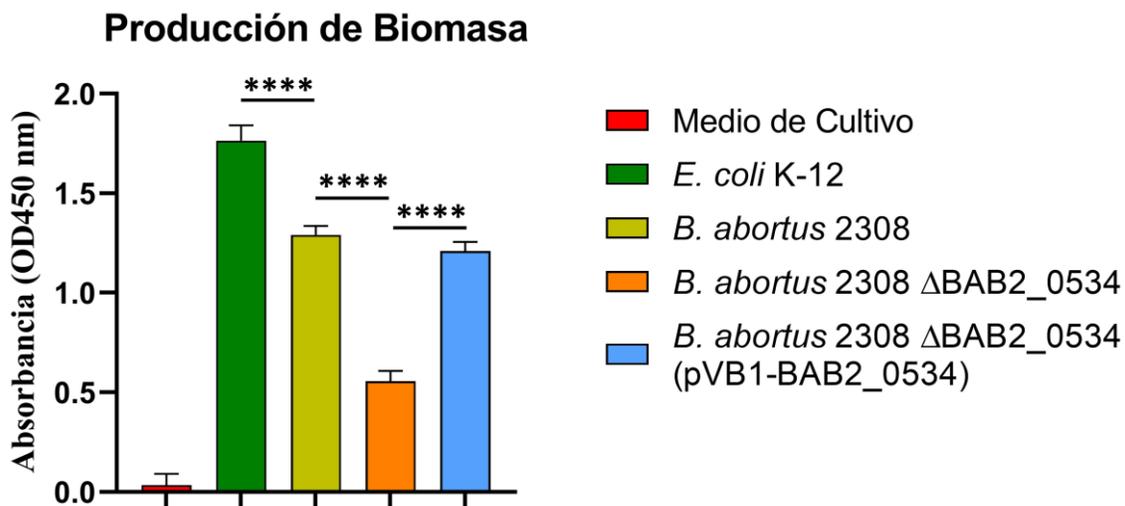


Figura 13. Gráfico de expresión de formación de biomasa adherente.

Medida cuantitativa por absorbancia a 450 nm de producción de biomasa adherida en placas de poliestireno de 96 pocillos, de *B. abortus* 2308, *B. abortus* 2308 Δ BAB2_0534, cepa complementada *B. abortus* 2308 Δ BAB2_0534 (pVB1-BAB2_0534), y *E. coli* K-12 como control positivo de producción de biomasa y medio de cultivo como control negativo. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. Los valores de **** $P < 0,001$ se consideran altamente significativos.

Tolerancia al cobre en *B. abortus* 2308

Suponiendo que *B. abortus* 2308 puede requerir el producto génico de *BAB2_0534* para la tolerancia al cobre, las distintas cepas en estudio de *B. abortus* fueron cultivadas con condiciones crecientes de cobre (CuCl_2). Los resultados indican que el crecimiento de *B. abortus* 2308 ΔBAB2_0534 se inhibió significativamente en presencia de cobre a 50 μM y 100 μM , inhibición que fue al menos 1000 veces menor que la de *B. abortus* 2308 en presencia de CuCl_2 100 μM . Además, *B. abortus* 2308 ΔBAB2_0534 (pBV1-*BAB2_0534*) mostró el mismo patrón de crecimiento al cobre que *B. abortus* 2308, lo que confirma la complementación funcional de *B. abortus* 2308 ΔBAB2_0534 . Los resultados indican el requerimiento de *BAB2_0534* para la tolerancia al cobre por parte de *B. abortus* 2308 (**Figura 14**).

Curvas de crecimiento de cepas de *Brucella* en medio de cultivo con CuCl_2

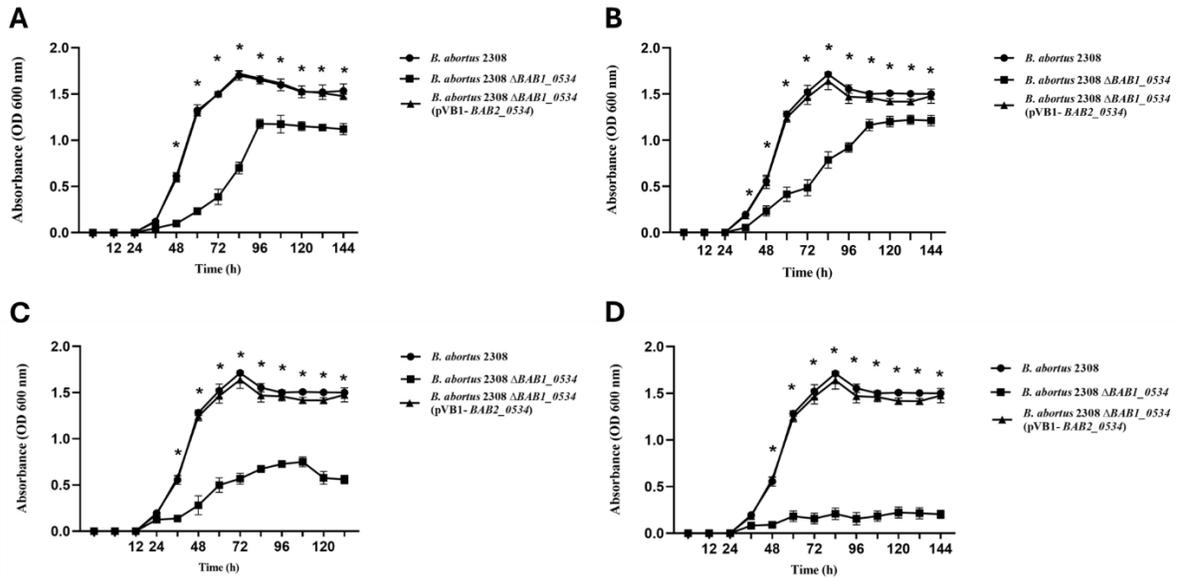


Figura 14. Curvas de crecimiento de *Brucella* en medio de cultivo con CuCl_2 . Gráficos que representan crecimientos de las cepas de *B. abortus* 2308 (●), *B. abortus* ΔBAB2_{0534} (■) y *B. abortus* ΔBAB2_{0534} complementado (pBV1-*BAB2_{0534}*) (▲) en estudio. A, B, C, D contienen 0, 10, 50 y 100 μM de CuCl_2 respectivamente. Los valores de * $P < 0,01$ se consideran significativos.

Supervivencia intracelular de *B. abortus* 2308 Δ BAB2_0534 en células fagocíticas profesionales y no profesionales

Se estudió el efecto de la eliminación de BAB2_0534 sobre la capacidad de *B. abortus* para infectar y proliferar al interior de células fagocíticas y no fagocíticas utilizando macrófagos RAW 246.7 y células epiteliales HeLa. Las que se infectaron a una MOI de 500:1. Encontramos que a las 4 h post-infección (pi) de macrófago RAW 246.7, todas las cepas de *Brucella* mostraron un número similar de bacterias a nivel intracelulares (**Figura 15A**). Sin embargo, entre 24 y 72 h pi, la cepa *B. abortus* 2308 Δ BAB2_0534 se recuperó de macrófagos aproximadamente en $2 \log_{10}$ UFC mL⁻¹ menos que *B. abortus* 2308 o *B. abortus* Δ BAB2_0534 (pVB1- BAB2_0534) ($P < 0,05$). Cuando se analizó la internalización bacteriana y la supervivencia dentro de las células HeLa, todas las cepas mostraron un número similar de bacterias intracelulares entre 4 h ($2,3 \log_{10}$ UFC mL⁻¹) y 24 h ($2,9 \log_{10}$ UFC mL⁻¹) p.i. (**Figura 15B**). Sin embargo, entre las 48 y las 72 h p.i., el mutante Δ BAB2_0534 de *B. abortus* se recuperó a aproximadamente $2,2 \log_{10}$ UFC mL⁻¹ menos que las cepas parentales y complementadas ($P > 0,05$) (Figura 8). Estos resultados indican que la ausencia del gen BAB2_0534 en *B. abortus* la hace más sensible a su supervivencia intracelular. El efecto de la eliminación

del ORF BAB2_0534 sobre la capacidad de *B. abortus* para infectar y proliferar dentro de células fagocíticas y no fagocíticas se estudió utilizando macrófagos RAW 246.7 y células epiteliales HeLa, respectivamente. Encontramos que a las 4 h post-infección (p.i.) del macrófago RAW 246.7, todas las cepas de *Brucella* mostraron un número similar de bacterias intracelulares (Figura 14A). Sin embargo, entre 24 y 72 h pi, la cepa *B. abortus* 2308 Δ BAB2_0534 se recuperó de macrófagos aproximadamente en $2 \log_{10}$ UFC mL⁻¹ menos que *B. abortus* 2308 o *B. abortus* Δ BAB2_0534 (pVB1- BAB2_0534) ($P < 0,05$). Cuando se analizó la internalización bacteriana y la supervivencia dentro de las células HeLa, todas las cepas mostraron un número similar de bacterias intracelulares entre 4 h ($2,3 \log_{10}$ CFU mL⁻¹) y 24 h ($2,9 \log_{10}$ UFC mL⁻¹) pi (Figura 14B). Sin embargo, entre las 48 y las 72 h p.i., el mutante Δ BAB2_0534 de *B. abortus* se recuperó a aproximadamente $2,2 \log_{10}$ UFC mL⁻¹ menos que las cepas parentales y complementadas ($P > 0,05$) (**Figura 15**). Estos resultados indican que la ausencia del gen BAB2_0534 en *B. abortus* la hace más sensible a su supervivencia intracelular.

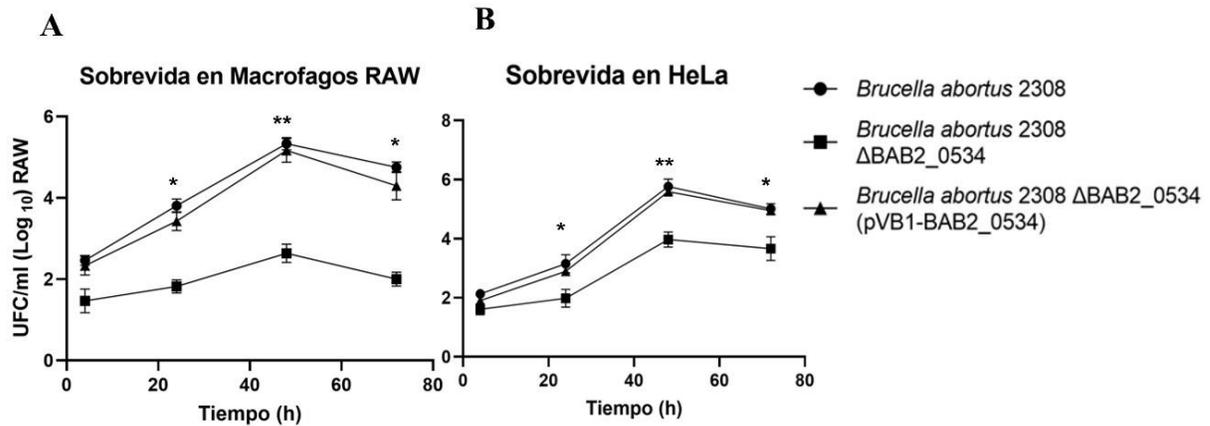


Figura 15. Supervivencia intracelular de *B. abortus* ΔBAB2_0534 en fagocitos profesionales y no profesionales

A) Los macrófagos RAW se infectaron a una MOI de 50:1. *B. abortus* 2308 (●), *B. abortus* ΔBAB2_0534 (■) y *B. abortus* ΔBAB2_0534 complementado (pBV1- BAB2_0534) (▲). B) Los resultados corresponden a un experimento representativo de dos experimentos separados. Para cada punto de tiempo y cada tensión, los resultados se expresan como media ± desviación estándar. * $P < 0,05$ en comparación con *B. abortus* 2308 parental.

Supervivencia de *B. abortus* 2308 ΔBAB2_0534 en ratones BALB/c

Se determinó el efecto de la delección del gen BAB2_0534 sobre la virulencia bacteriana, analizando las cargas bacterianas presentes en los bazos de ratones infectados. Encontramos que la supervivencia de la cepa *B. abortus* 2308

$\Delta BAB2_0534$ en bazo de ratón se redujo significativamente después de las 4 semanas p.i., de un valor de $6,28 \pm 0,39 \log_{10}$ UFC/bazo en la segunda semana p.i. a $3,22 \pm 0,07 \log_{10}$ CFU/bazo en la cuarta semana p.i. ($P < 0,05$). En la cepa de tipo salvaje, la reducción del número de UFC desde la segunda semana a la cuarta semana fue de $1,22 \log_{10}$ CFU/unidades (**Tabla 3**). Por otro lado, hubo diferencias significativas entre la capacidad de colonización esplénica de la mutante *B. abortus* 2308 $\Delta BAB2_0534$ y la cepa complementada a las 4 semanas p.i. (**Tabla 3**).

Tabla 3. Colonización del bazo de ratones BALB/c con *B. abortus* 2308, *B. abortus* 2308 $\Delta BAB2_0534$ mutante y *B. abortus* 2308 $\Delta BAB2_0534$ (pVB1- *BAB2_0534*) complementada.

Cepas de <i>B. abortus</i>	Dos semanas después de la infección	Cuatro semanas después de la infección
<i>B. abortus</i> 2308	$6,78 \pm 0,05$	$5,66 \pm 0,05$
<i>B. abortus</i> $\Delta BAB2_0534$	$5,80 \pm 0,05^*$	$2,63 \pm 0,02^*$
<i>B. abortus</i> $\Delta BAB2_0534$ (pVB1- <i>BAB2_0534</i>)	$6,69 \pm 0,04$	$5,44 \pm 0,05$

Log₁₀ UFC de cepas de *B. abortus* en los bazos de ratones BALB/c infectados por vía intraperitoneal con 5 x 10⁴ UFC de tipo salvaje *B. abortus* 2308, *B. abortus* 2308 Δ BAB2_0534 mutante o cepas de *B. abortus* 2308 Δ BAB2_0534 (pVB1- *BAB2_0534*) complementadas. Se realizaron análisis estadísticos comparando cepas mutantes con cepas de tipo salvaje y complementadas. * $P < 0,05$ que muestra un número significativamente menor de UFC/bazo en comparación con *B. abortus* 2308.

Medición de especies reactivas de oxígeno.

Las proteínas multicobre oxidasa tipo lacasa, que sintetiza un pigmento tipo melanina a nivel intracelular, están involucradas en la inhibición de la acción de especies reactivas de oxígeno (ERDOS) en macrófagos infectados, disminuyendo su acción antimicrobiana. Es por esto que, para ver si efectivamente este ORF BAB2_0534 está involucrado en esta acción nos enfocamos en medir a diferentes condiciones los niveles de ERDOS con las diferentes cepas de estudio en macrófagos RAW 246.7 *in vitro* encontrando que los niveles de ERDOS presentes en cultivo aumentan en las cepa mutante de manera considerable (1800 MFI) en comparación con la cepa normal (1000

MFI) logrando apreciar que este marco de lectura participa de manera activa en la disminución de ERDOS presentes en macrófagos RAW 246.7 infectados en con *B. abortus* 2308 (Figura 16).

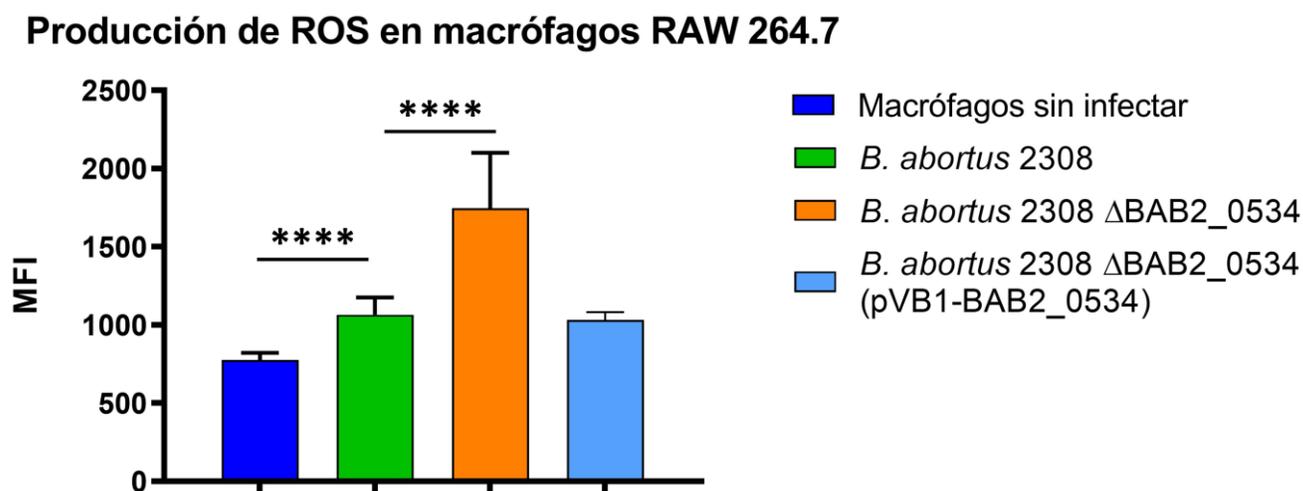


Figura 16. Producción de especies reactivas de oxígeno.

Por técnica de Citometría de Flujo se evaluó la producción de especies reactivas de oxígeno en células macrofágicas RAW 264.7, apreciándose la alta producción de éstas en células macrofágicas RAW infectadas con la cepa mutante para *B. abortus* 2308. Los valores de **** $P < 0,001$ se consideran altamente significativos con relación a *B. abortus* 2308.

Medición de Lactato en cultivo de macrófagos RAW 264.7

Como parámetro de cambio metabólico en macrófagos RAW 264.7 infectados con las cepas en estudio y para ver la incidencia del producto génico del marco de lectura BAB2_0534 de *B. abortus* 2308 en la célula hospedadora, se evaluó la concentración de lactato intracelular. En estos resultados se puede apreciar una marcada disminución de lactato intracelular en la cepa mutante de *Brucella* en comparación con el grupo control infectado con *B. abortus* 2308 siendo estadísticamente menor en al menos tres veces evidenciando así un cambio muy significativo con relación al control sin infectar y también al infectado con la cepa normal (**Figura 17**).

Lactato en cultivo celular de macrófagos RAW 264.7 infectados con *Brucella*

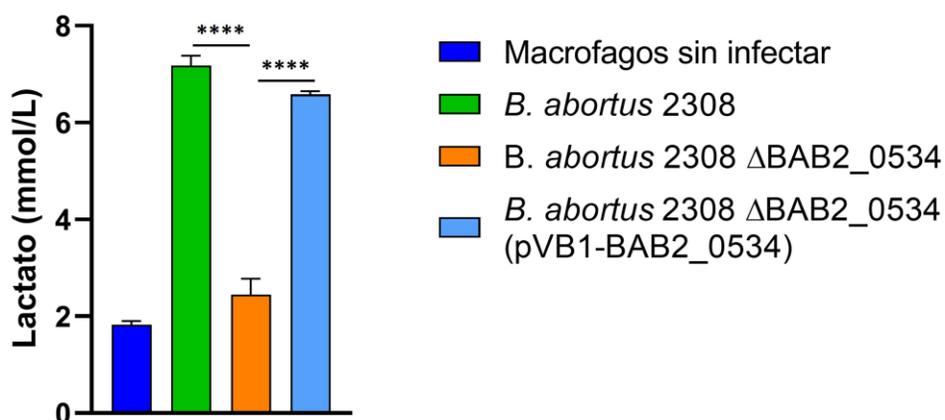


Figura 17. Producción de lactato intracelular en macrófagos RAW 246.7.

La producción de lactato intracelular presente en macrófagos RAW 264.7 infectados con *B. abortus* mutante para el marco génico BAB2_0534 disminuye de manera significativa con relación a la cepa salvaje y su complementada pero no llega a valores normales de células sin infectar. Los valores de **** $P < 0,001$ se consideran altamente significativos en relación a *B. abortus* 2308.

Medición de citoquinas IL-10, TNF- α e IL-4 en Macrófagos RAW 246.7.

Para evaluar el efecto de la eliminación del ORF BAB2_0534 sobre el comportamiento de la función macrofágica y el comportamiento inmune de estas células frente a las cualidades infectivas de estas cepas bacterianas se midió la producción de diferentes citoquinas tales como IL-10, TNF- α , e IL-4. Esta producción arrojó como resultados una baja producción de IL-10 en comparación con el control de *Brucella* normal en todos los tiempos evaluados después de la infección (**Figura 18**), además de una alta producción de TNF- α en las células macrofágicas infectadas con la cepa mutante luego de las 6 y 12 h post infección en comparación con la cepa normal (**Figura 19**) y en relación a la producción de IL-4 se encontró una alta producción de esta

citoquina post infección en macrófagos infectados con la cepa mutante a las 4, 6 y 12 h post infección, en relación a la cepa salvaje de *B. abortus* 2308 (**Figura 20**). Los valores de * $P < 0,001$ se consideran altamente significativos en relación a *B. abortus* 2308.

Producción de IL-10 en macrófagos RAW 264.7 infectados con cepas de *Brucella* en estudio.

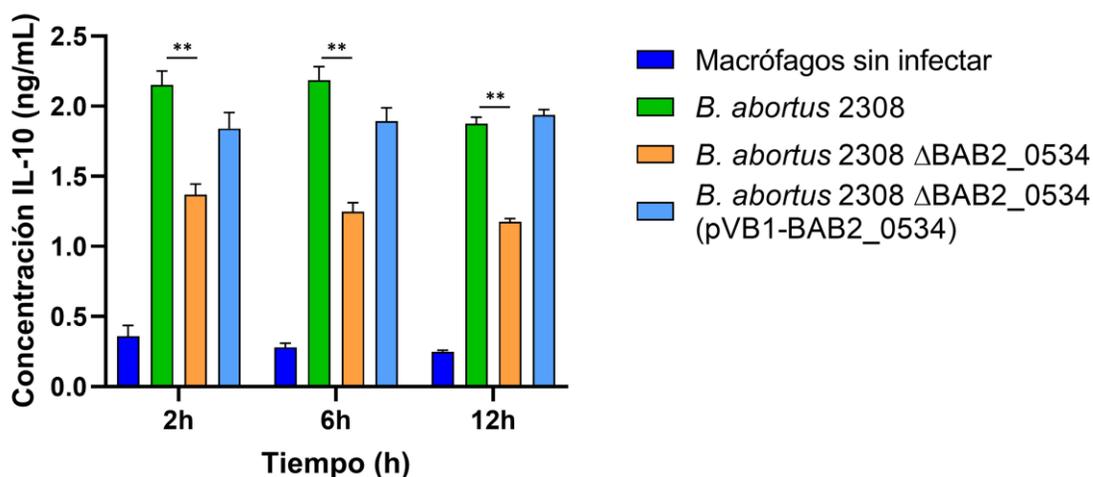


Figura 18. Producción de IL-10 *in vitro* post sensibilización con cepas de estudio.

La producción de IL-10 disminuida con relación a la alta producción presente en macrófagos infectados con la cepa normal de *B. abortus* 2308 y la mutante complementada a las 2, 6 y 12 h post infección. Los valores de ** $P < 0,01$ se consideran altamente significativos con relación a *B. abortus* 2308.

Producción de TNF- α en macrófagos RAW 264.7 estimulados con cepas de estudio de *Brucella*.

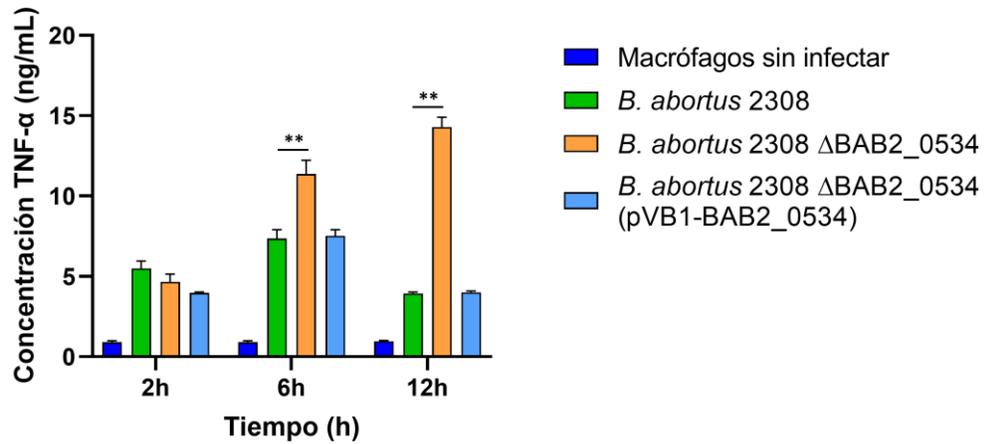


Figura 19. Producción de TNF- α *in vitro* post sensibilización con cepas de estudio.

La producción de TNF- α en macrófagos estimulados con las cepas de estudio resulta similar a la cepa control de *B. abortus* 2308 y la bacteria mutante complementada con el plásmido portador del gen, no así a los tiempo post infección de 6 h donde hay un aumento significativo en relacion a la normal y a las 12 h post infección encontramos una baja en la producción de esta citoquina en la macrófagos infectados con la normal no así en los infectados con la mutante en el marco de lectura BAB2_0534 donde existe un aumento significativo en la producción de TNF- α por parte de macrofagos RAW 246.7. Los valores de ** $P < 0,01$ se consideran significativos con relación a *B. abortus* 2308.

Producción de IL-4 en macrófagos RAW 264.7 estimulados con cepas de estudio de *Brucella*.

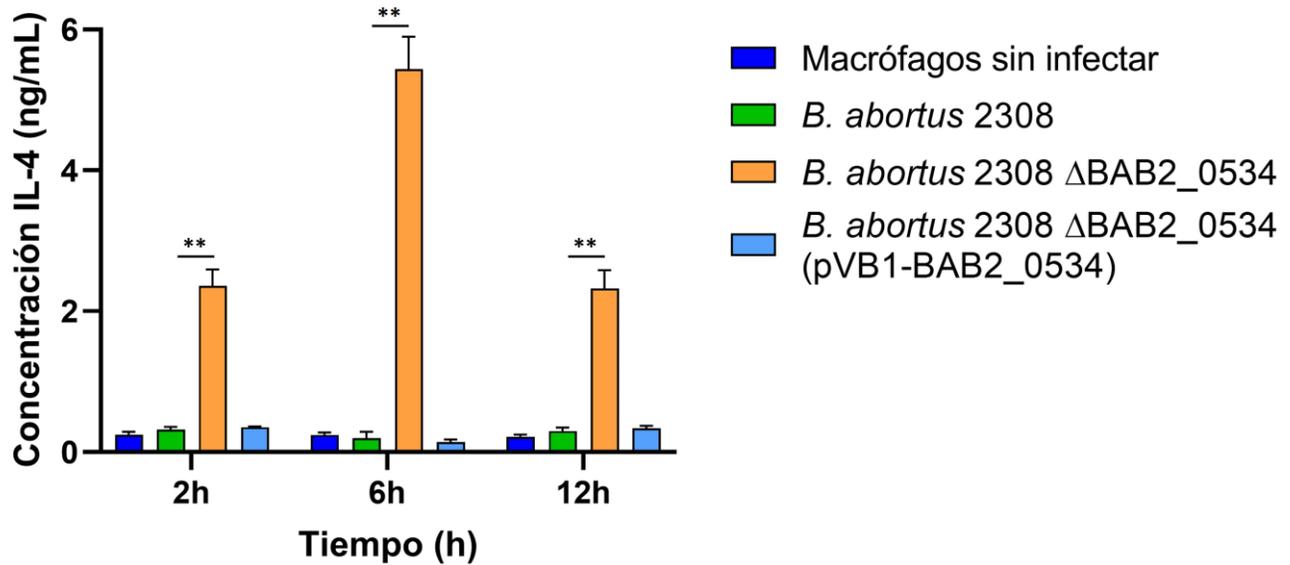


Figura 20. Producción de IL-4 *in vitro* post sensibilización con cepas de estudio.

La producción de IL-4 en macrófagos estimulados con las cepas de estudio resulta significativamente mayor en todos los tiempos post infección analizados (2, 4 y 6 h post infección) en relación con los resultados encontrados en macrófagos RAW 246.7 infectados con las cepas de *Brucella* normal y la bacteria mutante complementada con el plásmido portador del gen. Los valores de * $P < 0,001$ se consideran altamente significativos en relacion a *B. abortus* 2308.

Cultivo de las cepas bacterianas en sustrato de L-DOPA para estudio de melanina

Se realizaron cultivos de las cepas de *Brucella* en estudio, en agar y caldo brucella enriquecidos con sustrato específico para la producción de melaninas, este fue dopamina (L-DOPA). Como se observa en los cultivos existe el hallazgo de un pigmento oscuro tipo melanina que difunde al medio sólido de agar en relación creciente a la dosis usada de L-DOPA (**Figura 21**), además de la aparición de este pigmento las colonias de *Brucella abortus* 2308 se aprecian blanquecinas sin presencia de este pigmento en las colonias de *Brucella abortus* 2308. En caldo de cultivo también existe el mismo hallazgo de un pigmento oscuro tipo melanina en presencia de L-DOPA (tubo **A**) este resultado se contrasta con los controles; (**tubo B** control de crecimiento sin L-DOPA y **tubo D** control térmico por viraje de color de sustrato al cambio de temperatura). **Tubo C** se aprecia sin pigmento oscuro, pero si existe crecimiento de *B. abortus* 2308 mutante (**Figura 22**).

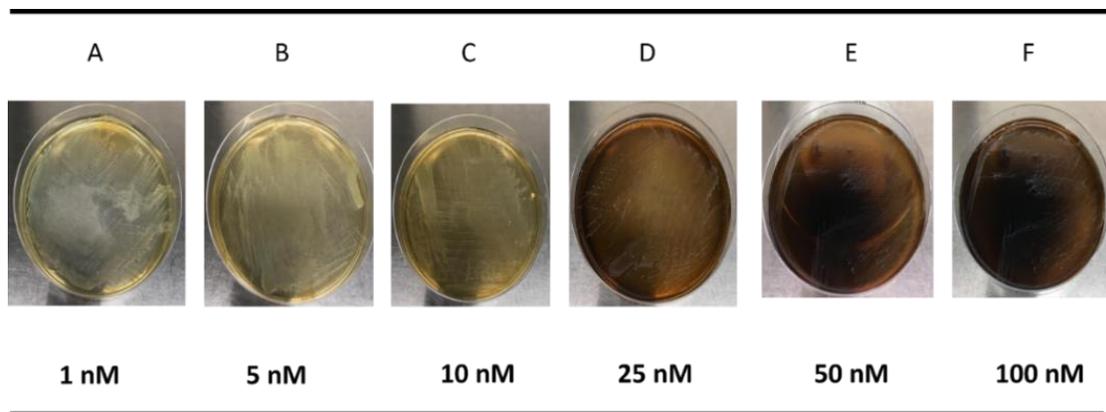


Figura 21. Resultados de cultivos con sustrato de L-DOPA. *B. abortus* 2308 en agar brucella en presencia de diferentes concentraciones de L-DOPA (desde A hasta F), como sustrato de melanina bacteriana, evidenciando la presencia de un pigmento negro marrón que difunde al agar existiendo presencia de colonias bacterianas blancas.

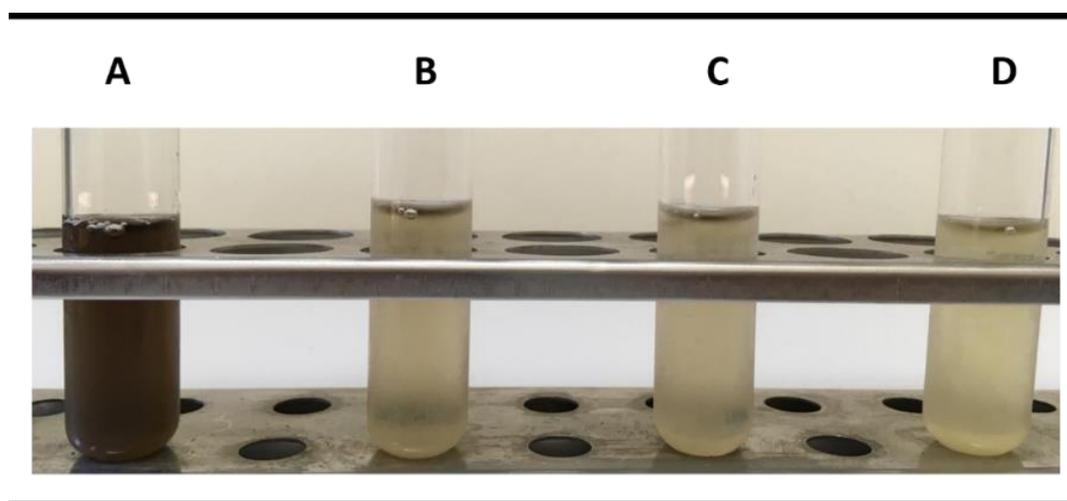


Figura 22. Cultivos de las cepas en estudio con sustratos para melanina.
A.) *B. abortus* 2308 en caldo de brucella adicionado con L-DOPA (100 nM).
B.) *B. abortus* 2308 en caldo de brucella sin L-DOPA. C.) *B. abortus* 2308

$\Delta BAB2_0534$ en caldo de brucella más L-DOPA (100 nM). D.) Caldo de brucella adicionado con L-DOPA (100 nM) a 37° C control de temperatura.

Resultado de espectros infrarrojo de pigmentos tipo melanina post extracción desde cultivos de *Brucella abortus* con diferentes sustratos.

Los cultivos de *Brucella abortus* 2308 en caldo brucella más sustratos precursores de melanina como Dopamina (L-DOPA) y Ácido Homogentísico (HA) y la combinación de ambos (L-DOPA+HA), post cultivo de 72 h a 37°C dio una coloración oscura tipo melanina que sugiere la presencia de estos pigmentos en el sobrenadante de cultivo como se describe en la **Figura 23 (A-C)**, no obstante, el cultivo de la cepa mutante con los mismos sustratos **Figura 23 (D-F)** no forma estas coloraciones oscuras.

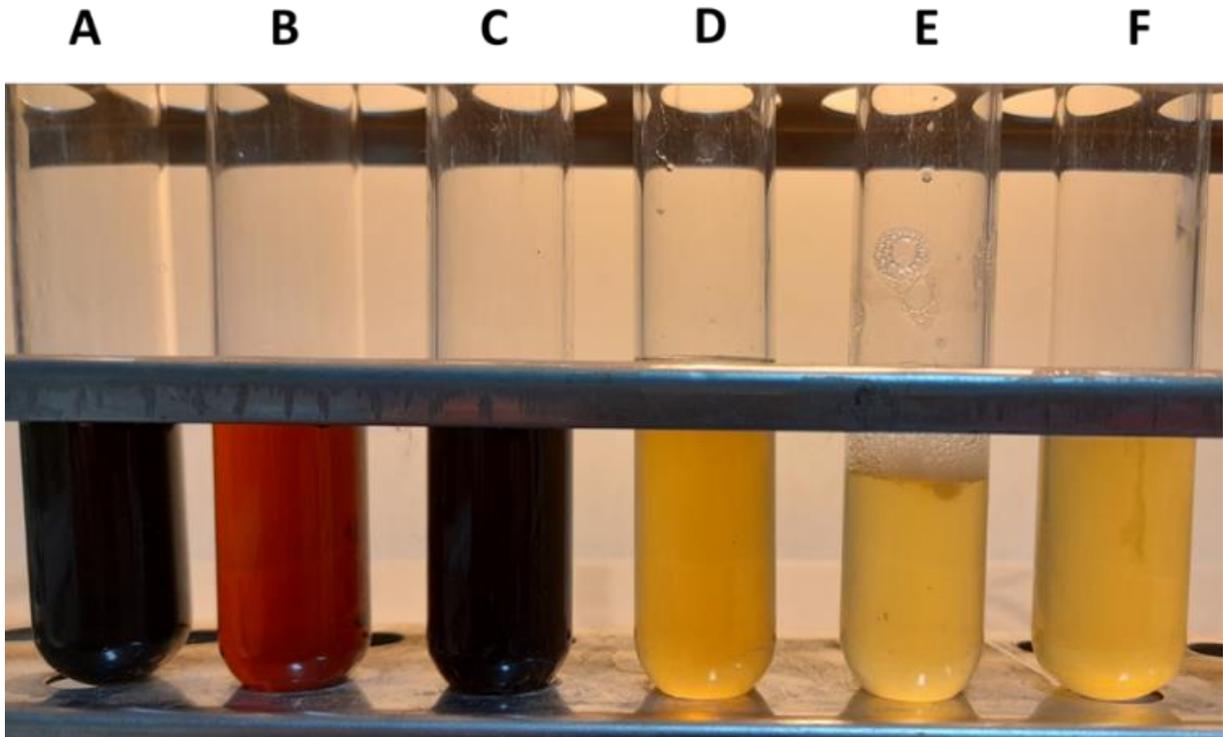


Figura 23. Cultivo de *B. abortus* 2308 y cepas mutantes para BAB2_0534

A) Cultivo de *B. abortus* 2308 con L-DOPA, **B)** Cultivo de *B. abortus* 2308 con HA **C)** Cultivo de *B. abortus* 2308 con la combinación de ambos sustratos; **D)** Cultivo de cepa mutante con L-DOPA, **E)** Cultivo de cepa mutante con HA, **F)** Cultivo de cepa mutante con ambos sustratos.

Estos pigmentos se extrajeron según protocolo modificado (Choi, 2022) y se sometieron a espectroscopia de infrarrojo. El perfil de infrarrojo del estándar de melanina, arrojó una curva típica de melaninas del **tipo eumelanina (Figura 24)** con el cual se puede comparar con los perfiles obtenidos de las muestras purificadas con los sustratos precursores de L-DOPA (**Figura 25**),

HA (**Figura 26**) y las combinación de ambos (**Figura 27**); en estos perfiles se encuentra una tendencia característica en el bandeo propio de melaninas del tipo eumelanina existiendo una diferencia marcada a los $1281,52\text{ cm}^{-1}$ presente en el estándar por lo que estaría indicando la formación de melaninas atípicas las que son comunes y están presentes en estudios de melaninas bacterianas (Zhang y col., 2022).

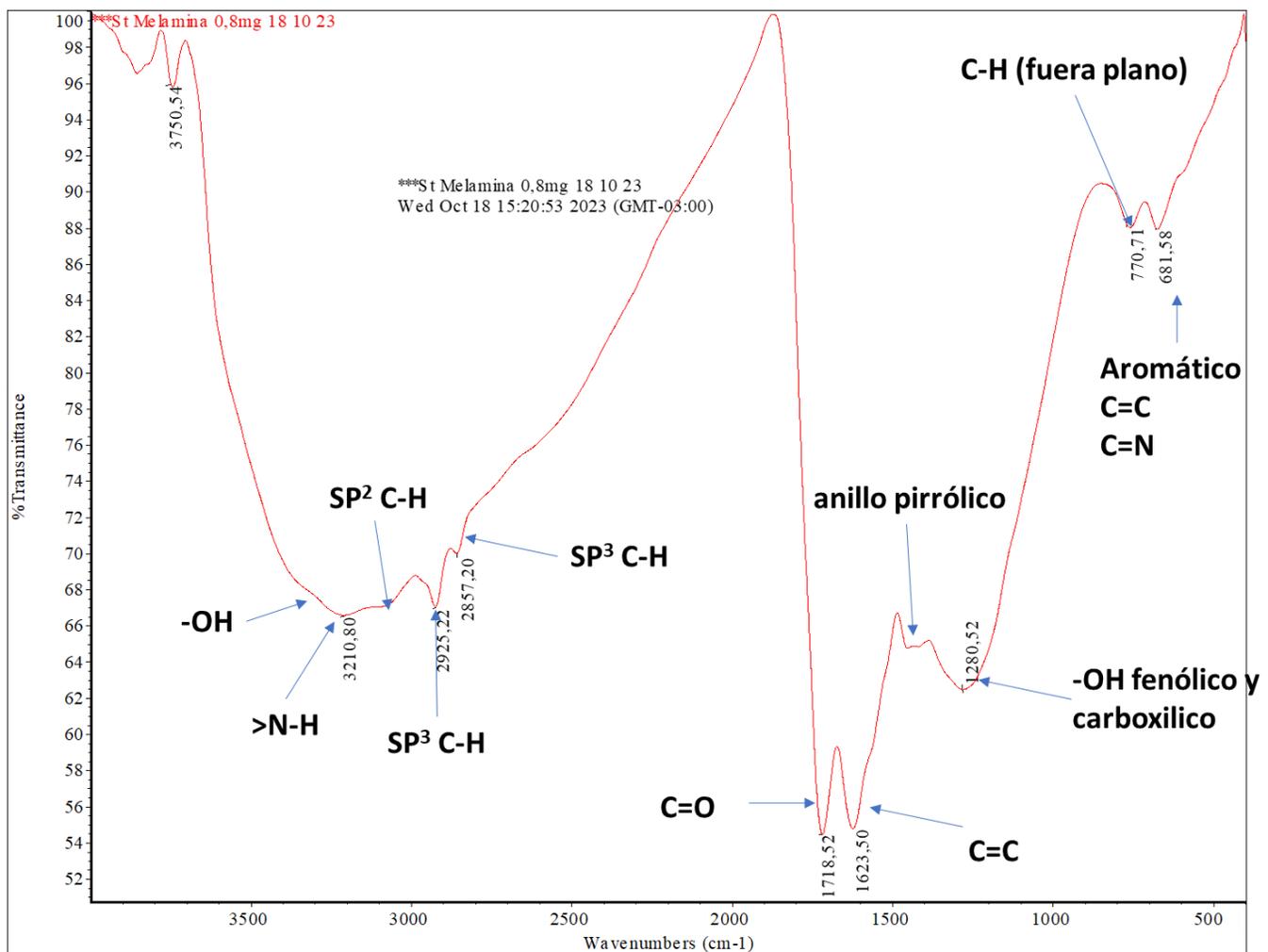


Figura 24. perfil del espectro infrarrojo de melanina comercial (eumelanina, M2649, Sigma-Aldrich). se describen en la figura grupos funcionales según su nivel de emisión en el rango del infrarrojo.

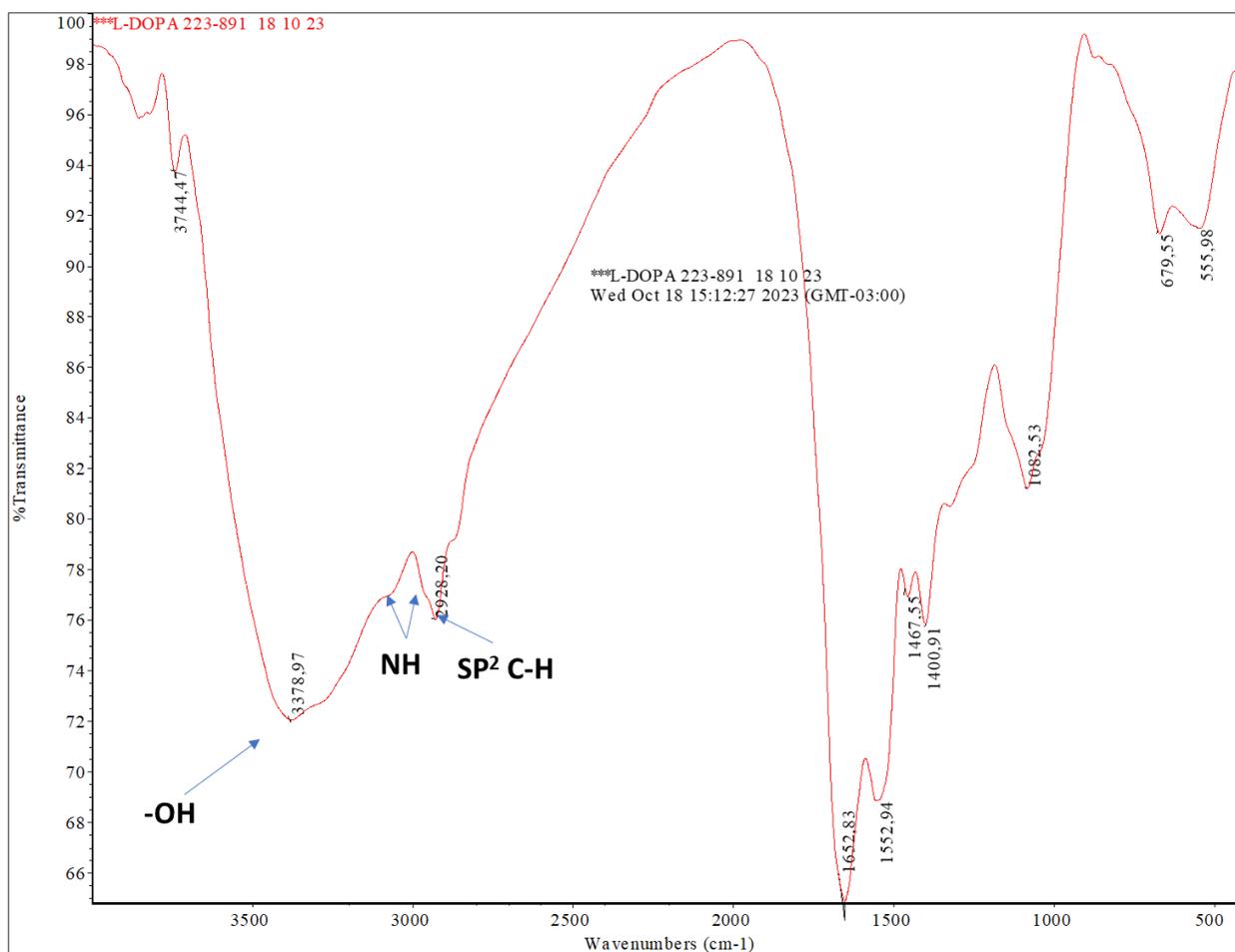


Figura 25. perfil del espectro infrarrojo obtenido desde cultivo con Dopamina (L-DOPA) como sustrato. Melanina atípica soluble presente en cultivo de *B. abortus* 2308, se aprecian emisión de enlaces tipo $SP^2 C-H$ ligeramente desplazados con relación al control.

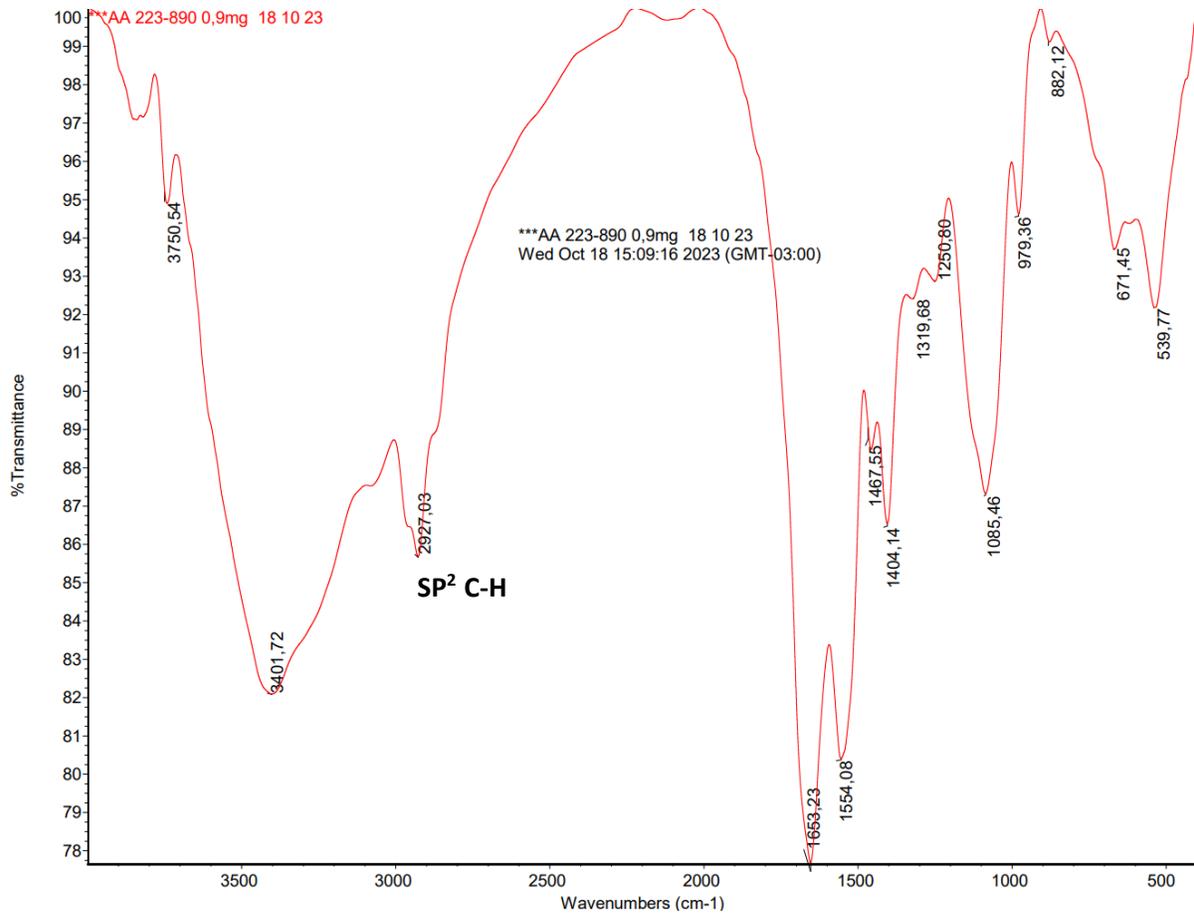


Figura 26. perfil del espectro infrarrojo obtenido desde cultivo con **Ácido Homogentísico (HA)** como sustrato. Melanina atípica soluble presente en cultivo de *B. abortus* 2308, se aprecia emisión de enlaces tipo SP² C-H ligeramente desplazados con relación al control.

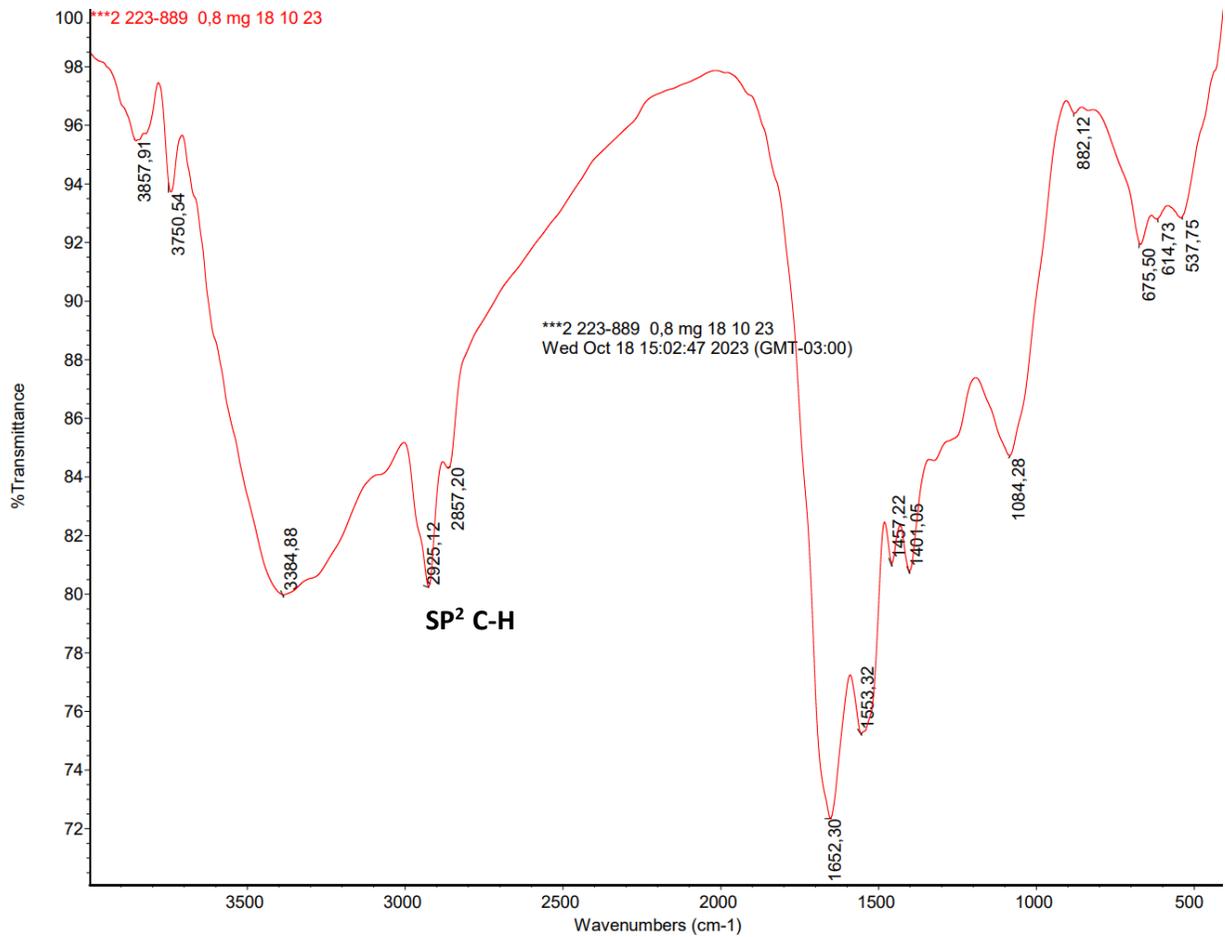


Figura 27: perfil del espectro infrarrojo obtenido desde cultivo usando como sustrato HA y L-DOPA. Melanina atípica soluble presente en cultivo de *B. abortus* 2308, se aprecian emisión de enlaces tipo SP² C-H ligeramente desplazados con relación al control.

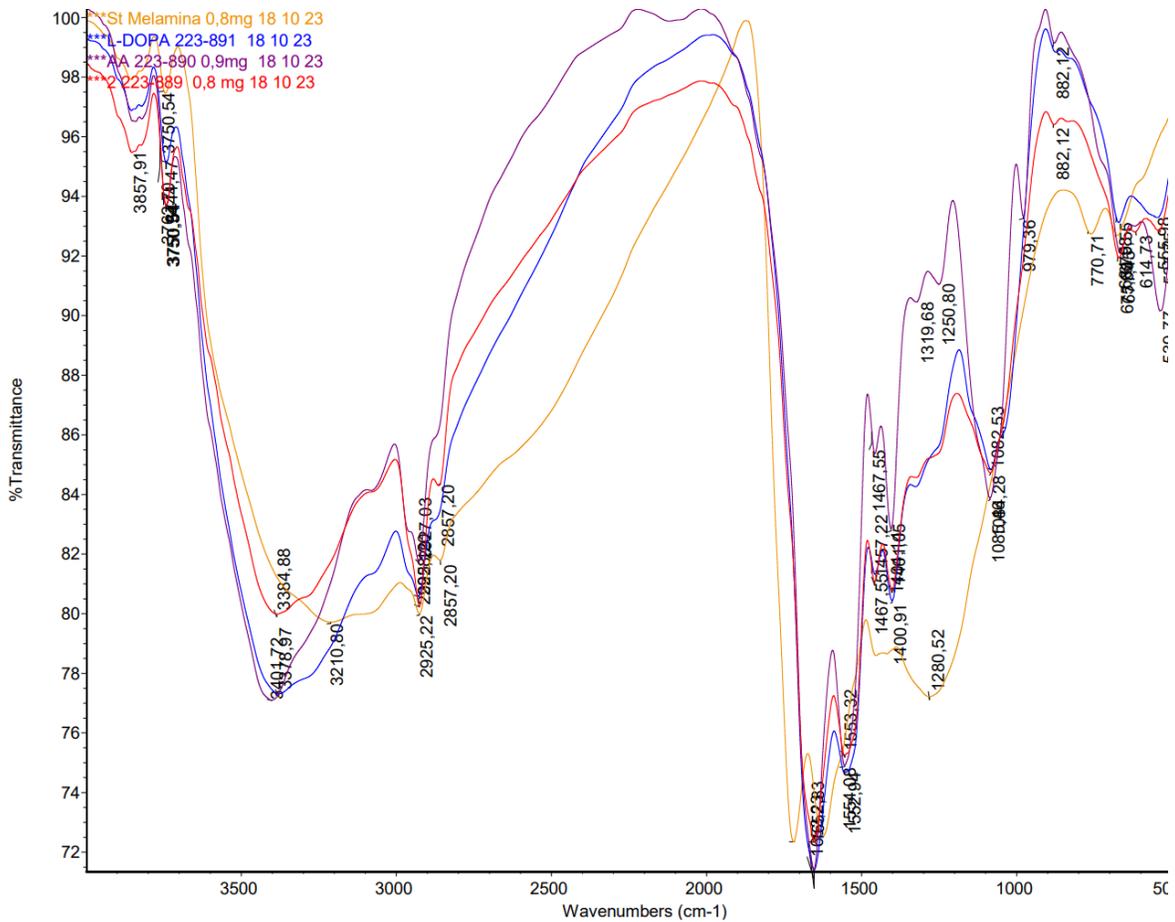


Figura 28. Superposición de espectros de infrarrojo con el estándar de melanina.

Se aprecia la tendencia estructural y de grupos funcionales en relación al estándar de melanina con la diferencia relativa a los 1280,52 cm⁻¹ dejando de manifiesto la estructura principal de los pigmentos corresponden a melaninas modificadas.

Análisis histológico de órganos de ratones infectados con cepas *Brucella* en estudio para pesquisa de melanina.

Al revisar por microscopía los cortes histológicos de corteza cerebral, hígado, bazo y riñón tomados de ratones hembras BALB/c y testículos de ratones machos BALB/c infectados con las cepas de estudio; se da con un hallazgo importante, la aparición de un pigmento tipo melanina presente en los cortes de hígado, testículo y cerebro; no obstante, la pesquisa de estos pigmentos en los otros tejidos se hace difícil de observar debido a la cantidad de restos celulares que pueden dar resultados inciertos y falsos positivos (Hemosiderina y Lipofuscina asociada a la tinción) debido a la técnica utilizada comúnmente para la tinción de melanina (Fontana-Masson) que hace insuficiente la certeza del análisis.

Para evitar un error analítico en el estudio se realizó tinción previa de los mismos tejidos con técnica Hematoxilina-Eosina, con el objetivo de apreciar la tinción de fucsina y hemosiderina. Conociendo la tinción de estos falsos positivos es posible descartarlos de la tinción presente para melanina en el mismo tejido. Con lo anterior es posible evidenciar que el control sano no presenta lesiones tisulares ni infiltración celular (**Figura 29 A**), por otro lado;

los tejidos en estudio infectados con las cepas de *Brucella* se observan con lesiones tisulares e infiltración celular (**Figura 29 B, C, D**).

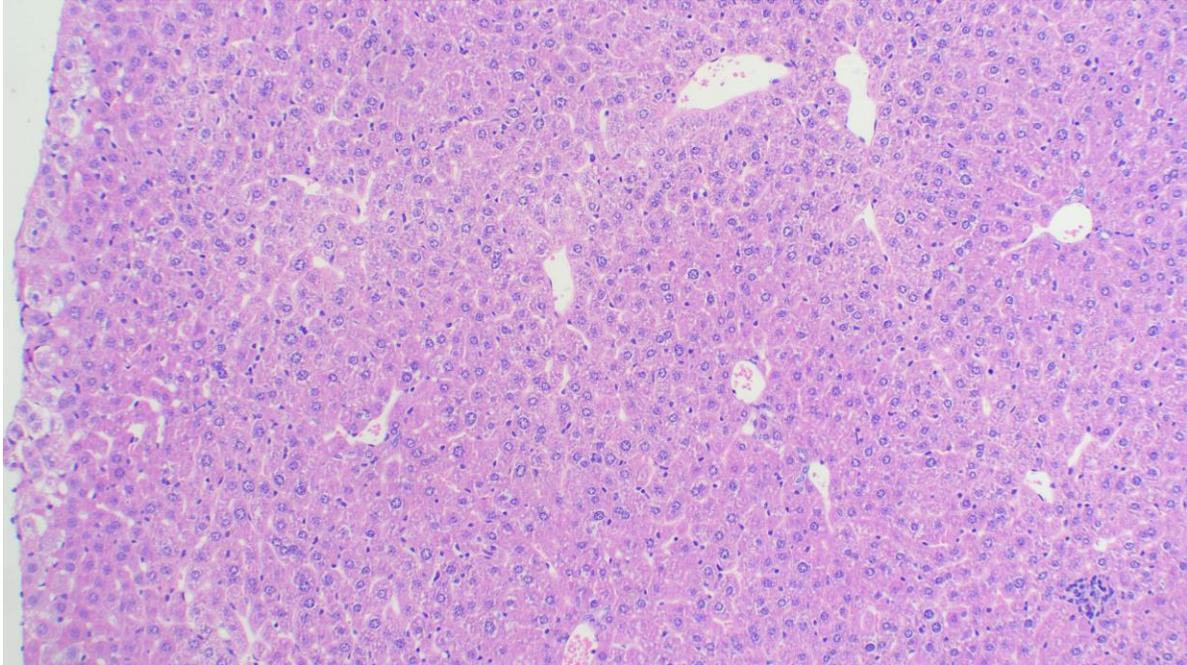


Figura 29 A. Muestra Control de Hígado BALB/c sano. Técnica Hematoxilina-eosina (10X). Parénquima hepático sin lesiones.

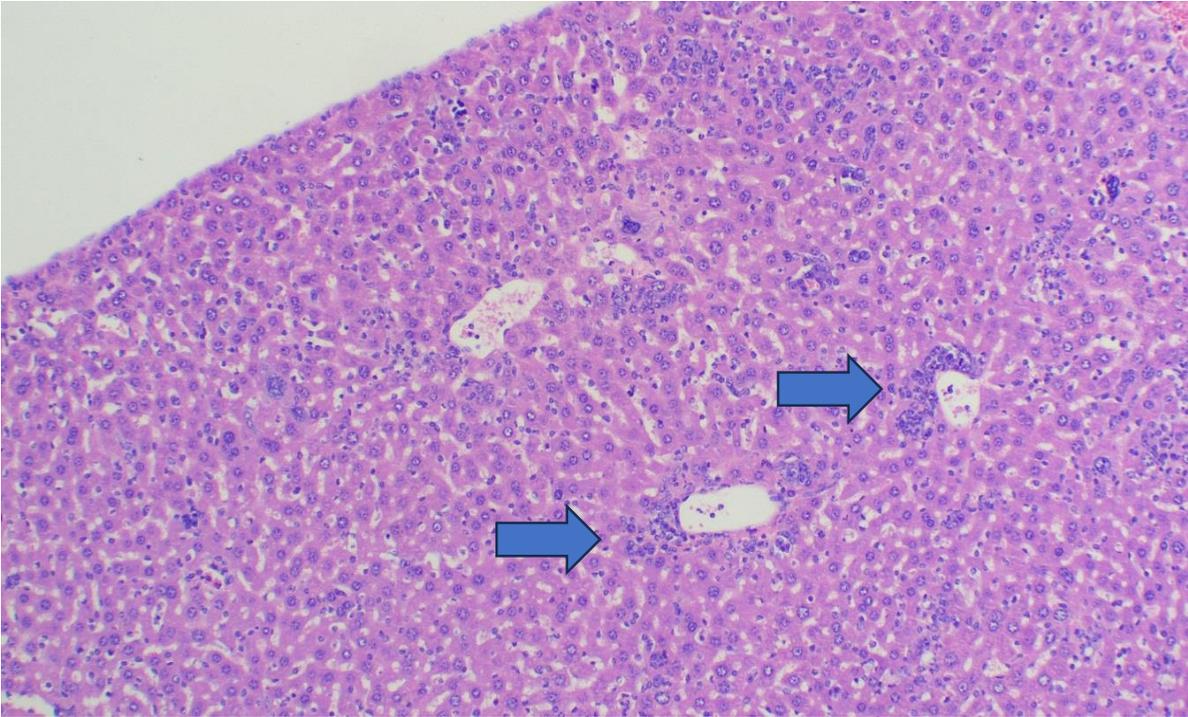


Figura 29 B. Muestra Corte de Hígado BALB/c infectado con *B. abortus* 2308 (infectada) Hematoxilina-eosina (10X). Gránulos basófilos en los hepatocitos peri-vénula hepática central, más presencia de infiltrado de linfocitos.

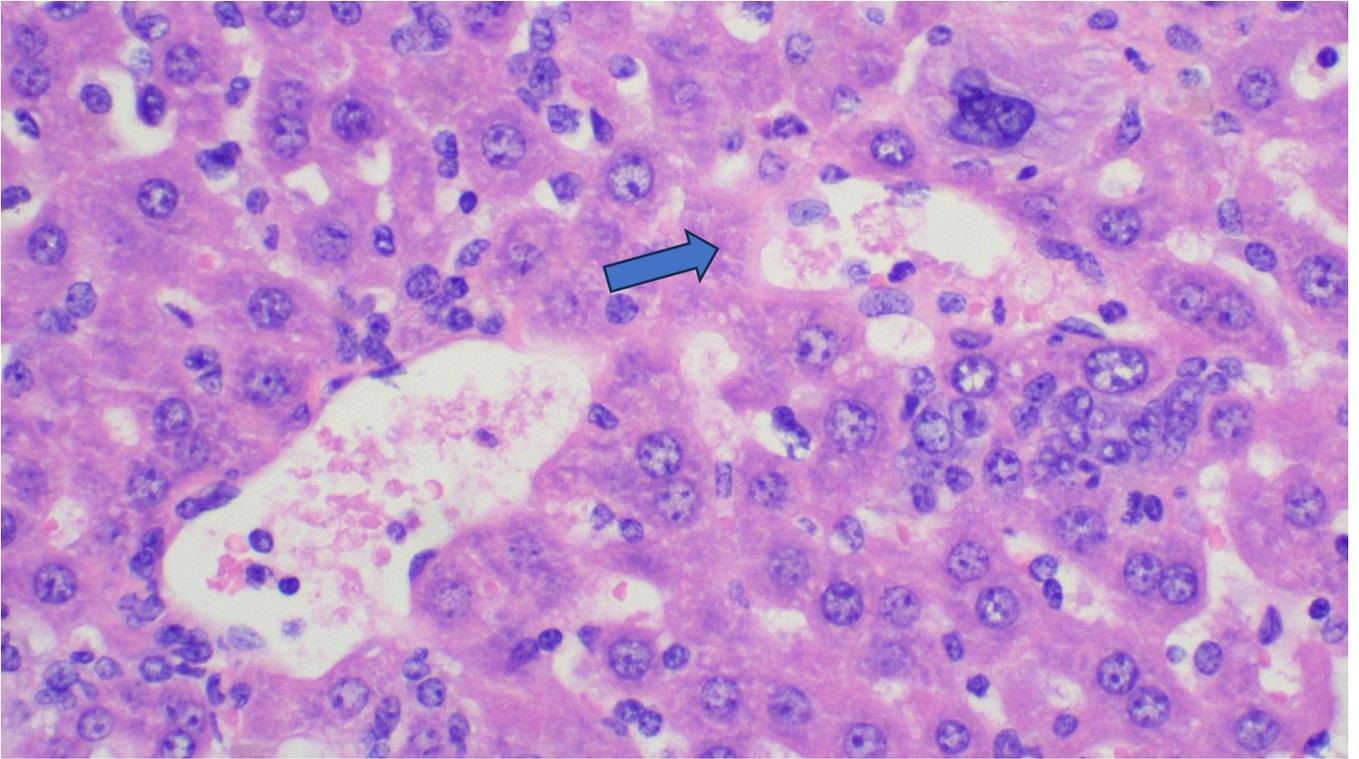


Figura 29 C. Muestra Corte de Hígado BALB/c infectado con *B. abortus* 2308 (infectada) Hematoxilina-eosina (40X). Gránulos basófilos en los hepatocitos peri-vénula hepática central, presencia de infiltrado de linfocitos.

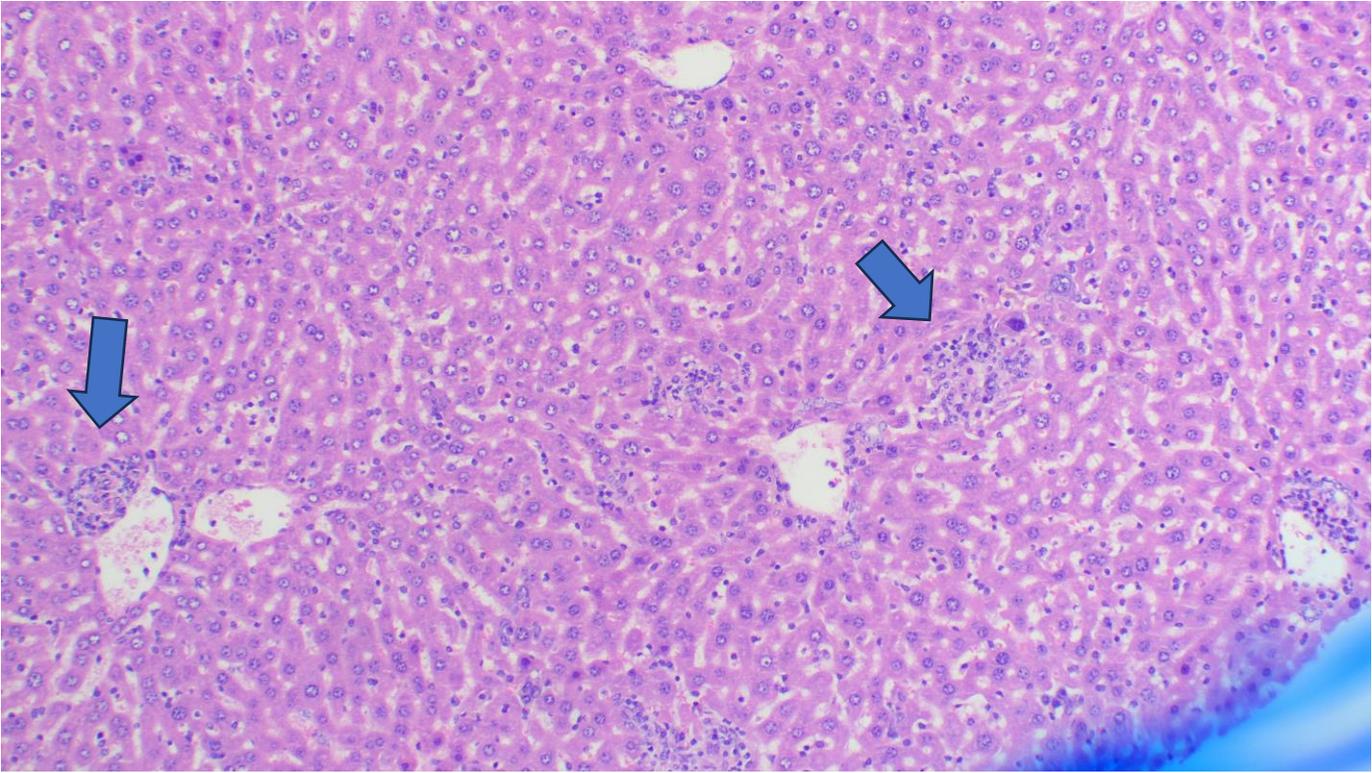


Figura 29 D. Muestra Corte de Hígado BALB/c infectado con *B. abortus* 2308 Δ BAB2_0534 (infectada) Hematoxilina-eosina (10X). Infiltrado mononuclear alrededor de las vénulas hepáticas terminales, que se disponen de forma parcheada en la muestra.

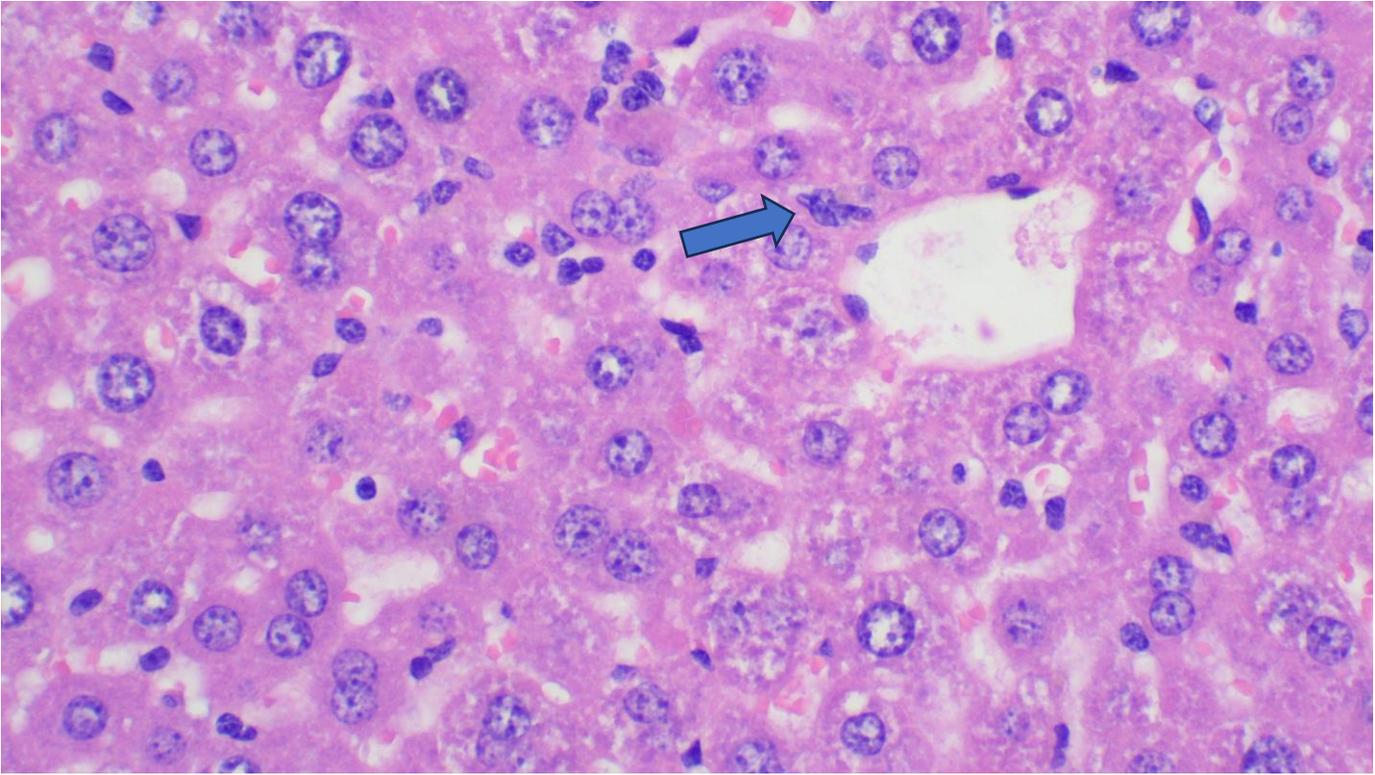


Figura 29 E. Muestra Corte de Hígado BALB/c infectado con *B. abortus* 2308. Δ BAB2_0534 Técnica Hematoxilina-eosina (40X). Presencia de un pigmento basófilo al interior de los hepatocitos en sectores perivenulares, que no marca como lipofuscina.

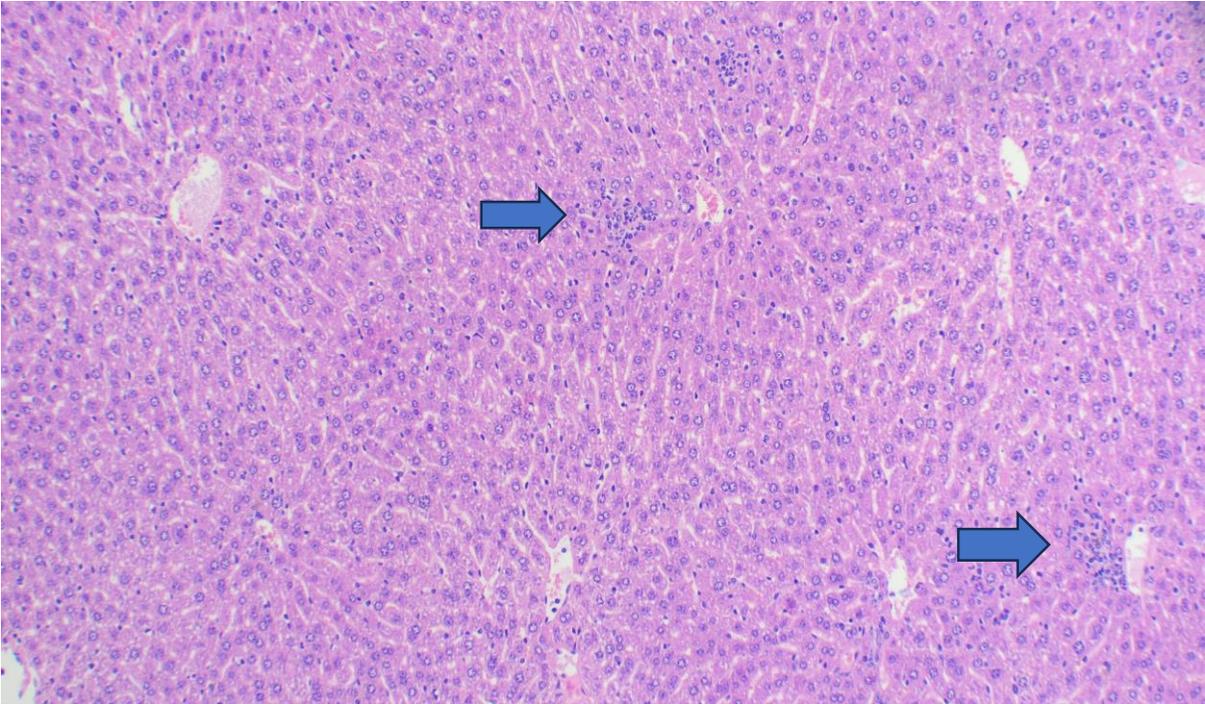


Figura 29 F. Muestra Corte de Hígado BALB/c infectado con *B. abortus* Δ BAB2_0534 (pVB1- *BAB2_0534*). Hematoxilina eosina (10X). Leve Infiltrado mononuclear alrededor de las vénulas hepáticas terminales, que se disponen de forma parcheada en la muestra.

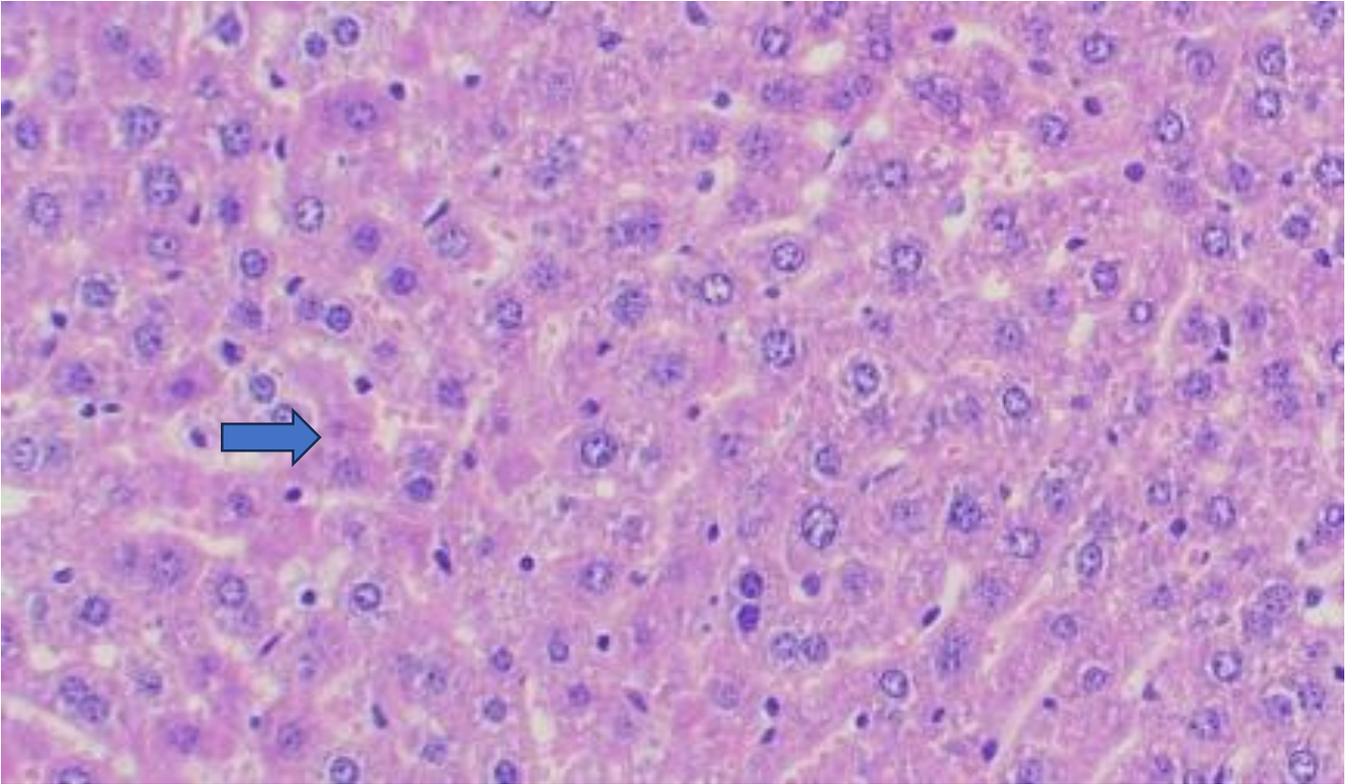


Figura 29 G. Muestra Corte de Hígado BALB/c infectado con *B. abortus* Δ BAB2_0534 (pVB1- BAB2_0534). Hematoxilina eosina (10X). Se aprecia Infiltrado mononuclear, no se ven marcas relativas a lipofuscina ni hemosiderina.

Las muestras de tejido se sometieron a tinción por técnica de Fontana-Masson que tiñe melanina. La melanina tiene la capacidad de reducir las soluciones de nitrato de plata amoniacal a plata metálica sin necesidad de utilizar un agente reductor externo siendo esto la base de la tinción utilizada.

En los siguientes cortes (**Figura 30 A, B, C, D**) de tejido de hepático es posible evidenciar un pigmento dispuesto a niveles perivenulares del

parénquima que no pertenece a lipofuscina ni hemosiderina, y que, si bien no es una tinción propia a la plata metálica presente en este tipo de técnica, se trata de una melanina atípica ya que esta no está presente en el control sano sin infectar.

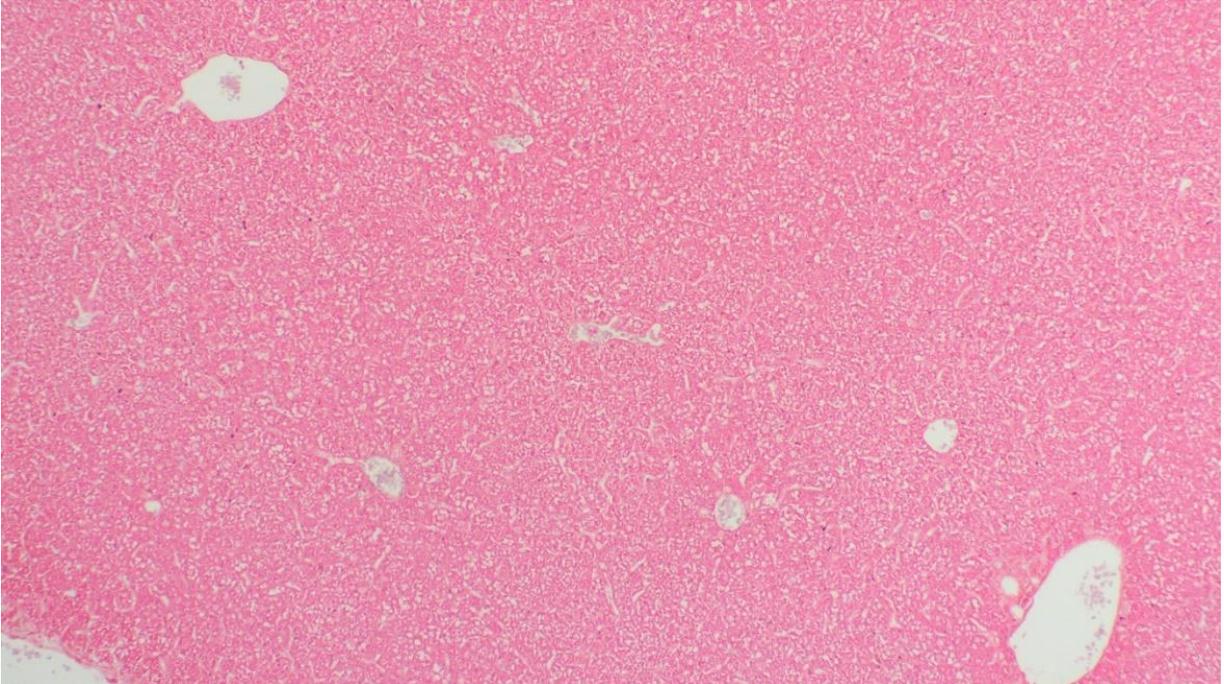


Figura 30 A. Muestra Control Sano. Corte de Hígado BALB/c Técnica Fontana-Masson (10X). Sin lesiones de ni un tipo.

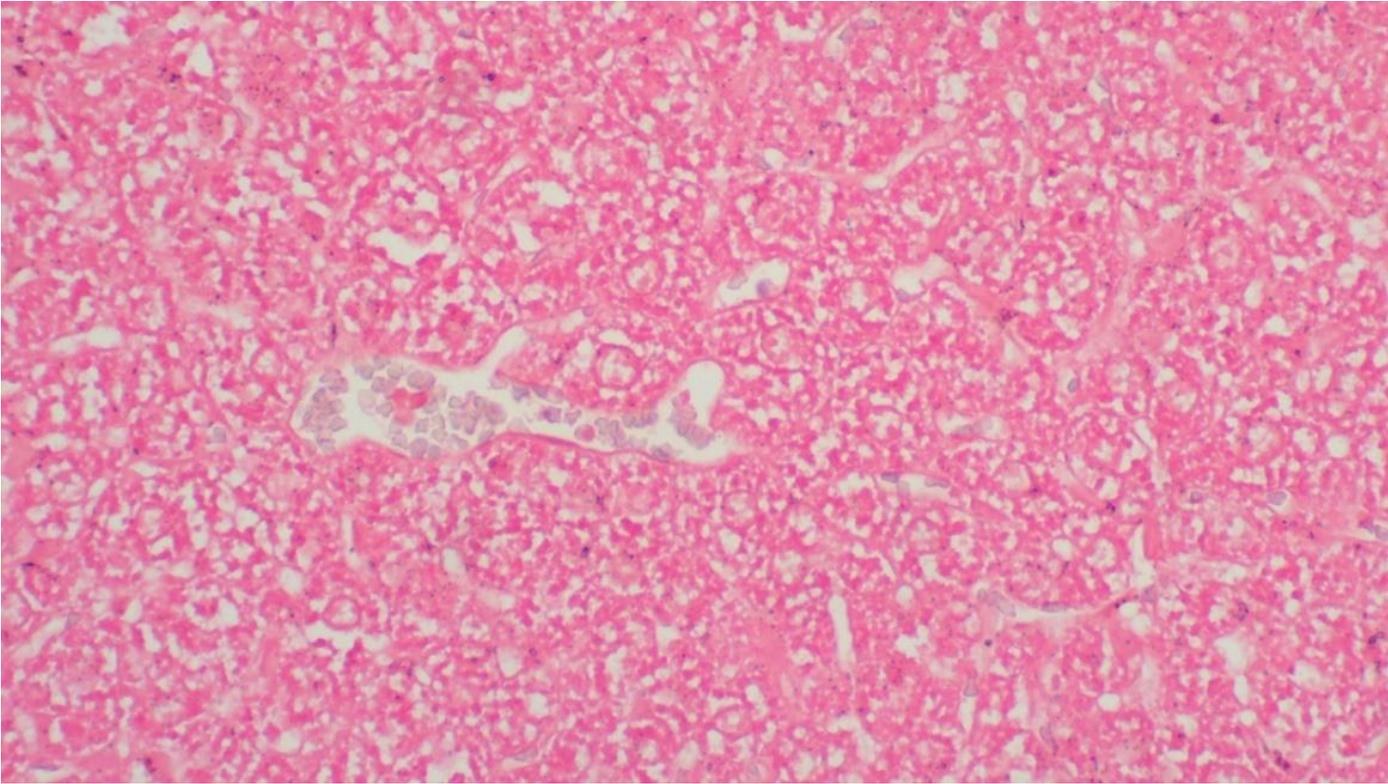


Figura 30 B. Muestra Control Sano. Corte de Hígado BALB/c Técnica Fontana-Masson (40X). Sin lesiones a nivel perivenulares.

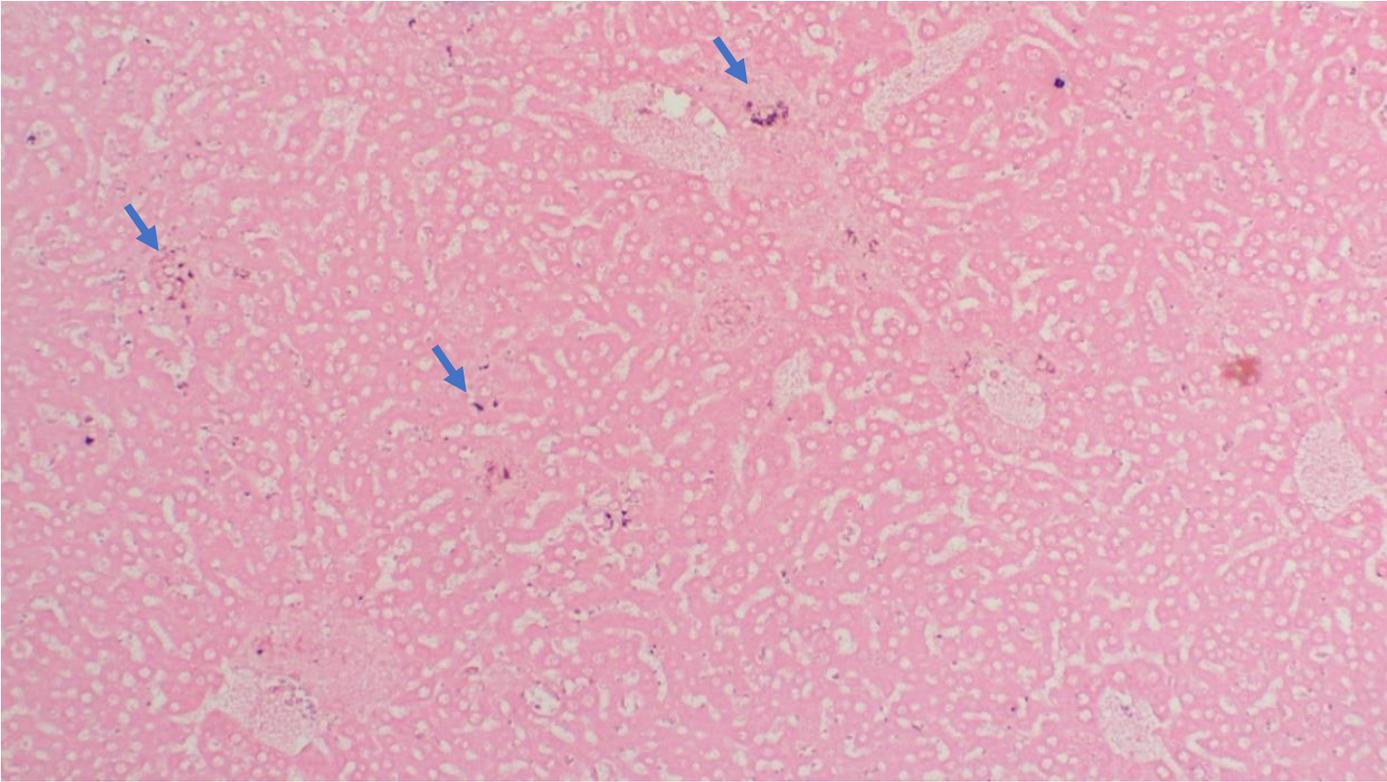


Figura 30 C. Muestra Infectada *B. abortus* 2308. Corte de Hígado BALB/c Técnica Fontana-Masson (10X). Acumulación de pigmento tipo melanina en el parénquima hepático (Flecha).

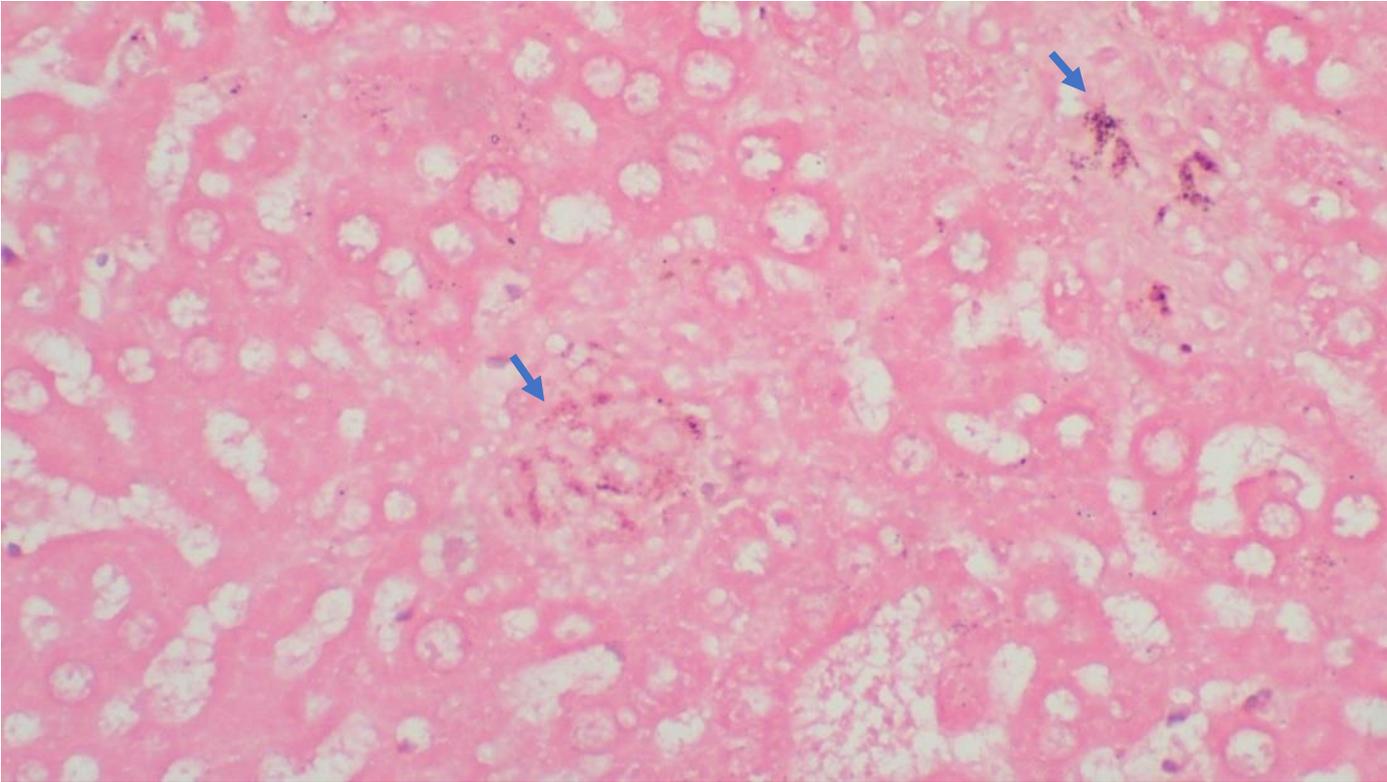


Figura 30 D. Muestra Infectada *B. abortus* 2308. Corte de Hígado BALB/c Técnica Fontana-Masson (40X). Acumulación de pigmento tipo melanina en el parénquima hepático (Flecha).

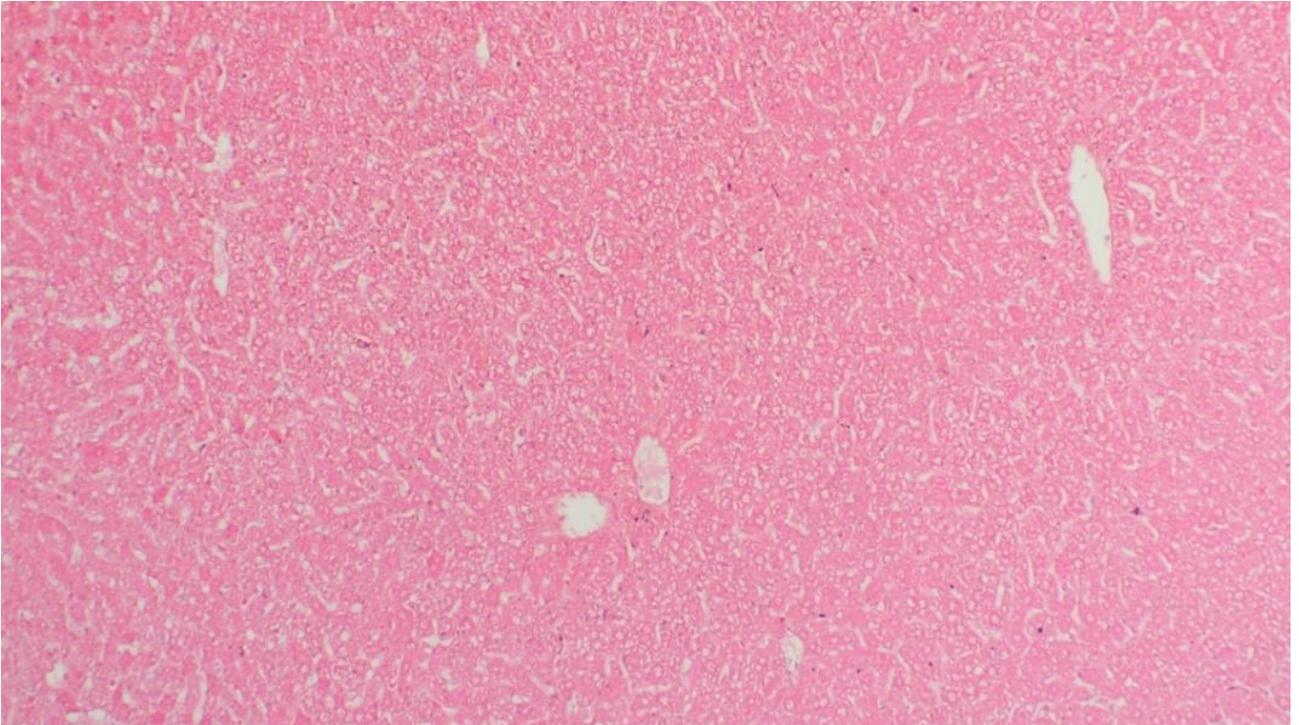


Figura 30 E. Muestra Infectada *B. abortus* 2308 Δ BAB2_0534. Corte de Hígado BALB/c Técnica Fontana-Masson (10X). Se observa tejido infiltrado y estrés epitelial pero no se observan lesiones importante ni pigmentos.

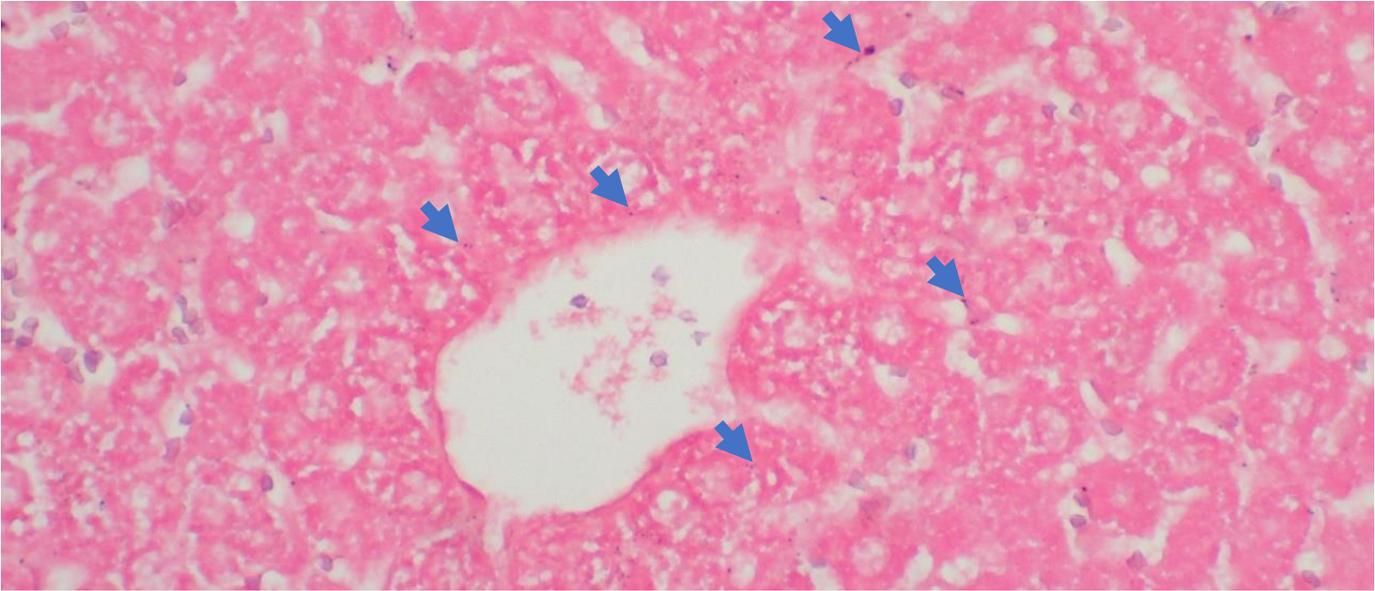


Figura 30 F. Muestra Infectada *B. abortus* Δ BAB2_0534. Corte de Hígado BALB/c Técnica Fontana-Masson (40X). Acumulación escasa de pigmento tipo melanina (Flecha). Punteado fino intracitoplasmático en los hepatocitos alrededor de la vénula hepática central (flecha).

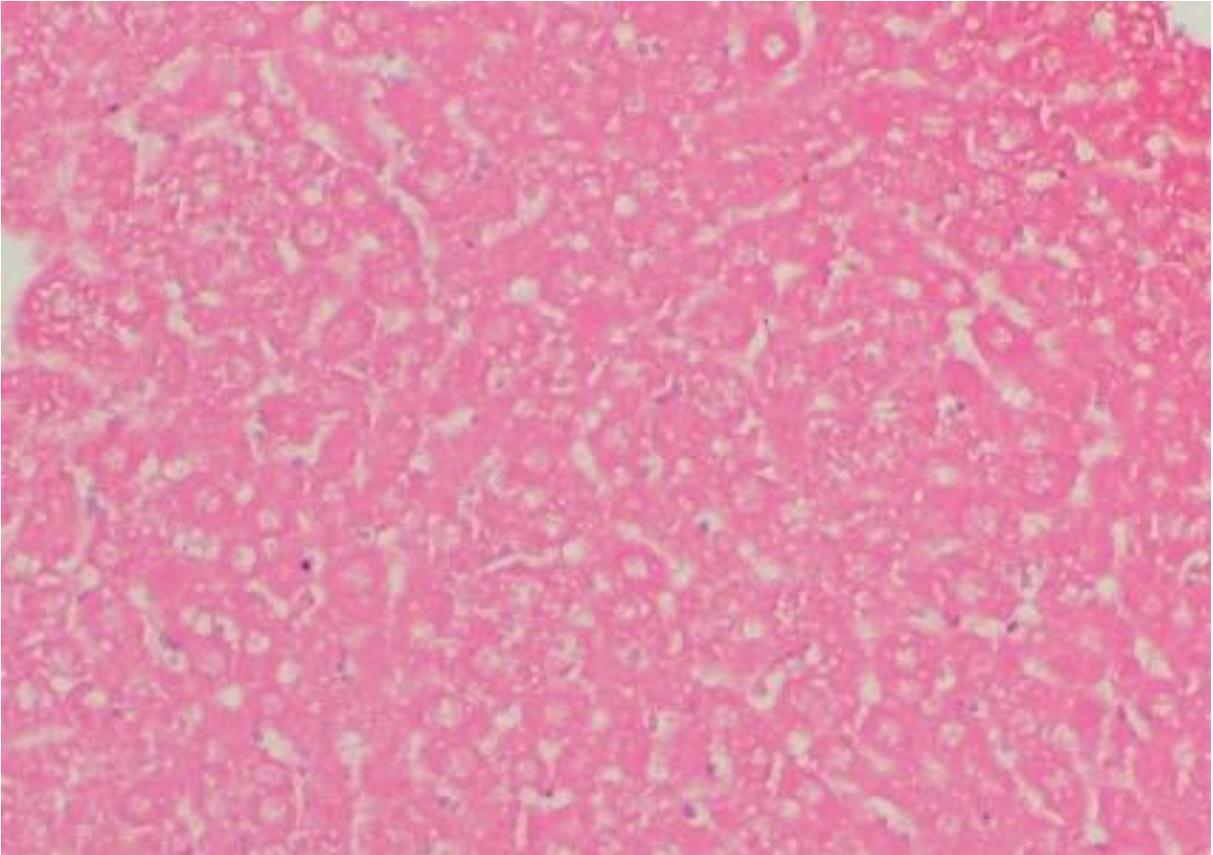


Figura 30 G. Muestra Infectada *B. abortus* 2308 Δ BAB2_0534. Corte de Hígado BALB/c Técnica Fontana-Masson (40X). Se observa tejido infiltrado y estrés epitelial pero no lesiones ni pigmentos.

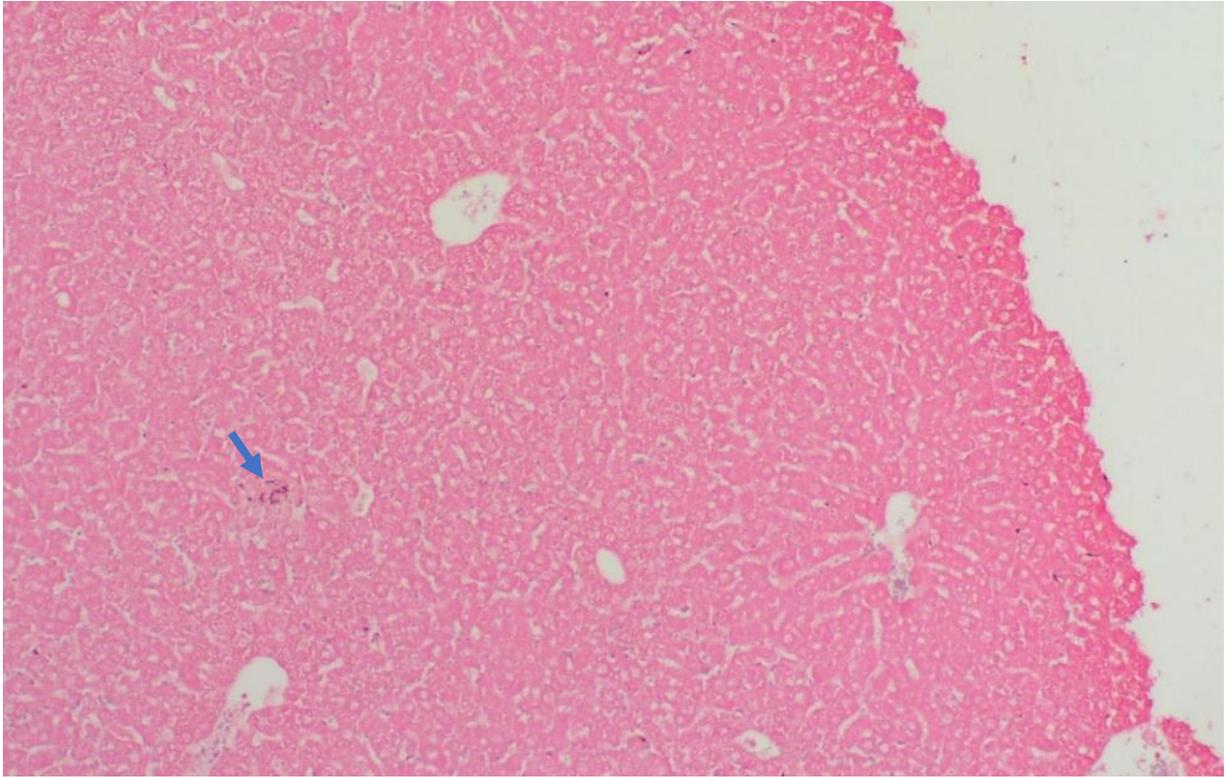


Figura 30 H. Muestra Infectada *B. abortus* ΔBAB2_0534 (pVB1-BAB2_0534). Corte de Hígado BALB/c Técnica Fontana-Masson (10X). Acumulación escasa de pigmento tipo melanina (Flecha).

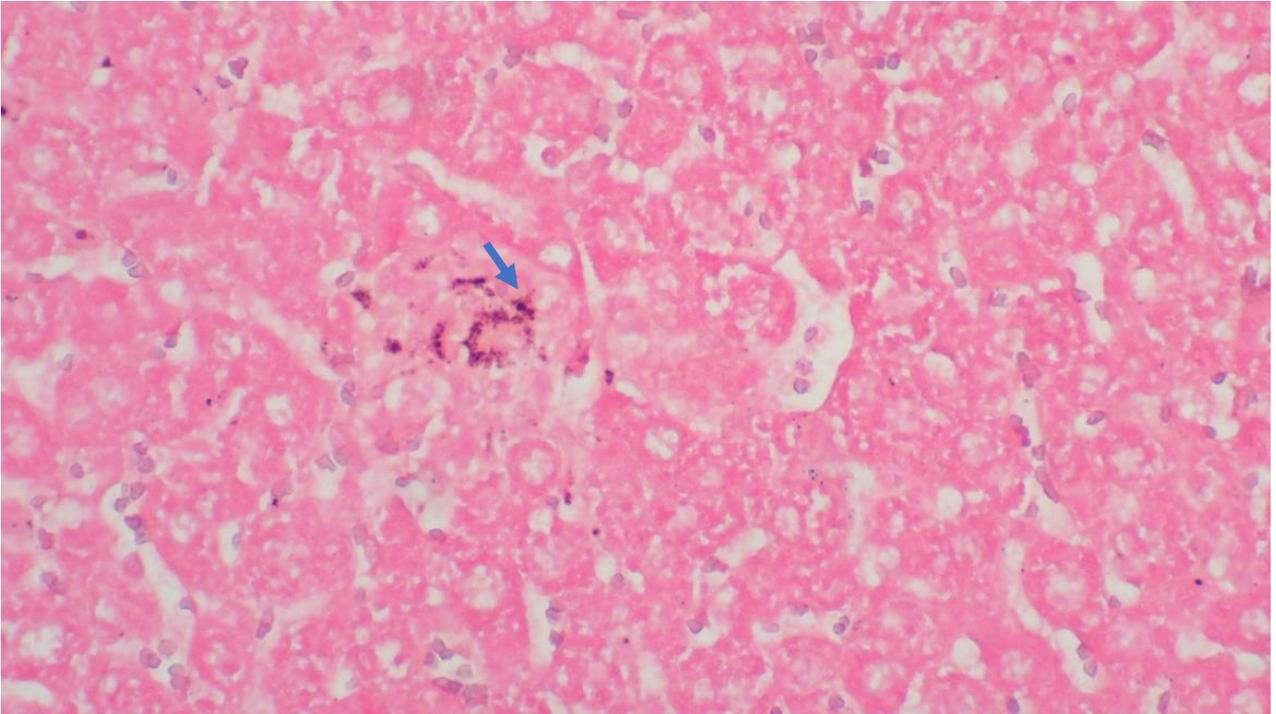


Figura 30 I. Muestra Infectada *B. abortus* Δ*BAB2_0534* (pVB1-*BAB2_0534*). Corte de Hígado BALB/c Técnica Fontana-Masson (40X). Acumulación escasa de pigmento tipo melanina (Flecha).

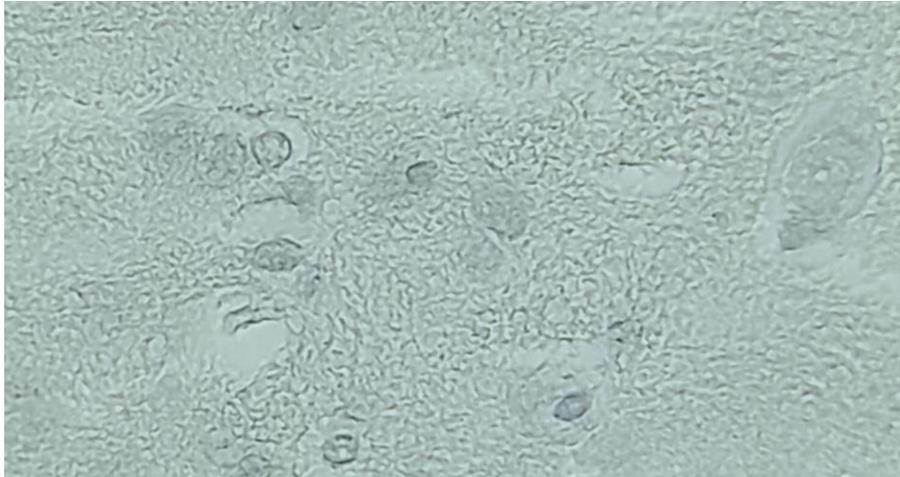


Figura 32 A1. Muestra (40X) Control Sano. Corte de Cerebro corteza BALB/c Técnica Método Schmorl. Acumulación escasa de pigmento tipo melanina (Flecha).

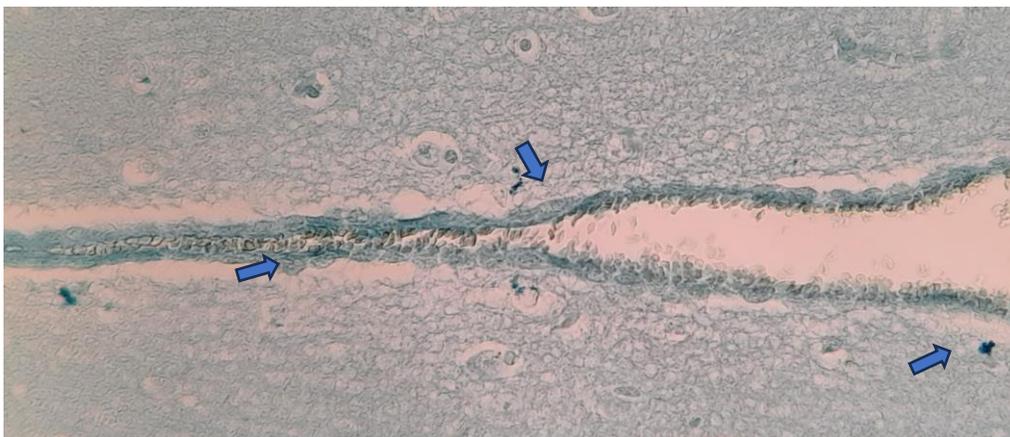


Figura 32 A2. Muestra (10X) Infectada *B. abortus* 2308. Corte de Cerebro corteza BALB/c Técnica Método Schmorl. Corte sagital ependimario sección cervical. Acumulación escasa de pigmento tipo melanina (Flecha).

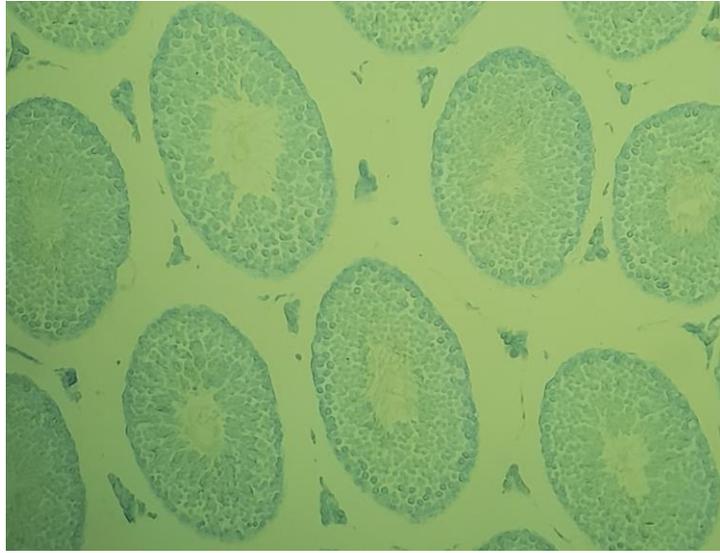


Figura 34 A1. Muestra (10X) Control sano. Corte sagital de testículo macho BALB/c. Técnica Método Schmorl. No existen pigmentos tipo melanina en el intersticio de túbulos seminíferos.



Figura 34 A2. Muestra (10X) Infectado con *B. abortus* 2308. Corte sagital de testículo macho BALB/c. Técnica Método Schmorl. Existen pigmentos tipo melanina en el intersticio de los túbulos seminíferos perivasculares y en su epitelio.

Como conclusión de esta experiencia existe evidencia que hay muestras de infiltración celular en el tegumento de órganos infectados por las cepas bacterianas en estudio, por lo que se desprende que la bacteria mutante en estudio y la complementada no pierden su capacidad infectiva. En las tinciones realizadas con Hematoxilina-Eosina es posible diferenciar de manera clara que los pigmentos relacionados con fucsina y hemosiderina no coinciden bajo la misma técnica con los pigmentos tipo de melanina realizados con Fontanna- Masson, descartando un falso positivo mediante esta técnica. Según esta última tinción mencionada existe presencia de un pigmento tipo melanina que es posible sólo identificarlo en el parénquima hepático y no en otros tejidos en estudio, esto debido por la poca visibilidad de éste entre los cuerpos figurados de los diferentes órganos, la escasa seguridad de acierto entre muchos elementos que pueden dar falsos positivos.

Como resultado final se señala que existe un pigmento tipo melanina (tinción realizada con técnica Fontana-Masson) en el parénquima hepático infectados con las cepas en estudio de *Brucella*, este pigmento no está presente en el control sano.

Discusión.

Brucella abortus 2308 es una bacteria Gram negativa, descrita como inmóvil, cocobacilar, crecimiento lento y patógeno intracelular facultativo que posee factores de virulencia no clásicos (Byndloss y col., 2016). Para la invasión y evasión de la respuesta inmune del hospedador, permitiéndole sobrevivir y replicarse en nichos intracelulares (Gheibi y col., 2018). Durante las últimas décadas, se han descubierto nuevos y diferentes elementos asociados a la virulencia de *Brucella* (Byndloss y col., 2016). Los componentes superficiales de la bacteria son claramente críticos en la primera etapa de la interacción entre el huésped y el parásito intracelular ya que la bacteria una vez que ha alcanzado el medio intracelular, desarrolla estrategias para su supervivencia; por ejemplo, la interferencia en la formación del fagolisosoma y modificación del tránsito intracelular (Kambareb y col., 2023). Uno de los factores de virulencia más estudiados en *Brucella* ha sido el lipopolisacárido (LPS), que forma parte de la pared celular y tiene probablemente un papel sustancial en la adherencia y supervivencia intracelular (Cardoso y col., 2006).

Además, es portador de los antígenos inmunodominantes de *Brucella*, por lo que se le considera responsable de la activación de los linfocitos B (LB) y de la inducción de la respuesta inmune humoral; en muchos casos es causante de

los síntomas de choque séptico por la actividad endotóxica de la *Brucella* (Smith y col., 2018).

El estudio de nuevas proteínas que puedan estar relacionadas a la capacidad que tiene *Brucella abortus* de mejorar su performance al momento de establecerse dentro de células hospedadoras resulta de suma importancia para lograr conocer más factores de virulencia que resulten implicados en tales eventos.

Así, por ejemplo, las multicobre oxidadas se encuentran ampliamente expresadas en varias bacterias y juegan un papel importante en la tolerancia al cobre (Grass y Rensing., 2001; Hall y col., 2008; Achard y col., 2010; Rowland y Niederweis., 2013). *Brucella abortus* 2308 posee una proteína multicobreoxidasa tipo lacasa codificada por el marco de lectura BAB2_0534 que por sus características morfofuncionales amerita este estudio profundo de tal manera lograr ver que su producto génico sea un factor de virulencia y ver como *Brucella* se comporta en ausencia de esta proteína.

El alto número de proteínas con las que ésta interacciona y el alto porcentaje de dominios y secuencias conservadas permite explicar su comportamiento en el crecimiento ocupando un rol importante en la propia fisiología de la bacteria, siendo una proteína cobreoxidasa involucrada en la oxidación de

compuestos fenólicos o indólicos, también está relacionada a procesos involucrados en la patogenia e instalación en el hospedador con una estrecha relación a diferentes niveles metabólicos con la Permeasa de hierro FTR1 (BAB2_0838), Proteína de cobre azul (tipo 1) Amicianina: Plastocianina (BAB2_0921) y *gltB* o Glutamato sintasa (BAB2_0053) entre otras.

Los resultados obtenidos en este trabajo a nivel bioinformático permiten conocer las diferentes relaciones con otras proteínas en donde un análisis comparativo muestra que, la proteína codificada por BAB2_0534 de *B. abortus* 2308 es una proteína de 631 aminoácidos y que los tres dominios que posee son similares a la plastocianina una proteína sideróforo conservada con una gran homología en su ancestro *Orobachtrum* spp. (Moreno y col., 2022).

Aquí se demuestra que la eliminación del marco de lectura BAB2_0534 (que codifica a una proteína multicobroxidasa tipo lacasa (Q2YKW0) está involucrada en procesos de uniones a iones de cobre) y esta eliminación no fue letal para la cepa *B. abortus* 2308. La expresión del marco de lectura BAB2_0534 parece estar regulada a diferentes niveles del metabolismo de *B. abortus*, ya que la endorribonucleasa RNaseE coordina la expresión de ARNm y pequeños ARN reguladores y es crítica para la virulencia de *B. abortus* ya que al aumentar la expresión de RNaseE aumenta la expresión de

BAB2_0534, mecanismo esencial para la virulencia de *B. abortus* (Sheehan y col., 2020).

Lo anterior está en estricta relación a los ensayos de crecimiento realizados, *in vitro*, *in vivo* y en condiciones de estrés (medio con concentraciones crecientes de cobre) podemos señalar que el producto génico de BAB2_0534 resulta una proteína que participa activamente en el crecimiento de la bacteria ya que *in vitro* su tasa de crecimiento es más lenta.

Lo anterior se observó por una menor capacidad de adaptación a la fase de latencia al comienzo de la fase exponencial así como en el crecimiento en hospedadores celulares epiteliales (células Hela) y en células macrofágicas (RAW 246.7) siendo esto último importante, en consecuencia estaría participando también en el establecimiento del nicho replicativo o en otros procesos de alta significancia para establecerse dentro de la célula hospedadora.

Lo anterior revela que al estar ausente esta proteína, la cepa de *Brucella* mutante al crecer en caldo brucella en condiciones normales sufre un retraso en su crecimiento en comparación a la bacteria control y su complementada.

La proteína expresada desde BAB2_0534 influye directamente en la fisiología de *B. abortus* mutante reduciendo significativamente la supervivencia

intracelular en células fagocíticas profesionales y no profesionales. Además, en células epiteliales y macrófagos *B. abortus* mutante para BAB2_0534 no pudo alcanzar su nicho replicativo.

En primera instancia, esto nos lleva a pensar que el producto génico de BAB2_0534 es un factor de virulencia cuya delección condiciona a la cepa mutante a ser más susceptible de ser transportada hacia los compartimentos lisosomales con su posterior degradación, o que la proteína que codifica este gen tenga alguna función enzimática dejando algún producto que permita la supervivencia a nivel intracelular. Esta ruta de degradación lisosomal mencionada también ha sido reportada en varios mutantes de *Brucella* para factores de virulencia importantes tales como β -1,2-glucanos cíclicos (C β Gs), LPS o genes virB que codifican el sistema de secreción tipo IV (Celli y col., 2003; Haag y col., 2010; Gomes y col., 2013).

Con esto es posible concluir que la delección del marco de lectura BAB2_0534, afecta la habilidad de *B. abortus* de alcanzar el nicho replicativo en el huésped eucarionte tanto en macrófagos como células epiteliales.

La delección del gen BAB2_0534 mostró un papel importante en la adherencia a la superficie del poliestireno lo que demostraría que la proteína en cuestión participa en la adherencia o en la secreción de proteínas involucradas en el

proceso de formación de biomasa adherente. Una adherencia bacteriana reducida afectaría negativamente la colonización de los tejidos del huésped (Klemm y col., 2010).

En este proceso, varias bacterias producen biopelícula, una estructura que no ha sido descrita en *B. abortus*, pero que está asociada a señales de comunicación inter y extracelular proceso también llamado de Quorum Sensing (VjbR) (Coloma-Rivero y col., 2022, Taminiau y col.,2002; Delrue y col., 2005).

Estas observaciones apoyarían la idea de que la formación de la biomasa adherida está en estrecha relación al producto génico de BAB2_0534 de *B. abortus* 2308 participando en el ciclo de vida normal de *B. abortus* 2308.

Investigamos la expresión de la proteína codificada por el marco de lectura BAB2_0534 en presencia de cantidades definidas de cobre en donde se propuso la hipótesis de que la expresión del gen BAB2_0534 podría ser activada por un cambio en el medio ambiente que pueda estresar el normal crecimiento de la bacteria.

Para ello se sometió al crecimiento de la *B. abortus* 2308 y las cepas en estudio en un medio creciente de CuCl_2 encontrando que en la cepa mutante el crecimiento baja considerablemente en cambio en la cepa normal y

complementada crecieron de manera normal, dejando la posibilidad de que esta proteína pueda cumplir un papel regulador en el crecimiento en un medio alto en cobre como función detoxificadora del entorno.

Informes relacionados muestran que la expresión del gen de la oxidasa multicobre en *Mycobacterium tuberculosis* y *Campylobacter jejuni* aumentó al ser cultivadas en un medio rico en cobre (Holmes y col., 2005; Ward y col., 2008).

Los modelos de infección celular se correlacionaron positivamente con la infección de ratones, donde la cepa mutante *B. abortus* 2308 Δ BAB2_0534, en comparación con *B. abortus* 2308 y *B. abortus* Δ BAB2_0534 (pBV1-BAB2_0534), se eliminó significativamente del bazo de los ratones. a las 4 semanas pi debido a que las cepas mutantes para BAB2_0534 reducen la expresión de la proteína en sí, tomando en cuenta la acción de esta multicobreoxidasa tipo lacasa se puede considerar probable que esa función sea vital al momento de alcanzar el nicho replicativo en un modelo *in vivo*.

Además, se observaron diferencias entre los ensayos *in vivo* e *in vitro*, donde *B. abortus* 2308 permaneció durante más tiempo en ratones que macrófagos o células epiteliales, lo anterior está en relación a lo informado en diferentes estudios donde las infecciones *in vivo* pueden ser más persistentes que las *in*

vitro, porque *B. abortus* establece una infección persistente en un "nicho protegido" (p. ej., células B) lo que obstruye una respuesta inmunitaria eficaz dentro del huésped o por la formación de granulomas donde persisten bacterias en bazo (Goenka y col., 2012; Grilló y col., 2012).

En este caso, a las 4 semanas pi, la cepa complementada tuvo una respuesta menor en comparación con el tipo salvaje, pero mayor que la cepa mutante, una tendencia a perder su capacidad de infección y persistencia en el huésped, así como *B. abortus* Δ BAB2_0534.

Esto puede deberse a que los ratones no fueron tratados con ampicilina, un antibiótico requerido para el mantenimiento de la complementación del plásmido, que no se usó porque no pudo alcanzar la concentración requerida en el sitio de infección, atravesar las membranas celulares del huésped o porque los ratones tratados pudieron cambiar su microbiota natural, alterando así los resultados (Krute y col., 2016).

En consecuencia, estos resultados demuestran que el marco de lectura BAB2_0534 codifica a una proteína importante en la virulencia de este patógeno.

Los macrófagos, como células inmunes importantes en el hospedador, juegan un papel importante en la eliminación y el control de *Brucella* (Lee y col.,

2016). Los macrófagos pueden matar a la mayoría de las *Brucella* invasoras, pero una pequeña porción puede evadir el sistema inmunológico y sobrevivir y propagarse en los macrófagos (Osman y col., 2016). Además, *Brucella* puede inducir la apoptosis de los macrófagos y, por lo tanto, evadir el sistema inmunitario (Miraglia y col., 2016). Desafortunadamente, los mecanismos específicos de supervivencia intracelular y el mecanismo de escape inmunológico aún no están claros.

Las especies reactivas de oxígeno (ERDOS) es el segundo mensajero de la apoptosis celular (Carrasco y col., 2016). Después de que las células reciben señales pro-apoptóticas, aumenta la producción de ROS, lo que puede conducir a un aumento de la entrada de Ca^{2+} , activación de la caspasa y, finalmente, muerte celular (Sun y col., 2016).

En este trabajo se describió de qué manera esta proteína tipo lacasa participa de la evasión de la respuesta inmune precisamente en respuesta a la producción de ERDOS en macrófagos, es por esto que al analizar los resultados obtenidos en cultivos de macrófagos RAW 246.7 infectados con las cepas de estudio encontramos una relación marcada entre la producción de ERDOS por parte del hospedador y como estos disminuyen en presencia de la proteína tipo lacasa codificada en el marco de lectura BAB2_0534 presente en *B. abortus* 2308.

No obstante, las especies reactivas de oxígeno parecen estar presentes en alto título en macrófagos infectados con la cepa mutante lo que condice con la curva de sobrevivencia en macrófagos RAW 246.7 con la cepa mutante donde esta cepa tiene un tiempo de vida media bastante menor en relación a la cepa normal deduciendo en este caso que la proteína participaría en la evasión de la respuesta inmune en macrófagos RAW246.7 disminuyendo la acción de ERDOS intracelularmente.

Se ha mencionado que los macrófagos infectados con *Brucella* cambian su metabolismo a uno dependiente de lactato (Metabolismo de Warburg), (CyzZ y col., 2018) al evaluar la producción de lactato en macrófagos RAW 246.7 infectados con las cepas de estudio nos encontramos con que la producción de lactato en macrófagos infectados con la mutante disminuye en relación a la cepa de *Brucella* normal, entregándonos un detalle importante en relación a la influencia de esta proteína en el cambio de metabolismo presente en macrófagos infectados. Sin embargo, estos resultados no son suficientes para poder determinar un cambio de polaridad de macrófagos de uno M1 (proinflamatorio) a uno M2 (antinflamatorio o más pasivo en su función macrofágica).

Al revisar los resultados de la producción de interleucinas como IL-10, TNF- α , e IL-4 desde cultivos de células RAW 246.7, existe un aumento en la

producción de TNF- α en células infectadas con la cepa mutante, siendo este resultado concomitante con una atenuación de la resistencia del hospedador frente a la infección por *Brucella* y con esto también una disminución de la infiltración macrofágica a los sitios de infección.

Por otro lado, en el mismo caso de infección con la cepa mutante en comparación con el control salvaje de *Brucella* existe un aumento de IL-4, infiriendo que esta proteína está participando de la activación de linfocitos Th2 por una vía diferente a la descrita en la producción de IL-10 ya que esta misma citoquina disminuye en los macrófagos infectados con la cepa mutante por lo que no estaría estimulando la activación de linfocitos Th2 CD4+, esto podría indicar que esta proteína estaría involucrada en un mecanismo de atenuación de la respuesta inmune o participaría en alguna ruta metabólica no descrita aún.

Considerando que la función de multicobre oxidasa es catalizar la oxidación de Cu⁺, se realizaron ensayos de oxidación usando sustrato con grupos fenólicos e indólicos (L-DOPA), dando con un hallazgo en la formación de un pigmento oscuro tipo melanina. Éste se encontró tanto en cultivos en caldo de brucella como en agar brucella, para las cepas salvaje y complementadas no obstante no se aprecia un cambio de color en el cultivo para la cepa mutante, pero si en el control de *B. abortus* 2308 lo que puede sugerir que la proteína

codificada por el segmento génico BAB2_0534 está involucrada en la formación de estos pigmentos tipo melanina como se describió anteriormente.

Se realizó la extracción de este pigmento presente en los cultivos con diferentes sustratos precursores de melanina *in vitro*, con el objetivo de realizar un análisis espectroscópico de infrarrojo esto entregó como resultado que son compuestos de tipo melanina modificados de la familia de las eumelaninas con capacidad de ser solubles lo que les permite estar infiltrados en tejidos y ser removidos celularmente por acción macrofágica (Papon y col., 2020; Gonçalves y col., 2020; Tajima y col., 2019).

Los resultados espectroscópicos de infrarrojo sugieren que los pigmentos obtenidos de los cultivos con los sustratos respectivos si bien difieren en ciertos grupos químicos funcionales pertenecen orgánicamente a las familias de las melaninas, llamándoles melaninas atípicas solubles, un polímero negro-marrón de ácidos carboxílicos de dihidroxiindol y sus formas reducidas.

El hallazgo de la presencia de este pigmento tipo melanina presente en cultivo de agar difunde al medio externo sin quedar presente en las membranas de la bacteria existiendo colonias blanquecinas y por otro lado que es capaz de ser soluble dándole la posibilidad de ser hidratado y movilizado (acción también vista en tejidos sometidos a tinción).

Este pigmento—se encontró en cortes histológicos de diferentes tejidos provenientes de ratones BALB/c infectados con las cepas de estudio, y según los resultados explicaría algunos hechos con relación al comportamiento de *Brucella* en su hospedador, especialmente el relacionado a la evasión de la respuesta inmune mencionada anteriormente y está relacionada con la disminución de la respuesta oxidativa dada por la producción de ERDOS. Esta melanina soluble presente en tejido y a nivel intracelular actuaría a manera de escudo protector disminuyendo la acción antimicrobiana de los ERDOS ya que en estos pigmentos tipo melaninas existen muchos grupos aromáticos que quelarían a los radicales libres disminuyendo su acción desestabilizadora de estructuras funcionales de la bacteria esto descrito previamente en *Cryptococcus neoformans* (Wang y Casadevall, 1994).

Con lo anterior, así como el sistema inmune es abundante en L-DOPA (DA), lo mismo ocurre con el sistema nervioso central, por lo que se piensa que la mielinización del sistema nervioso, le confiere a *Cryptococcus* una ventaja selectiva y un tactismo positivo hacia la colonización del sistema nervioso central, principalmente corteza cerebral (Eisenman y col., 2007).

Evento similar que ocurre con la infección crónica por *Brucella*, que puede llegar a provocar neurobrucelosis, pero que no ha sido identificado hasta ahora el porqué de este cuadro (Gómez-Ruíz y col., 2018).

Dentro de los procesos descritos anteriormente en este trabajo debemos señalar que existe similitudes en las interacciones intracelulares de *Brucella abortus* con el hongo *Cryptococcus*, como la formación de vacuolas contenedoras, acidificación del medio en su interior y la activación del metabolismo de Warburg en macrófagos infectados con *Brucella abortus* (CzyZ y col., 2017), la producción de óxido nítrico por activación de la óxido nítrico sintasa como un mecanismo de regulación de la secreción de IL-1 β vía inflamosoma NLRP3 (Mishra y col., 2013; Campos y col., 2019), la remodelación del espacio citoplasmático con el reordenamiento de la estructura mitocondrial y el cambio de ciclo de crecimiento celular (Deghelt y col., 2014).

Este hongo produce varias proteínas del tipo lacasas, las que usan como sustrato las catecolaminas para producir melanina intracelular (Eiseman y col., 2007) esta melanina participa en la evasión de la respuesta inmune, aminorando la acción antimicrobiana de ERDOS en macrófagos, y esta lacasa fúngica disminuye la disposición de catecolaminas intracelular y por ende la señalización celular (Kawano y col., 2018), para la correcta homeostasis de los procesos de oxido-reducción (REDOX) en las células del sistema inmune (Casadevall y col., 2000).

Con base a estos resultados podemos señalar que la actividad de la proteína cobre oxidasa en estudio es necesaria para la fisiología básica de esta bacteria, probablemente durante el proceso de alcanzar el nicho celular, dándole la capacidad a *B. abortus* 2308 de escapar de la vía endosomal/fagolisosomal y desarrollar un nicho de replicación en macrófagos, lo que le permite sobrevivir y replicarse intracelularmente en células eucariotas.

Además de participar de manera directa en un cambio metabólico en la célula hospedador, sin poder confirmar que es un cambio de polarización de M1 a M2 en macrófagos RAW 264.7.

Ciertamente el marco de lectura BAB2_0534 de *Brucella abortus* 2308, que sintetiza una lacasa bacteriana esta involucrada en la formación de eumelanina bacteriana que estaría actúa como factor de virulencia.

Conclusión.

Nuestro estudio muestra que la proteína codificada en el marco de lectura BAB2_0534 es una multicobre oxidasa y contribuye a la tolerancia al cobre de *B. abortus* 2308 por otro lado su delección no es letal en el crecimiento de la bacteria, pero si existe un cambio en relación a la cepa normal. El producto génico de BAB2_0534 está directamente involucrado en el crecimiento bacteriano, la formación de biomasa adherente sobre una superficie inerte, la disminución de ERDOS y la producción de lactato en macrófagos RAW264.7, está relacionado con el importante hallazgo de la presencia de eumelanina en tejido de órganos de ratones BALB/c infectados con las cepas en estudio.

Bibliografía.

- Abdallah, A. I., Commander, N. J., Woodward, M. J., Spencer, S., Hart, C. A., and Winstanley, C. (2003). Type III secretion homologs are present in *Brucella melitensis*, *B. ovis*, and *B. suis* biovars 1, 2, and 3. *Curr. Microbiol.* 46, 241–245. doi: 10.1007/s00284-002-3789-3
- Arellano-Reynoso B., Díaz-Aparicio E., Leal-Hernández M., y col., (2004). Intracellular trafficking study of a RB51 *B. abortus* vaccinal strain isolated from cow milk. *Veterinary Microbiology.*, 98(3-4): 307-12
- Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., van Rooijen, N., Plonquet, A., Gherardi, R. K., & Chazaud, B. (2007). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *The Journal of experimental medicine*, 204(5), 1057–1069. <https://doi.org/10.1084/jem.20070075>
- Agodi A, Stefani S, Corsaro C, Campanile F, Gribaldo S, Sichel G. Study of a melanic pigment of *Proteus mirabilis*. *Res. Microbiol.* 1996;1147:167-74.

- Ahmed W, Zheng K, Liu ZF. Establishment of Chronic Infection: *Brucella's* Stealth Strategy. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016 Mar 15;6:30. doi: 10.3389/fcimb.2016.00030. PMID: 27014640; PMCID: PMC4791395.
- Alexandre G, Zhulin IB. Laccases are widespread in bacteria. *Trends Biotechnol.* 2000;18:41-2.
- Arreola R, Alvarez-Herrera S, Pérez-Sánchez G, Becerril-Villanueva E, Cruz-Fuentes C, FloresGutierrez EO, Garcés-Alvarez ME, de la Cruz-Aguilera DL, Medina-Rivero E, Hurtado-Alvarado G, Quintero-Fabián S, Pavón L. 2016. Immunomodulatory Effects Mediated by Dopamine. *J Immunol Res.*;2016:3160486.
- Atluri, V. L., Xavier, M. N., de Jong, M. F., den Hartigh, A. B., & Tsolis, R. M. (2011). Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts. *Annual review of microbiology*, 65, 523–541. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102905>
- Aurstad K, Dahle HK. Fine structure of melanin-producing aeromonads. *Acta Pathol Microbiol Scand. Microbiol Immunol.* 1972;80:1884-90

- Audic, S., Lescot, M., Claverie, J. M., & Scholz, H. C. (2009). *Brucella microti*: the genome sequence of an emerging pathogen. BMC genomics, 10, 352. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-352>
- Avramidis N, Kourounakis A, Hadjipetrou L, Senchuk V. Anti-inflammatory and immunomodulating properties of grape melanin. Inhibitory effects on paw edema and adjuvant induced disease. Arzneimittelforschung. 1998;48(7):764-71.
- Babior BM (1978) Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. N Engl J Med 298:721–725
- Barshtein LA, Tydelskai a IL, Rozhavin MA. Experimental study of the pathogenicity of melanin-forming strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Mikrobiol Zh. 1983;45:44-8.
- Brenner M, Hearing VJ. The protective role of melanin against UV damage in human skin. Photochem Photobiol. 2008 May-Jun;84(3):539-49. doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00226.x. PMID: 18435612; PMCID: PMC2671032.
- Barquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., Weiss, D., Guzmán-Verri, C., ChacónDíaz, C., Rucavado, A., Moriyón I., Moreno, E. (2007). *Brucella abortus* Uses a Stealthy Strategy to Avoid Activation of the

- Innate Immune System during the Onset of Infection. PLoS ONE, 2(7), e631. doi:10.1371/journal.pone.0000631
- Barrionuevo, P., Delpino, M., Pozner, R., Velásquez, L., Cassataro, J., y Giambartolomei, G. (2012). *Brucella abortus* induces intracellular retention of MHC-I molecules in human macrophages down-modulating cytotoxic CD8+T cell responses. Cellular Microbiology, 15(4), 487–502. doi:10.1111/cmi.12058
 - Bedard K, Krause K-H (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiol Rev. 87:245–313 doi: 10.1152/physrev.00044.2005.
 - Bishop, J. A., Nelson, A. M., Merz, W. G., Askin, F. B., & Riedel, S. (2012). Evaluation of the detection of melanin by the Fontana-Masson silver stain in tissue with a wide range of organisms including *Cryptococcus*. Human Pathology, 43(6), 898–903. doi:10.1016/j.humpath.2011.07.021
 - Biswas SK, Chittezhath M, Shalova IN, Lim JY. Macrophage polarization and plasticity in health and disease. Immunol Res. 2012;53(1–3):11–24. doi:https://doi.org/10.1007/s12026-012-8291-9.

- Broxton CN, Culotta VC (2016) SOD enzymes and microbial pathogens: surviving the oxidative storm of infection. *PLoS Pathog* 12:e1005295
- Butler M, Day AW. Fungal melanins: a review. *Can J Microbiol.* 1998;44:1115-36.
- Byndloss, M. X., & Tsois, R. M. (2016). *Brucella* spp. Virulence Factors and Immunity. *Annual review of animal biosciences*, 4, 111–127. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021815-111326>
- Cardoso, P. G., Macedo, G. C., Azevedo, V., & Oliveira, S. C. (2006). *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial cell factories*, 5, 13. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-13>
- Campos, P., Gomes, M., Marinho, F., Guimarães, E., Cruz, M., & Oliveira, S. (2019). *Brucella abortus* nitric oxide metabolite regulates inflammasome activation and IL-1 β secretion in murine macrophages. *European Journal of Immunology*. doi:10.1002/eji.201848016
- Canton, M., Sánchez-Rodríguez, R., Spera, I., Venegas, F. C., Favia, M., Viola, A., & Castegna, A. (2021). Reactive Oxygen Species in Macrophages: Sources and Targets. *Frontiers in immunology*, 12, 734229. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.734229>

- Cardoso P., Macedo G., Azevedo V., Oliveira S. (2006). *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb Cell Fact.* 5(1):13.
- Carreira, A., Ferreira, L. y Loureiro, V. (2001). Brown pigments produced by *Yarrowia lipolytica* result from extracellular accumulation of homogentisic acid. *Appl Environ Microbiol* 67, 3463-3468.
- Castegna, A., Gissi, R., Menga, A., Montopoli, M., Favia, M., Viola, A., & Canton, M. (2020). Pharmacological targets of metabolism in disease: Opportunities from macrophages. *Pharmacology & Therapeutics*, 210, 107521. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107521>
- Castañeda-Roldán, E. I., Avelino-Flores, F., Dall'Agnol, M., Freer, E., Cedillo, L., Dornand, J., & Girón, J. A. (2004). Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. *Cellular microbiology*, 6(5), 435–445. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00372.x>
- Casadevall, A., Rosas, A. y Nosanchuk, J. (2000). Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 354-358.

- Celli J., de Chastellier C., Franchini D.M., Pizarro-Cerda J., Moreno E., Gorvel J.P. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.* 2003;198:545–556.
- Certo, M., Llibre, A., Lee, W., & Mauro, C. (2022). Understanding lactate sensing and signalling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 33(10), 722–735.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2022.07.004>
- Chattopadhyay, P. K., Melenhorst, J. J., Ladell, K., Gostick, E., Scheinberg, P., Barrett, A. J., Wooldridge, L., Roederer, M., Sewell, A. K., & Price, D. A. (2008). Techniques to improve the direct ex vivo detection of low frequency antigen-specific CD8⁺ T cells with peptide-major histocompatibility complex class I tetramers. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 73(11), 1001–1009. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20642>
- Chatfield CH, Cianciotto NP. The secreted pyomelanin pigment of *Legionella pneumophila* confers ferric reductase activity. *Infect Immun.* 2007;75:4062-70.

- Chauhan, P. S., Goradia, B., & Saxena, A. (2017). Bacterial laccase: recent update on production, properties and industrial applications. *3 Biotech*, 7(5), 323. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0955-7>
- Chen X, Tang J, Shuai W, Meng J, Feng J, Han Z. Macrophage polarization and its role in the pathogenesis of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Inflamm Res*. 2020;69(9):883–895. doi:<https://doi.org/10.1007/s00011-020-01378-2>.
- Comerci, D., Martínez-Lorenzo, M., Sieira, R., Gorvel, J., Ugalde, R. (2001). Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus* containing vacuole. *Cell. Microbiol.* 3,159-168.
- Cosentino M., Rasini E., Colombo C., y col. (2004). Dopaminergic modulation of oxidative stress and apoptosis in human peripheral blood lymphocytes: evidence for a D1-like receptor-dependent protective Radical Biology and Medicine. 36(10):1233–1240. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.065
- Coloma-Rivero R., Gómez L., Alvarez F., Saitz W., del Canto., Céspedes S., Vidal R., Oñate A. (2020) The Role of the Flagellar Protein FlgJ in the Virulence of *Brucella abortus*. *Front Cell Infect Microbiol.*10:178. doi:10.3389/fcimb.2020.00178

- Coloma-Rivero, R. F., Flores-Concha, M., Molina, R. E., Soto-Shara, R., Cartes, Á., & Oñate, Á. A. (2021). *Brucella* and Its Hidden Flagellar System. *Microorganisms*, 10(1), 83. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010083>
- Coyne VE, al-Harhi L. Induction of melanin biosynthesis in *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol.* 1992;58:2861-5.
- Czyż, D., Willett, J., y Crosson, S. (2017). *Brucella abortus* Induces a Warburg Shift in Host Metabolism That Is Linked to Enhanced Intracellular Survival of the Pathogen. *Journal of Bacteriology*, 199(15), e00227-17.
- Dadachova E., Bryan R., Huang X., Moadel T., Schweitzer A., Aisen P., Nosanchuk J. y Casadevall A. (2007). Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. *PLoS One* 2, e457.
- Davis M. J., Eastman A. J., Qiu Y., Gregorka B., Kozel T. R., Osterholzer J. J., et al. (2015). *Cryptococcus neoformans*-induced macrophage lysosome damage crucially contributes to fungal virulence. *J. Immunol.* 194 2219–2231. 10.4049/jimmunol.1402376
- de Barsy, M., Jamet, A., Filopon, D., Nicolas, C., Laloux, G., Rual, J. F., Muller, A., Twizere, J. C., Nkengfac, B., Vandenhaute, J., Hill, D.

- E., Salcedo, S. P., Gorvel, J. P., Letesson, J. J., & De Bolle, X. (2011). Identification of a *Brucella* spp. secreted effector specifically interacting with human small GTPase Rab2. *Cellular microbiology*, 13(7), 1044–1058. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01601.x>
- Deghelt, M., Mullier, C., Sternon, J. y col. (2014). G1-arrested newborn cells are the predominant infectious form of the pathogen *Brucella abortus*. *Nat Commun* 5, 4366 <https://doi.org/10.1038/ncomms5366>
 - DeLeon-Rodriguez, C. M., & Casadevall, A. (2016). *Cryptococcus neoformans*: Tripping on Acid in the Phagolysosome. *Frontiers in microbiology*, 7, 164. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00164>
 - Delrue, R., Deschamps, C., Léonard. S., Nijskens, C., Danese, I., y col. (2005). A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. *Cell. Microbiol.* 7, 1151-61. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00543.x
 - Döhmer P., Valguarnera E., Czibener C., y Ugalde, J. (2013). Identification of a type IV secretion substrate of *Brucella abortus* that participates in the early stages of intracellular survival. *Cellular Microbiology*, 16(3), 396–410. doi:10.1111/cmi.12224

- Del Poeta, M. (2004). Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 3, 1067-1075.
- De Figueiredo P., Ficht T., Rice-Ficht A., Rossetti C. and G. Adams L. (2015). Pathogenesis and immunobiology of brucellosis review of *Brucellae* host interactions. *Am. J. Pathol.* 185(6): 1505–1517.
- Dias V., Junn E., Mouradian M. (2013). The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's Disease.* 3(4):461–491. doi: 10.3233/jpd-130230
- Eisenman HC, Casadevall A. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012 Feb;93(3):931-40. doi: 10.1007/s00253-011-3777-2. Epub 2011 Dec 16. PMID: 22173481; PMCID: PMC4318813.
- Eisenman, H., Mues, M., Weber, S., Frases, S., Chaskes, S., Gerfen, G. y Casadevall, A. (2007). *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA. *Microbiology* 153, 3954-3962.
- Eisenman, H. C., & Casadevall, A. (2011). *Synthesis and assembly of fungal melanin. Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 931–940. doi:10.1007/s00253-011-3777-2

- El-Tras WF, Tayel AA, Eltholth MM, Guitian J. 2010. Infección por *Brucella* en peces de agua dulce: evidencia de infección natural del bagre del Nilo, *Clarias gariepinus*, con *Brucella melitensis*. *Vet Microbiol* 141:321–325.doi: 10.1016/j.vetmic.2009.09.017.
- Eisenberg T, Hamann KP, Kaim U, Schelz K, Seeger H, Seeger N, Schauerte N, Melzer F, Tomaso H, Scholz HC, Koylass MS, Whatmore AM, Zschöck M. 2012. Aislamiento de *Brucella* spp potencialmente novedosas de las ranas *Appl Environ Microbiol* 78:3753–3755. doi: 10.1128/AEM.07509-11
- Eisenberg T, Riße K, Schauerte N, Geiger C, Blom J, Scholz HC. 2017. Aislamiento de una nueva cepa de *Brucella* atípica' de una raya cola de cinta con manchas azules (*Taeniura lymma*). *Antonie Van Leeuwenhoek* 110:221–234. doi: 10.1007/s10482-016-0792-4.).
- Ferrero MC, Alonso Paiva IM, Muñoz González F, Baldi PC. Pathogenesis and immune response in *Brucella* infection acquired by the respiratory route. *Microbes Infect.* 2020 Oct;22(9):407-415. doi: 10.1016/j.micinf.2020.06.001. Epub 2020 Jun 11. PMID: 32535086.
- Feldmesser, M., Kress, Y., Novikoff, P. y Casadevall, A. (2000). *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infect Immun* 68, 4225-4237.

- Flores A, Schell J, Krall AS , y col. La actividad de la lactato deshidrogenasa impulsa la activación de las células madre del folículo piloso. *biolcelularnat.* 2017;19(9):1017–1026. doi: <https://doi.org/10.1038/ncb3575> .
- Fretin, D., Fauconnier, A., Köhler, S., Halling, S., Léonard, S., Nijskens, C., Ferooz, J., Lestrade, P., Delrue, R. M., Danese, I., Vandenhaute, J., Tibor, A., DeBolle, X., & Letesson, J. J. (2005). The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cellular microbiology*, 7(5), 687–698. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00502.x>
- Galván-Peña S, O'Neill LAJ. 2014. Metabolic reprogramming in macrophage polarization. *Front Immunol* 5:420. doi: 10.3389/fimmu.2014.00420
- Gessler NN, Aver'yanov AA, Belozerskaya TA (2007) Reactive oxygen species in regulation of fungal development. *Biochem Moscow* 72:1091–1109
- Godfroid J. (2017). Brucellosis in livestock and wildlife: zoonotic diseases without pandemic potential in need of innovative one health approaches. *Archives of public health = Archives belges de sante publique*, 75, 34. <https://doi.org/10.1186/s13690-017-0207-7>

- Gomez BL, Nosanchuk JD. Melanin and fungi. *Curr Opin Infect Dis.* 2003; 16:91-6.
- Gómez L, Alvarez F, Betancur D, Oñate A. Brucellosis vaccines based on the open reading frames from genomic island 3 of *Brucella abortus*. *Vaccine.* 2018 May 17;36(21):2928-2936. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.04.014. PMID: 29685597.
- Gonçalves, S., Duarte-Oliveira, C., Campos, C. y col. (2020). Phagosomal removal of fungal melanin reprograms macrophage metabolism to promote antifungal immunity. *Nat Commun* 11, 2282 <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16120-z>
- Gleason JE, Galaledeen A, Peterson RL, Taylor AB, Holloway SP, Waninger-Saroni J, Cormack BP, Cabelli DE, Hart PJ, Culotta VC (2014) *Candida albicans* SOD5 represents the prototype of an unprecedented class of Cu-only superoxide dismutases required for pathogen defense. *PNAS* 111:5866–5871
- Gheibi A., Khanahmad H., Kashfi K., y col., (2018). Development of new generation of vaccines for *Brucella abortus*. *Heliyon.*; 4(12):e01079. doi:10.1016/j.heliyon.2018.e01079
- Głowacka, P., Żakowska, D., Naylor, K., Niemcewicz, M., & Bielawska-Drózd, A. (2018). *Brucella* - Virulence Factors,

Pathogenesis and Treatment. *Polish journal of microbiology*, 67(2), 151–161. <https://doi.org/10.21307/pjm-2018-029>

- Heitman J., Kozel T., Kwon-Chung K., Perfect J., Casadevall A. (2011). *Cryptococcus*: from human pathogen to model yeast, p 646 ASM Press, Washington, D.C.
- Hwang C-S, Rhie G, Oh J-H, Huh W-K, Yim H-S, Kang S-O (2002) Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology* 148:3705–3713
- Huffnagle GB, Chen GH, Curtis JL, McDonald RA, Strieter RM, Toews GB. Down-regulation of the afferent phase of T cell-mediated pulmonary inflammation and immunity by a high melanin-producing strain of *Cryptococcus neoformans*. *Immunol.* 1995; 155:3507.
- Hamilton-Miller JM, Ogunnariwo J. An improvement in the technique for the presumptive identification of *Aeromonas salmonicida*. *J Appl Bacteriol.* 1975;38:67-9.
- Ivins BE, Holmes RK. Isolation and characterization of melanin-producing (mel) mutants of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun.* 1980;27:721-9.

- Ivashkiv LB. El eje hipoxia-lactato atenúa la inflamación. *Nat Rev Immunol.* 2020 ;20(2): 85–86. doi: <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0259-8>.
- Jacobson ES, Jenkins ND, Todd JM (1994) Relationship between superoxide dismutase and melanin in a pathogenic fungus. *Infect Immun* 62:4085–4086
- Jacobson ES, Tinnell SB (1993) Antioxidant function of fungal melanin. *J Bacteriol* 175:7102–7104
- Janusz G., Pawlik A., Świdorska-Burek U., Polak J., Sulej J., Jarosz-Wilkolazka A., y Paszczyński A. (2020). Laccase Properties, Physiological Functions, and Evolution. *International journal of molecular sciences*, 21(3), 966.
- Jiang N., Sun N., Xiao D., Pan J., Wang Y. y Zhu X. (2009). A copper-responsive factor gene CUF1 is required for copper induction of laccase in *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Microbiol Lett* 296, 84-90
- Joly-Tonetti, N., Wibawa, J. I., Bell, M., & Tobin, D. (2016). Melanin fate in the human epidermis: a reassessment of how best to detect and analyse histologically. *Experimental dermatology*. 25(7), 501–504. <https://doi.org/10.1111/exd.13016>

- Kambarev, S., Borghesan, E., Miller, C. N., Myeni, S., & Celli, J. (2023). The *Brucella abortus* Type IV Effector BspA Inhibits MARCH6-Dependent ERAD To Promote Intracellular Growth. *Infection and immunity*, 91(5), e0013023. <https://doi.org/10.1128/iai.00130-23>
- Kawano, M., Takagi, R., Saika, K., Matsui, M., & Matsushita, S. (2018). Dopamine regulates cytokine secretion during innate and adaptive immune responses. *International Immunology*. doi:10.1093/intimm/dxy057
- Kelly B, O'Neill LA. 2015. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res* 25:771–784. doi: 10.1038/cr.2015.68.
- Kellermann, M., Scharte, F., & Hensel, M. (2021). Manipulation of Host Cell Organelles by Intracellular Pathogens. *International journal of molecular sciences*, 22(12), 6484. <https://doi.org/10.3390/ijms22126484>
- Ko J., y Splitter G. (2003). Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev* 16, 65-78

- Komarov DA, Slepneva IA, Glupov VV, Khramtsov VV (2005) Superoxide and hydrogen peroxide formation during enzymatic oxidation of DOPA by phenoloxidase. *Free Radical Res* 39:853–858
- Kotsias F, Hoffmann E, Amigorena S, Savina A (2012) Reactive oxygen species production in the phagosome: impact on antigen presentation in dendritic cells. *Antioxid Redox Signal* 18:714–729
- Kohler S., Foulongne V., Ouahrani-Bettache S., Bourg G., Teyssier J., Ramuz M., Liautard J. (2002). The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 99(24):15711-6.
- Lamontagne, J., Forest, A., Marazzo, E., Denis, F., Butler, H., y col. (2009). Intracellular adaptation of *Brucella abortus*. *Journal of proteome research*, 8(3), 1594–1609.
- Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol.* 2003; 38:143-58.
- Lapaque, N., Moriyon, I., Moreno, E., & Gorvel, J. P. (2005). *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Current opinion in microbiology*, 8(1), 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.12.003>

- Lavigne, J. P., Patey, G., Sangari, F. J., Bourg, G., Ramuz, M., O'Callaghan, D., & Michaux-Charachon, S. (2005). Identification of a new virulence factor, BvfA, in *Brucella suis*. *Infection and immunity*, 73(9), 5524–5529. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.9.5524-5529.2005>
- Lavin Y, Mortha A, Rahman A, Merad M. Regulación del desarrollo y función de macrófagos en tejidos periféricos. *Nat Rev Immunol* (2015) 15:731–44. doi: 10.1038/nri3920
- Lee K., Chiu K., Sansing H., Didier P., Ficht T., Arenas-Gamboa A., MacLean A. (2013). Aerosol-induced brucellosis increases TLR-2 expression and increased complexity in the microanatomy of astroglia in rhesus macaques. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3. doi:10.3389/fcimb.2013.00086
- Lee Y S, Kim TY, Kim Y, y col. El lactato derivado de la microbiota acelera el desarrollo epitelial mediado por células madre intestinales. *Microbio huésped celular*. 2018;24(6): 833–846 e6. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.11.002>.
- Levitz S. M., Nong S. H., Seetoo K. F., Harrison T. S., Speizer R. A., Simons E. R. (1999). *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. *Infect. Immun.* 67 885–890.

- Liu W., Liu C., Liu L., You Y., Jiang J., Zhou Z., Dong Z. (2017). Simultaneous decolorization of sulfonated azo dyes and reduction of hexavalent chromium under high salt condition by a newly isolated salt tolerant strain *Bacillus circulans* BWL1061. *Ecotoxicol Environ Saf.*141:9–16. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.03.005.
- Liu L., Tewari R. y Williamson, P. (1999). Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. *Infect Immun* 67, 6034-6039
- Macnab R. M. (2003). How bacteria assemble flagella. *Annual review of microbiology*, 57, 77–100.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090832>
- Mate D.; Alcalde M. (2014). Laccase engineering from rational design to directed evolution. *Biotechnol Adv.* 33:25–40. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.007
- Mekalanos JJ, Rubin EJ, Waldor MK. Cholera: molecular basis for emergence and pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1997;18:241-8
- Mishra B., Rathinam V., Martens G., Martinot A., Kornfeld H. (2013). Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting

- NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1 β . *Nat. Immunol.* 14: 52–60.
- Miraglia, M. C., Rodriguez, A. M., Barrionuevo, P., Rodriguez, J., Kim, K. S., Dennis, V. A., Delpino, M. V., & Giambartolomei, G. H. (2018). *Brucella abortus* Traverses Brain Microvascular Endothelial Cells Using Infected Monocytes as a Trojan Horse. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 200. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00200>
 - Moreno E. (2014). Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Frontiers in microbiology*, 5, 213. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00213>
 - Moreno, E., Blasco, J. M., Letesson, J. J., Gorvel, J. P., & Moriyón, I. (2022). Pathogenicity and Its Implications in Taxonomy: The *Brucella* and *Ochrobactrum* Case. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(3), 377. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030377>
 - Mohagheghpour N, Waleh N, Garger SJ, Dousman L, Grill LK, Tuse D. Synthetic melanin suppresses production of proinflammatory cytokines. *Cell Immunol.* 2000;199:25-36

- Nathan CF, Hibbs JB (1991) Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 3:65–70 doi: 10.1016/0952-7915(91)90079-G
- Noverr M., Williamson P., Fajardo R. y Huffnagle G. (2004). CNLAC1 is required for extrapulmonary dissemination of *Cryptococcus neoformans* but not pulmonary persistence. *Infect Immun* 72, 1693-1699.
- Nurudeen T. y Ahearn D (1979). Regulation of melanin production by *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 10, 724-729.
- O'Callaghan, D., & Whatmore, A. M. (2011). *Brucella* genomics as we enter the multi-genome era. *Briefings in functional genomics*, 10(6), 334–341. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elr026>
- Oliveira S., Macedo G., Almeida L., Oliveira F., Oñate A. (2010). Recent Advances in Understanding Immunity Against Brucellosis: Application for Vaccine Development. *Science*, 102-108
- Olsen, S. C., & Palmer, M. V. (2014). Advancement of knowledge of *Brucella* over the past 50 years. *Veterinary pathology*, 51(6), 1076–1089. <https://doi.org/10.1177/0300985814540545>

- Omotade T.O., Roy C.R. Manipulation of Host Cell Organelles by Intracellular Pathogens. *Microbiol. Spectr.* 2019; 7: 179–196. doi:10.1128/microbiolspec.BAI-0022-2019.
- Papon, N., Gangneux, J.-P., & Delneste, Y. (2020). *Fungal Melanin Rewires Macrophage Metabolism. Trends in Biochemical Sciences.* doi:10.1016/j.tibs.2020.06.006
- Pearce EL, Pearce EJ. 2013. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity* 38:633–643. doi: 10.1016/j.immuni.2013.04.005.
- Perez-Cuesta U., Aparicio-Fernandez L., Guruceaga X., Martin-Souto L., AbadDiaz-de-Cerio A., Antoran A., Rementeria A. (2019). Melanin and pyomelanin in *Aspergillus fumigatus*: from its genetics to host interaction. *International Microbiology.* doi:10.1007/s10123-019-00078-0
- Pizarro-Cerdá J, Moreno E, Sanguedolce V, Mege JL, Gorvel JP. 1998. *Brucella abortus* virulenta previene la fusión de lisosomas y se distribuye dentro de compartimentos similares a autofagosomas. *Infect Immun* 66: 2387–2392.

- Pita T., Feliciano J.R., Leitão J.H. Small Noncoding Regulatory RNAs from *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* Complex. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19:3759. doi:10.3390/ijms19123759.
- Plonka P.; Grabacka M. (2006). Melanin synthesis in microorganisms- biotechnological and medical aspects. *Acta Biochim Pol* 53, 429-443.
- Prabhakaran K, Harris EB. A possible metabolic role for - diphenoloxidase in *Mycobacterium leprae*. *Experientia.* 1985;41:1571-2
- Quan W, Yang Y. Evasion of anti-infectious immunity by *Brucella* - A review. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 2016 May 4;56(5):747-52. Chinese. PMID: 29727136.
- Rivas-Solano, O., Van der Henst, M., Castillo-Zeledón, A., Suárez-Esquivel, M., Muñoz-Vargas, L., Capitan-Barrios, Z., Thomson, N. R., Chaves-Olarte, E., Moreno, E., De Bolle, X., & Guzmán-Verri, C. (2022). The regulon of *Brucella abortus* two-component system BvrR/BvrS reveals the coordination of metabolic pathways required for intracellular life. *PloS one*, 17(9), e0274397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274397>
- Rivers R., Andrews E., Donoso G. y Oñate A. (2006). *Brucella abortus*: immunity, vaccines and prevention strategies based on nucleic acids. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 38(1): 7-18.

- Rossetti C., Drake K., Siddavatam P., Lawhon S., Nunes J. (2013). Systems biology analysis of *Brucella* infected Peyer's patch reveals rapid invasion with modest transient perturbations of the host transcriptome. *PloS one*, 8(12), e81719.
- Rosas A. y Casadevall A. (1997). Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS Microbiol Lett* 153, 265-272.
- Rózanowska M, Sarna T, Land EJ, Truscott TG (1999) Free radical scavenging properties of melanin: interaction of eu- and pheo-melanin models with reducing and oxidising radicals. *Free Radic Biol Med* 26:518–525
- Rodrigues ML, Nakayasu ES, Oliveira DL, Nimrichter L, Nosanchuk JD, Almeida IC, Casadevall A (2008) Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell* 7:58–67
- Roop, R. M., 2nd, Barton, I. S., Hoppersberger, D., & Martin, D. W. (2021). Uncovering the Hidden Credentials of *Brucella* Virulence. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 85(1), e00021-19. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00021-19>

- Roy C. R. (2005). Trimming the fat: a *Brucella abortus* survival strategy. *Nature immunology*, 6(6), 546–548. <https://doi.org/10.1038/ni0605-546>
- Sanchez-Amat A, Solano F.A pluripotent polyphenol oxidase from the melanogenic marine *Alteromonas* sp. shares catalytic capabilities of *tyrosinases* and laccases. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;240:787-92.
- Sánchez-Venegas, Jaime, Pillaca, Mirtha, Landauro, Carlos V, Ramirez, Pablo, Lovera, Daniel, Bernaldo, Jordán, Eca, Anika, & De la Cruz, Fernando. (2016). Actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano por cobre nanoestructurado obtenido de minerales de la región Maraón: comparación con cobre comercial. *Revista Peruana de Biología*, 23(3), 305-310. <https://dx.doi.org/10.15381/rpb.v23i3.12866>
- Sheehan, L. M., Budnick, J. A., Fyffe-Blair, J., King, K. A., Settlage, R. E., & Caswell, C. C. (2020). The Endoribonuclease RNase E Coordinates Expression of mRNAs and Small Regulatory RNAs and Is Critical for the Virulence of *Brucella abortus*. *Journal of bacteriology*, 202(20), e00240-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00240-20>
- Schell JC, Wisidagama DR, Bensard C, y col. Control de la función y proliferación de células madre intestinales mediante el metabolismo del

piruvato mitochondrial. *biol celular nat.* 2017;19(9):1027–1036.

doi:<https://doi.org/10.1038/ncb3593>

- Schiel G, Corsaro C, Scalia M, Sciuto S, Geremia E (1987) Relationship between melanin content and superoxide dismutase (SOD) activity in the liver of various species of animals. *Cell Biochem Funct* 5:123–128
- Scholz HC, Hubalek Z, Nesvadbova J, Tomaso H, Vergnaud G, Le Flèche P, Whatmore AM, Al Dahouk S, Krüger M, Lodri C, Pfeffer M. Isolation of *Brucella microti* from soil. *Emerg Infect Dis.* 2008 Aug;14(8):1316-7. doi: 10.3201/eid1408.080286. PMID: 18680668; PMCID: PMC2600371.
- Smith J., Khan M., Magnani D., Harms J., Durward M., Radhakrishnan G. (2013). *Brucella* Induces an Unfolded Protein Response via TcpB That Supports Intracellular Replication in Macrophages. *PLoS Pathog.*9:e1003785
- Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 21(7), 363–383. [https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-](https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3)

3

- Song, W., Yang, H., Liu, S., Yu, H., Li, D., Li, P., & Xing, R. (2023). Melanin: insights into structure, analysis, and biological activities for future development. *Journal of materials chemistry. B*, *11*(32), 7528–7543. <https://doi.org/10.1039/d3tb01132a>
- Soler-Lloréns, P. F., Quance, C. R., Lawhon, S. D., Stuber, T. P., Edwards, J. F., Ficht, T. A., Robbe-Austerman, S., O'Callaghan, D., & Keriél, A. (2016). A *Brucella* spp. Isolate from a Pac-Man Frog (*Ceratophrys ornata*) Reveals Characteristics Departing from Classical Brucellae. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *6*, 116. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00116>
- Suárez-Esquivel, M., Chaves-Olarte, E., Moreno, E., & Guzmán-Verri, C. (2020). *Brucella* Genomics: Macro and Micro Evolution. *International journal of molecular sciences*, *21*(20), 7749. <https://doi.org/10.3390/ijms21207749>
- Smith J. A. (2018). *Brucella* Lipopolysaccharide and pathogenicity: The core of the matter. *Virulence*, *9*(1), 379–382. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1395544>
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., & Mering, C. V. (2019). STRING v11: protein-protein

- association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic acids research*, 47(D1), D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
- Skendros, P., & Boura, P. (2013). Immunity to brucellosis. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 32(1), 137–147. <https://doi.org/10.20506/rst.32.1.2190>
 - Sun, S., Li, H., Chen, J., & Qian, Q. (2017). Lactic Acid: No Longer an Inert and End-Product of Glycolysis. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 32(6), 453–463. <https://doi.org/10.1152/physiol.00016.2017>
 - Tada M, Kohno M, Niwano Y (2010) Scavenging or quenching effect of melanin on superoxide anion and singlet oxygen. *J Clin Biochem Nutr* 46:224–225
 - Singh G., Bhalla A., Kaur P., Capalash N., Sharma P. (2011). Laccase from prokaryotes: a new source for an old enzyme. *Rev Environ Sci Bio*. 10(4):309– 326. doi: 10.1007/s11157-011-9257-4.
 - Tajima K., Yamanaka D., Ishibashi K., Adachi Y., y Ohno N. (2019). Solubilized melanin suppresses macrophage function. *FEBS open bio*, 9(4), 791–800.
 - Tian M., Qu J., Han X., Ding C., Wang S. (2014). Mechanism of Asp24 upregulation in *Brucella abortus* rough mutant with a disrupted O-

- antigen export system and effect of Asp24 in bacterial intracellular survival. *Infect Immun.* 82(7):2840-2850
- Viola A, Munari F, Sánchez-Rodríguez R, Scolaro T, Castegna A. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Front Immunol* (2019) 10:1462. doi: 10.3389/fimmu.2019.01462.
 - Vecchiarelli, A. (2007). Fungal capsular polysaccharide and T-cell suppression: the hidden nature of poor immunogenicity. *Crit Rev Immunol* 27, 547-557
 - Vecchiarelli A., Pericolini E., Gabrielli E., Chow S., Bistoni, F., Cenci, E. y Casadevall, A. (2011). *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan is a potent negative immunomodulator, inspiring new approaches in anti-inflammatory immunotherapy. *Immunotherapy* 3, 997-1005
 - Vecchiarelli A., Dottorini M., Pietrella D., Monari C., Retini C. (1994). Role of human alveolar macrophages as antigen-presenting cells in *Cryptococcus neoformans* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11, 130-137.
 - von Bargen, K., Gagnaire, A., Arce-Gorvel, V., de Bovis, B., Baudimont, F., Chasson, L., Bosilkovski, M., Papadopoulos, A., Martirosyan, A., Henri, S., Mège, J. L., Malissen, B., & Gorvel, J. P.

- (2015). Cervical Lymph Nodes as a Selective Niche for *Brucella* during Oral Infections. *PloS one*,10(4), e0121790.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121790>
- Wang H., Hoffman C., Yang X., Clapp B. y Pascual D. (2020). Targeting resident memory T cell immunity culminates in pulmonary and systemic protection against *Brucella* infection. *PLOS Pathogens*, 16(1), e1008176. doi:10.1371/journal.ppat.1008176
 - Wang Y. y Casadevall A. (1994). Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. *Appl Environ Microbiol* 60, 3864-3866.
 - Wattam, A. R., Foster, J. T., Mane, S. P., Beckstrom-Sternberg, S. M., Beckstrom-Sternberg, J. M., Dickerman, A. W., Keim, P., Pearson, T., Shukla, M., Ward, D. V., Williams, K. P., Sobral, B. W., Tsolis, R. M., Whatmore, A. M., & O'Callaghan, D. (2014). Comparative phylogenomics and evolution of the Brucellae reveal a path to virulence. *Journal of bacteriology*, 196(5), 920–930.
<https://doi.org/10.1128/JB.01091-13>
 - Williamson P. (1994). Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *J Bacteriol* 176, 656-664

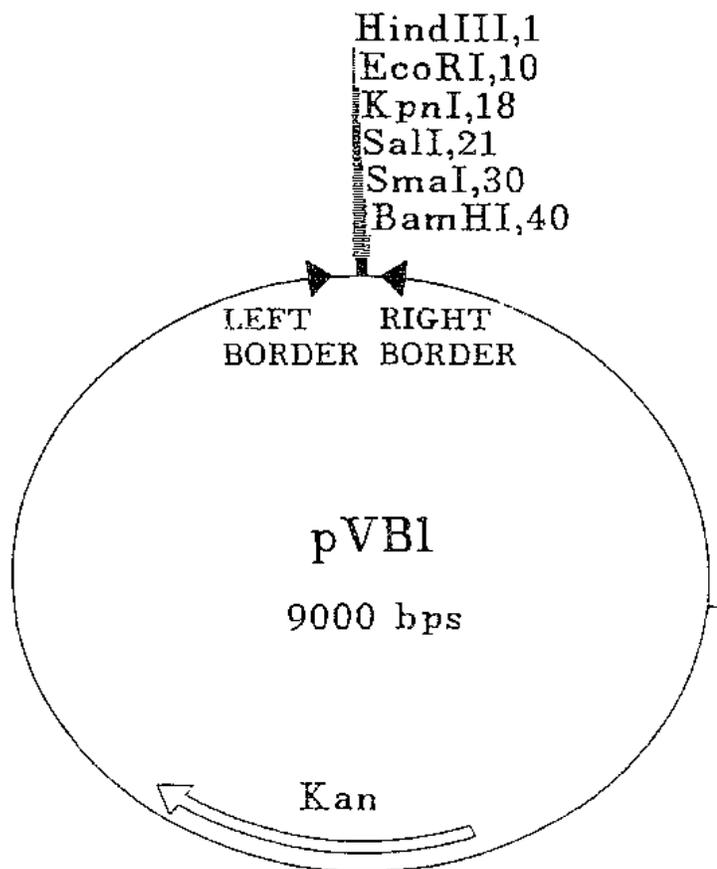
- Williamson P. (2016). Role of laccase in the virulence of *Talaromyces marneffeii*: A common link between AIDS-related fungal pathogens? *Virulence*.7 (6), 627– 629. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1198867>
- Warburg O, Wind F, Negelein E. 1927. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol* 8:519–530. doi: 10.1085/jgp.8.6.519.
- Wang Z, Dillon J, Gaillard ER (2006) Antioxidant properties of melanin in retinal pigment epithelial cells. *Photochem Photobiol* 82:474–479
- Winterbourn CC, Kettle AJ, Hampton MB (2016) Reactive oxygen species and neutrophil function. *Annu Rev Biochem* 85:765–792
- Youseff BH, Holbrook ED, Smolnycki KA, Rappleye CA (2012) Extracellular superoxide dismutase protects histoplasma yeast cells from host-derived oxidative stress. *PLoS Pathog* 8:e1002713
- Zhang D, Tang Z, Huang H, y col. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation. *Nature*. 2019;574(7779):575–580. doi:<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1678-1>.
- Zhang H, Yao F, Sun L. Cloning and characterization of the melanine biosynthesis genes from *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *1998;38:261-*

- Zhu X. y Williamson P. (2004). Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res* 5, 1-10. doi:10.1016/j.femsyr.2004.04.004
- Zhong Y, Li X, Yu D, y col. Application of mitochondrial pyruvate carrier blocker UK5099 creates metabolic reprogram and greater stem-like properties in LnCap prostate cancer cells in vitro. *Oncotarget*. 2015;6(35):37758–37769 doi:https://doi.org/10.18632/oncotarget.5386.
- Zhou, H. C., Xin-Yan Yan, Yu, W. W., Liang, X. Q., Du, X. Y., Liu, Z. C., Long, J. P., Zhao, G. H., & Liu, H. B. (2022). Lactic acid in macrophage polarization: The significant role in inflammation and cancer. *International reviews of immunology*, 41(1), 4–18. <https://doi.org/10.1080/08830185.2021.1955876>

ANEXOS

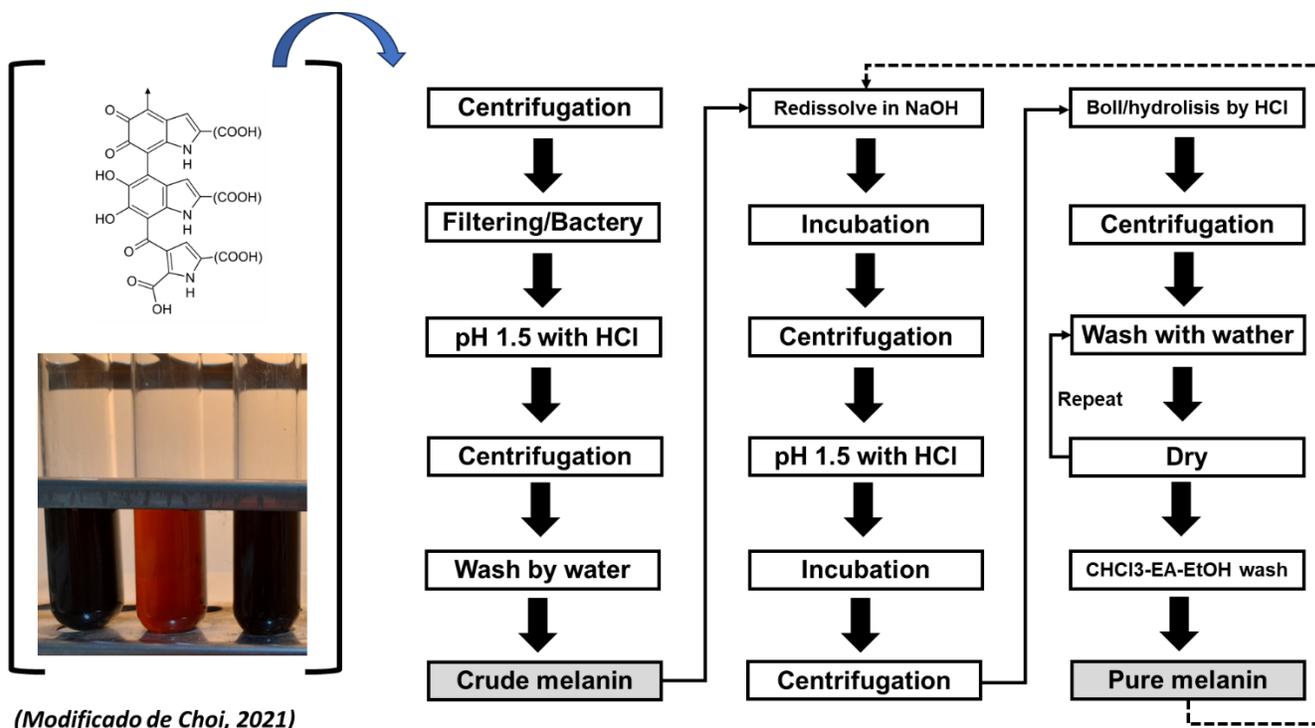
Anexo 1. Diseño esquema de plásmido pVB1 vector de inserto *BAB2_0534* presente en cepa *B. abortus* 2308 complementada.

pVB1 = Transformation vector base



Anexo 2

Protocolo modificado de extracción de melanina desde cultivos con diferentes sustratos precursores de melanina (Dopamina, L-DOPA y Acido Homogentísico HA).



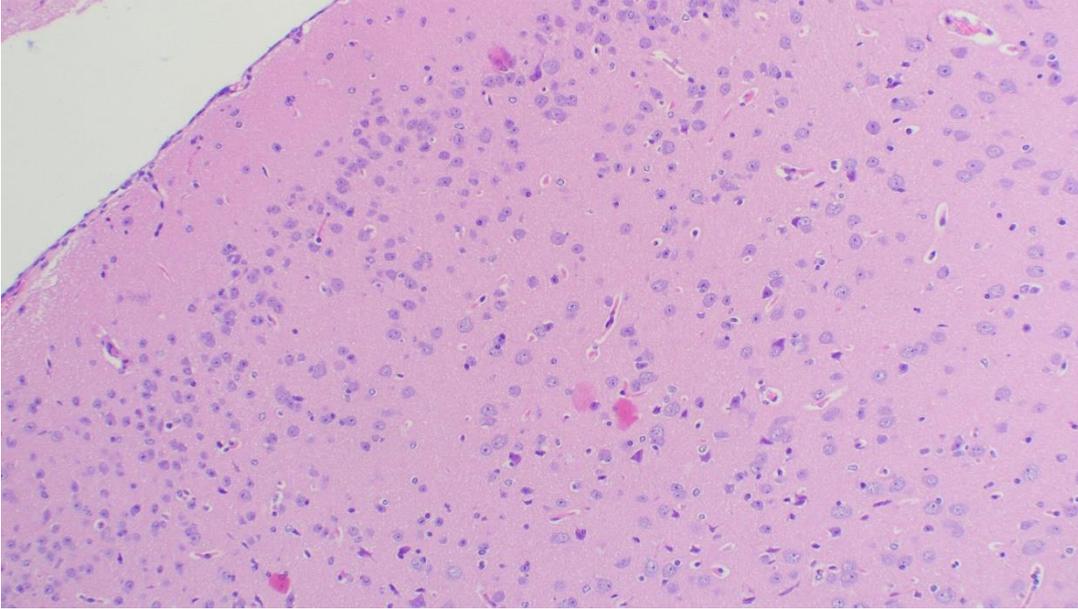
(Modificado de Choi, 2021)

2. Secuencia de aminoacidos de la proteina codificada por el marco de lectura BAB2_0534 de *B. abortus* 2308 obtenido por plataforma UniProt (Q2YKW0_BRUA2).

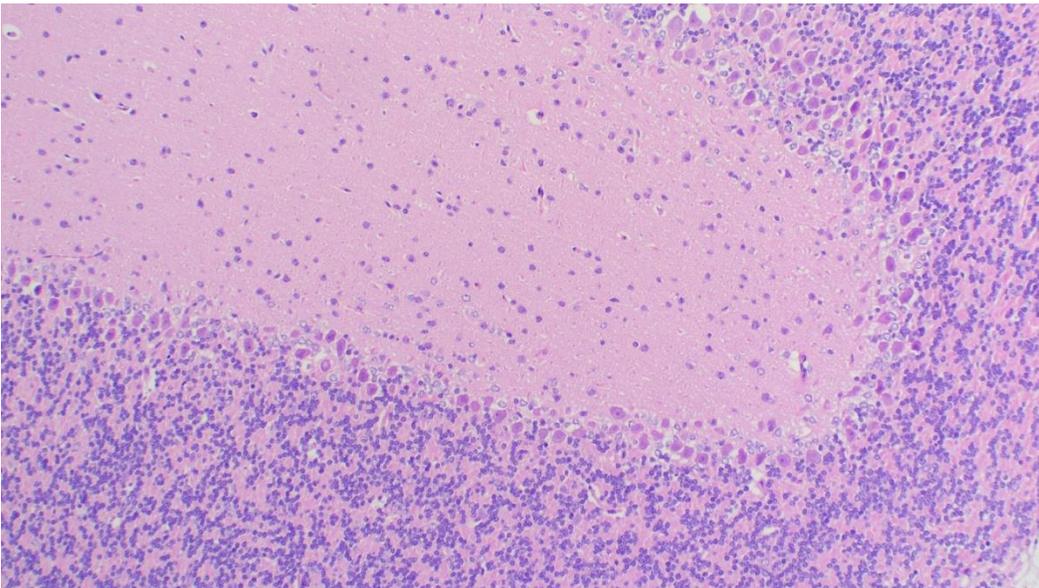
>tr|Q2YKW0|Q2YKW0_BRUA2 Multicopper oxidase, type 1:Multicopper oxidase, copper-binding:Twin-arginine translocation pathway signal OS=*Brucella abortus* (strain 2308) OX=359391 GN=*BAB2_0534* PE=4 SV=1
MGLPYEQAAGENATAGGTWGESAQYVCHDGMWRHCPSGGWVQHLSRSGAGFRL
AAACIRLERKQPVWGVAPSNSSSCLIEQIAAGFPAAMTIIVWRLIMTGITRRRLAL
GASAAACVAALRPLGAFAQDAHQHMRHGAVDAPVLKAPPLPLPPLVEPDASGIVRL
KVQKGRHSFAKGSTAASAGINGAYLGPLVRLMSGESVTLSVENAMDEETTLHWH
SLFVPSHLDGGPHNVIAPGAKWEPKVAVNQPASFNWFPHLHGHTARQAHMGIA
GLMIVRDGKDAERGLPETYGVDLPLVLQDRRVIEGDAVYAPDIMDLIHGFRGDW
LIVNGAIAPEARVPAAMVRLRLLNGANARNFHIRFADGRPLLVIASDGGFISQPVSI
EQLTISPGERYEVLVDFSNGEAVDLVTYGDNGSGDGLHLMRFTVDPALEGRVAKP
PVSLDGPAAPDEKLSVQRRSFFFDERMAENMKLMMRQPSSNPHASGDDMDHME
MGSMAGMDHDMHGSRSAADAGPALDALTSGVQMAIADKPFDMERIDVEAKLGS
WEIWELTSREMAHPFHHGASFRILSMNGKKPPAHQGTGWKDTALIDGKAEILVHFD
REARSHPFMFHCHLLEHEDVGMMAQFVTV

Anexo 3

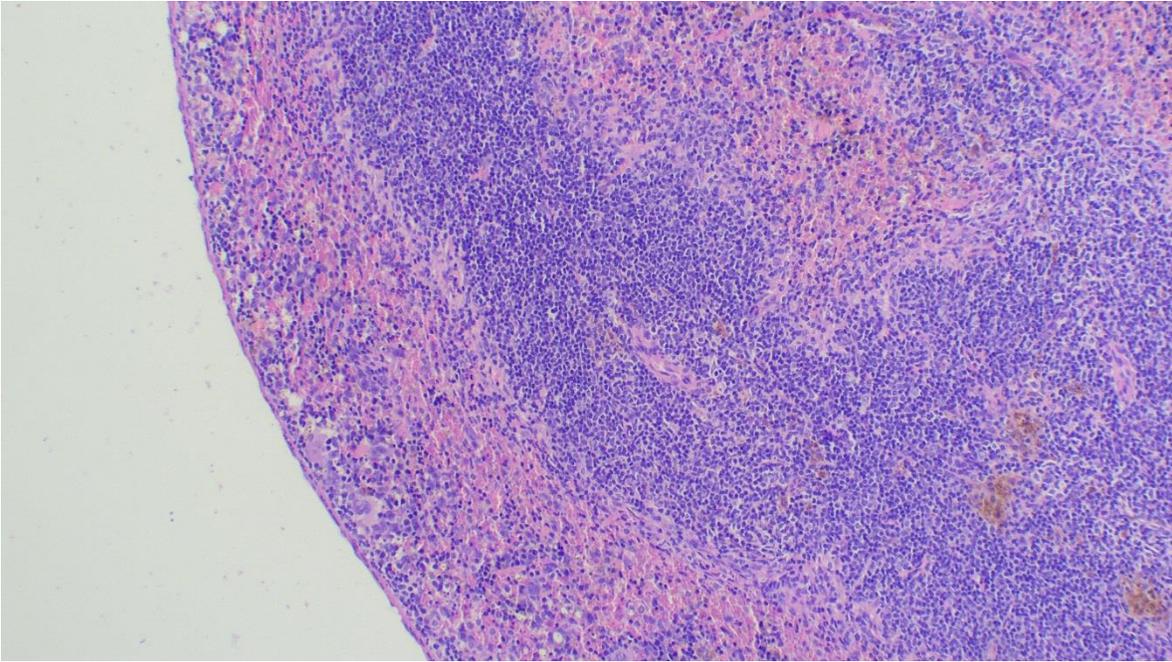
Tejidos BALB/c infectados con diferentes cepas de estudio de *Brucella* teñidos con técnica de Hematoxilina-Eosina.



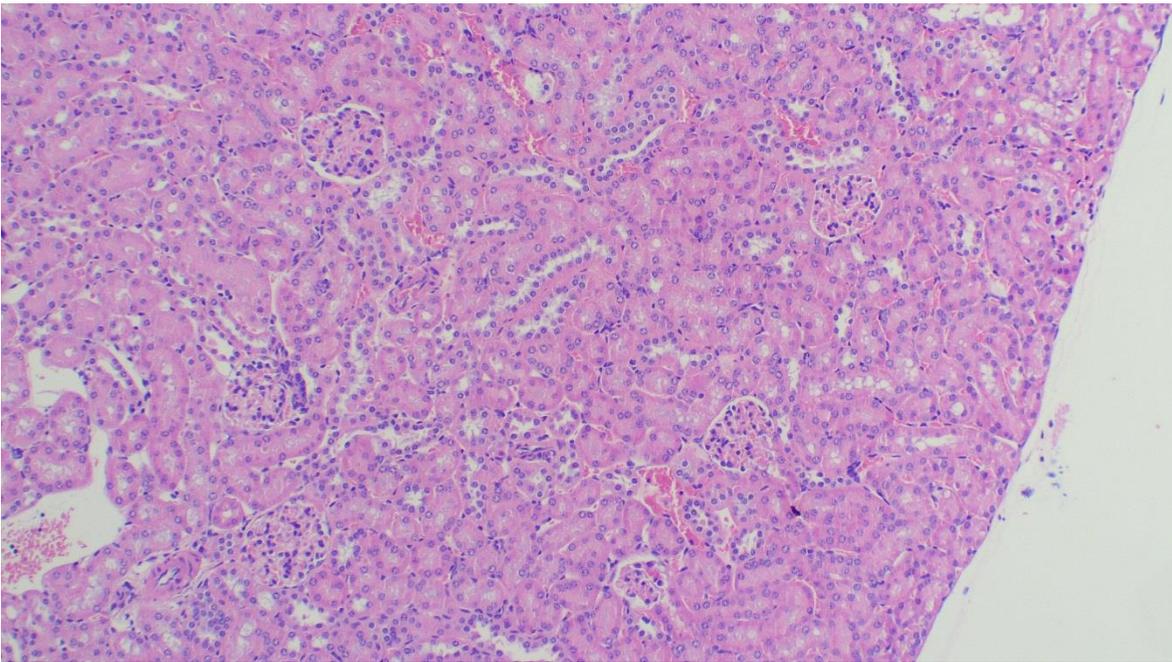
Tejido: Cerebro. Técnica: Hematoxilina eosina. Aumento: 10x. No se observan lesiones.



Tejido: Cerebelo. Técnica: Hematoxilina eosina. Aumento: 10x. No se observan lesiones.

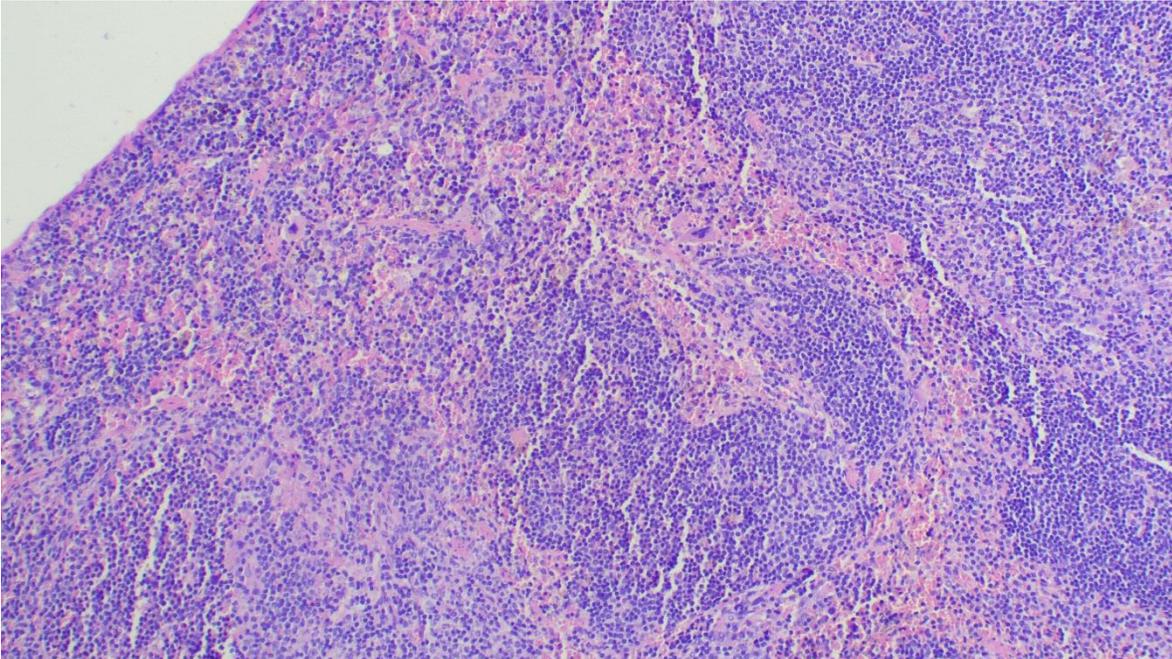


Tejido: Bazo. Técnica: Hematoxilina eosina. Aumento: 10x. No se observan lesiones.

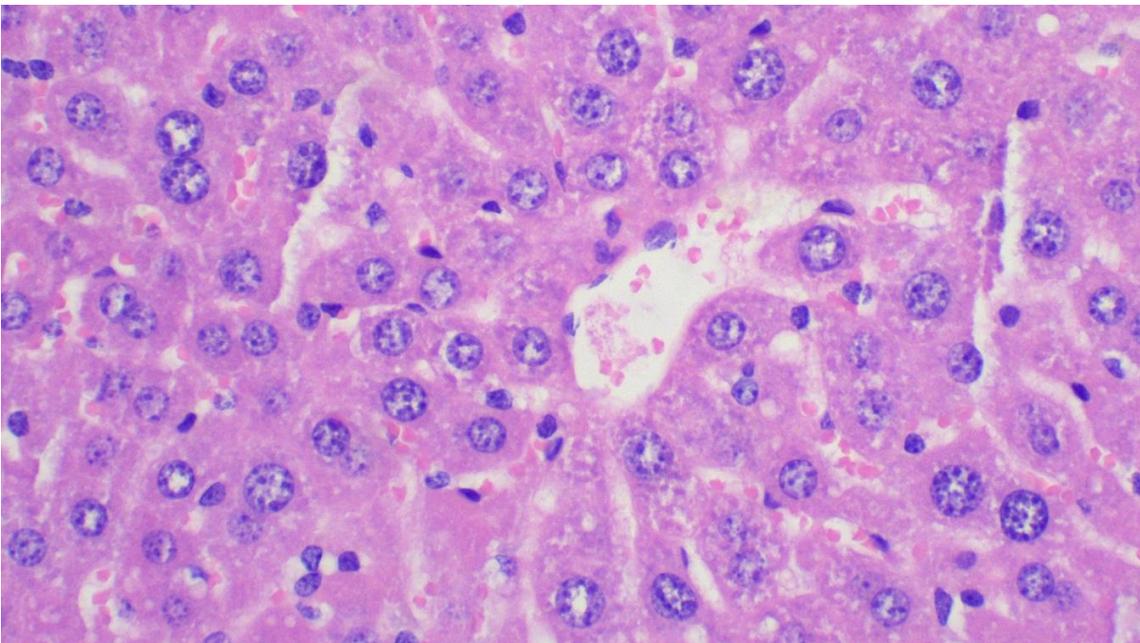


Tejido: Riñón. Técnica: Hematoxilina eosina. Aumento: 10x. No se observan lesiones.

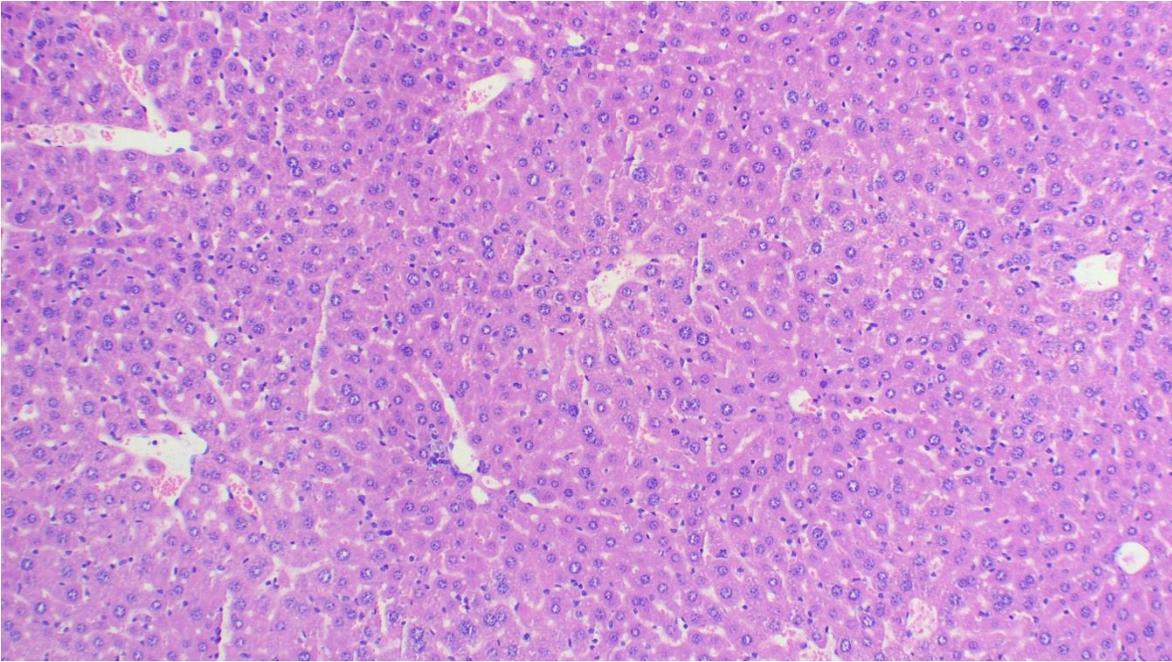
COMPLEMENTADA



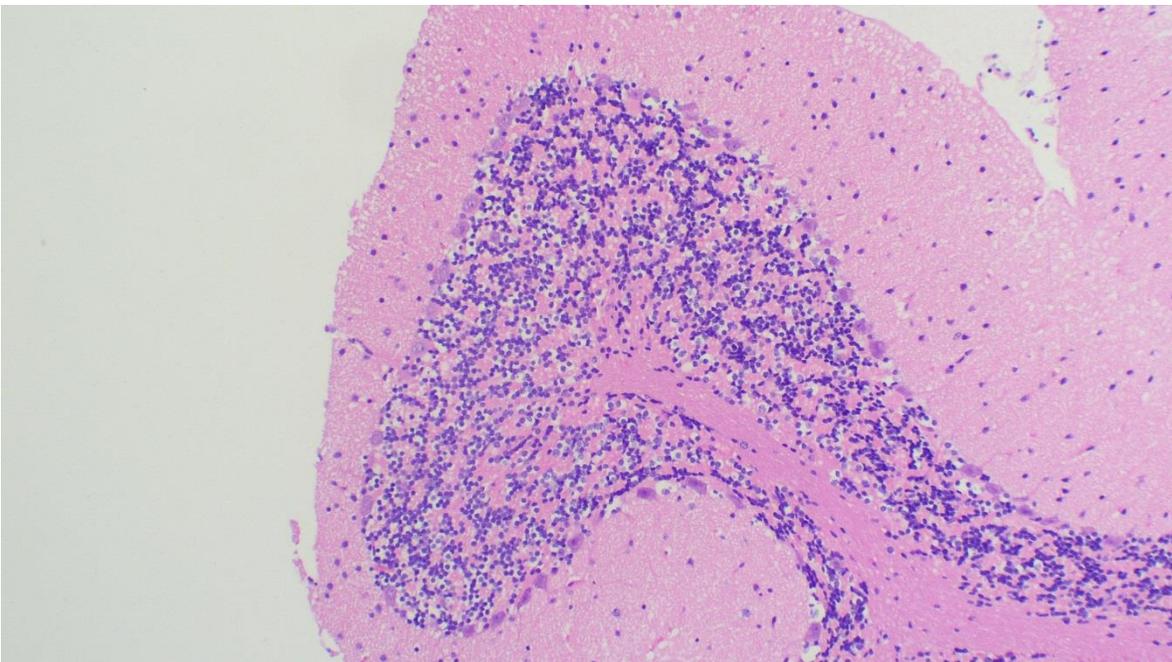
Tejido: Bazo. Técnica: Hematoxilina eosina. Aumento: 10x. No se observan lesiones.



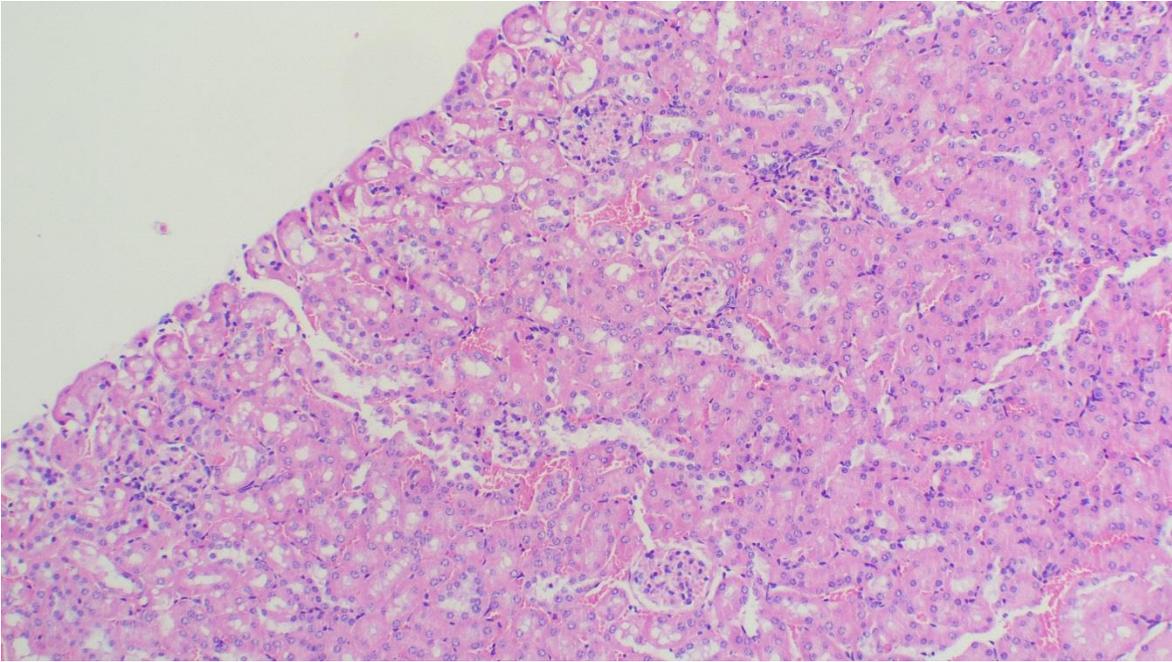
Tejido: Hígado. Técnica: Hematoxilina eosina. Aumento: 40x. Gránulos basófilos en los hepatocitos peri-vénula hepática central.



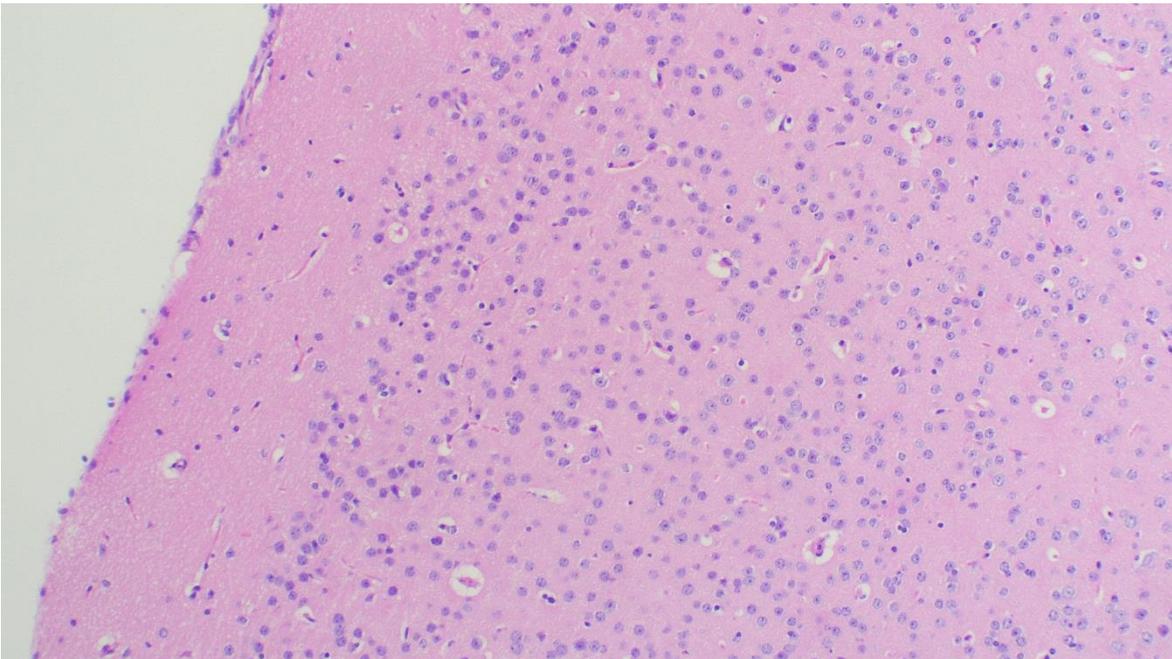
Tejido: Hígado. Técnica: Hematoxilina eosina. Aumento: 10x. Gránulos basófilos en los hepatocitos peri-vénula hepática central.



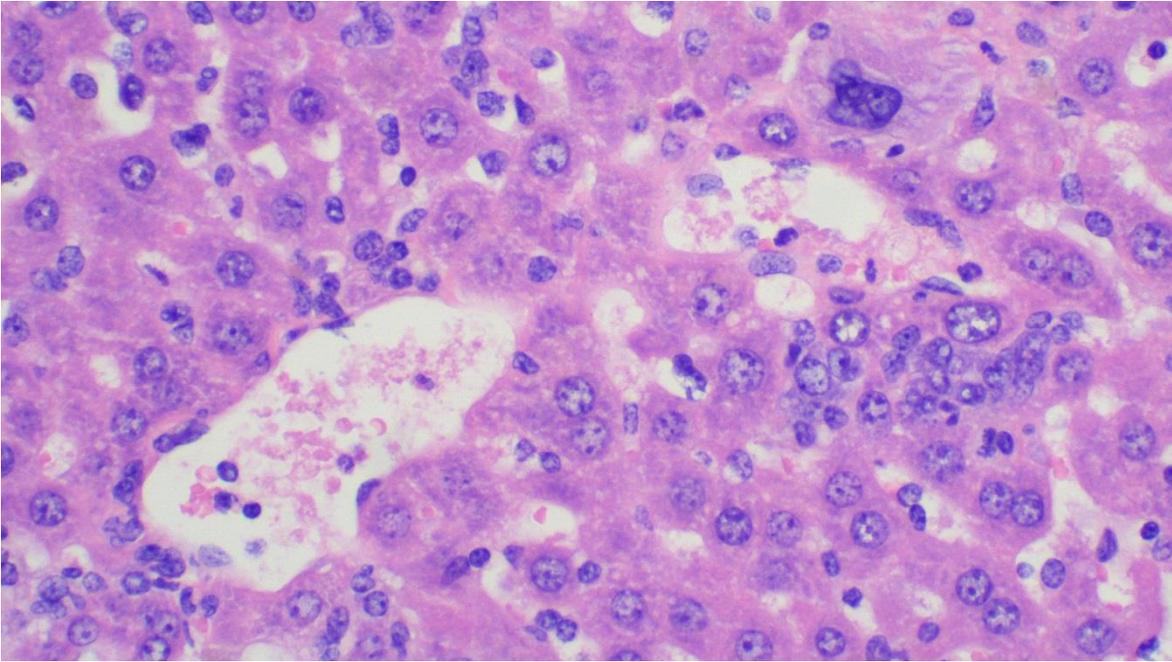
Tejido: Cerebelo. Técnica: Hematoxilina eosina. Aumento: 10x. No se observan lesiones.



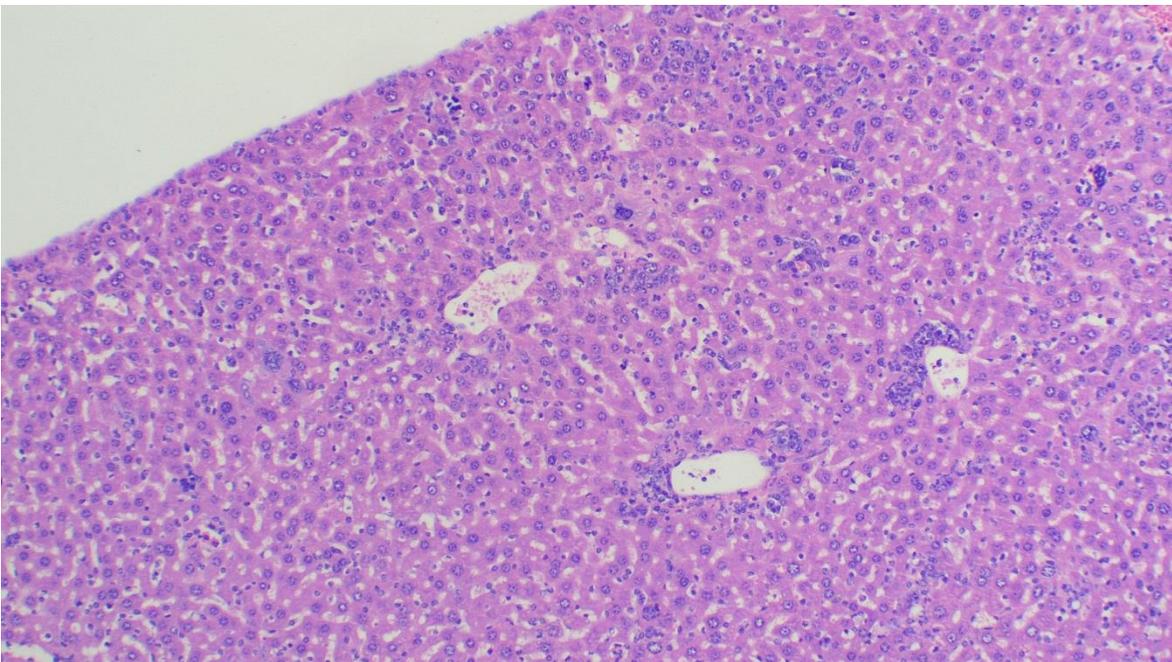
Tejido: Riñón. Técnica: Hematoxilina eosina. Aumento: 10x. No se observan lesiones.



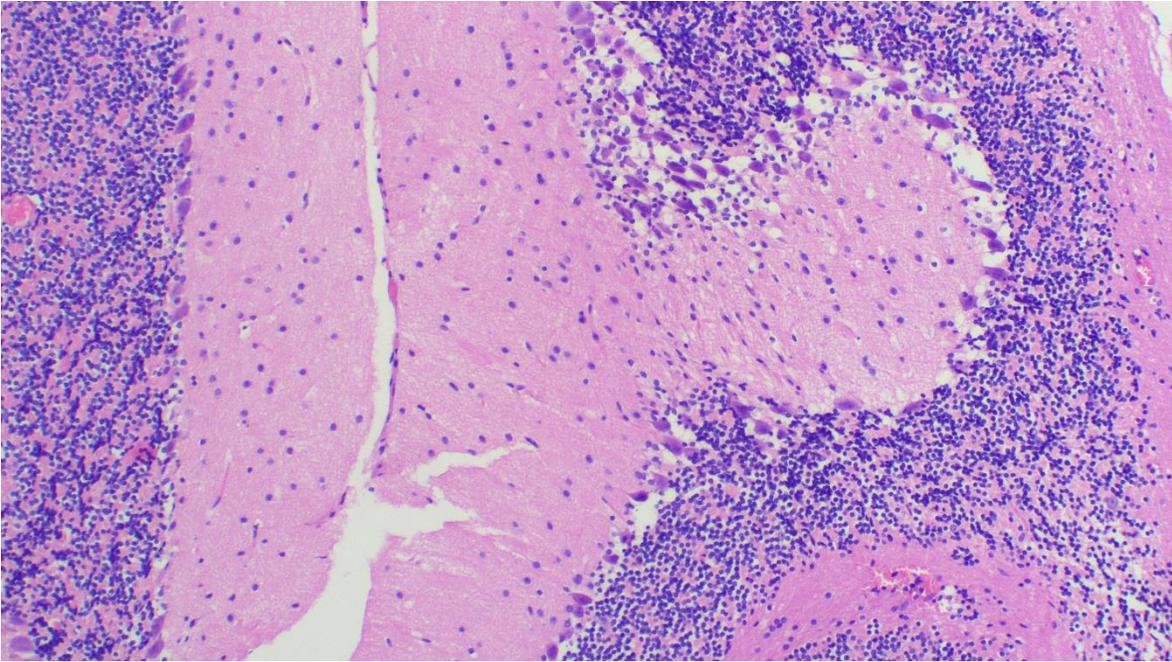
Tejido: Cerebro. Técnica: Hematoxilina eosina. Aumento: 10x. No se observan lesiones.



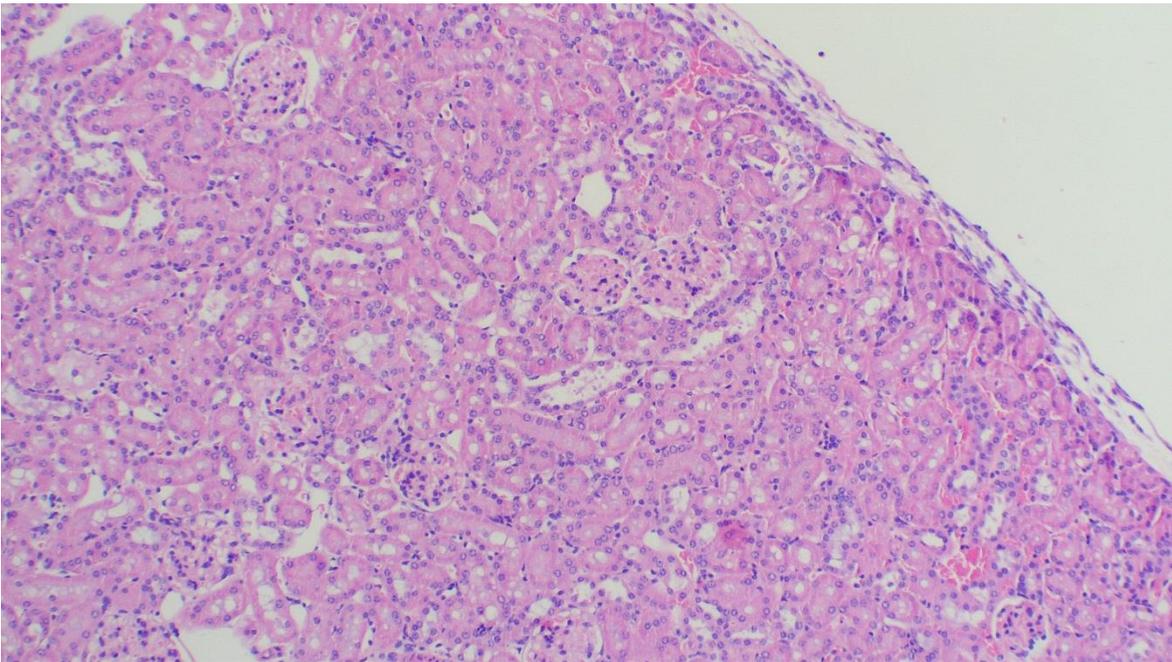
Tejido: Hígado. Técnica: Hematoxilina eosina. Aumento: 40x. Gránulos basófilos en los hepatocitos peri-vénula hepática central, más presencia de infiltrado de linfocitos en zona 3.



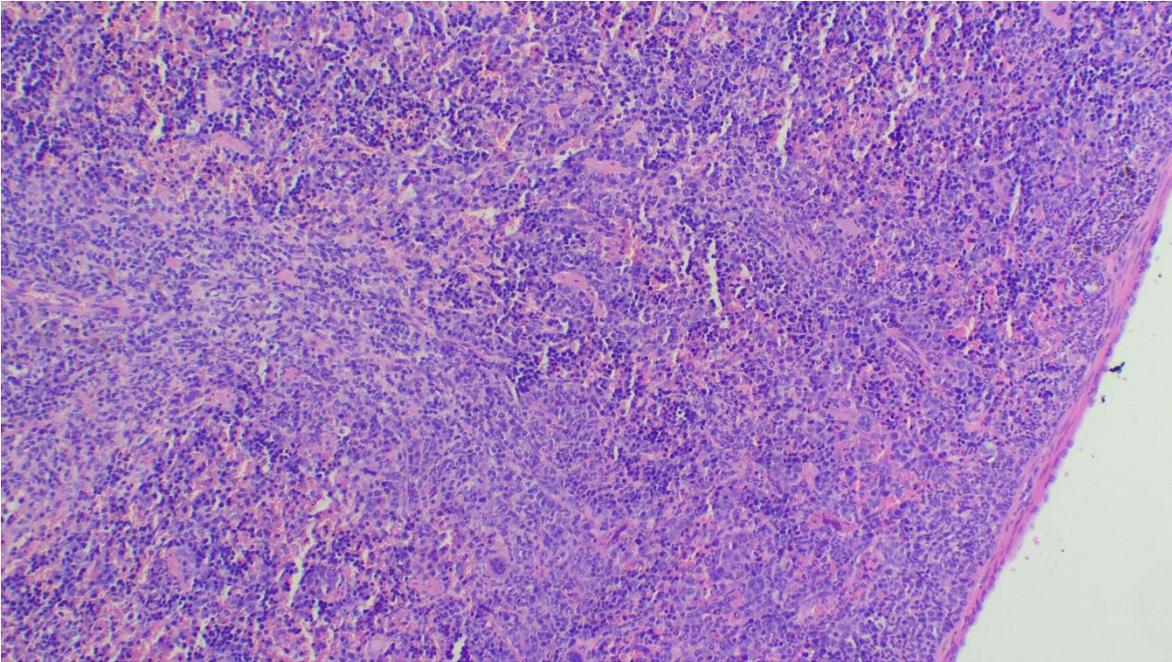
Tejido: Hígado. Técnica: Hematoxilina eosina. Aumento: 10x. Gránulos basófilos en los hepatocitos peri-vénula hepática central, más presencia de infiltrado de linfocitos en zona 3.



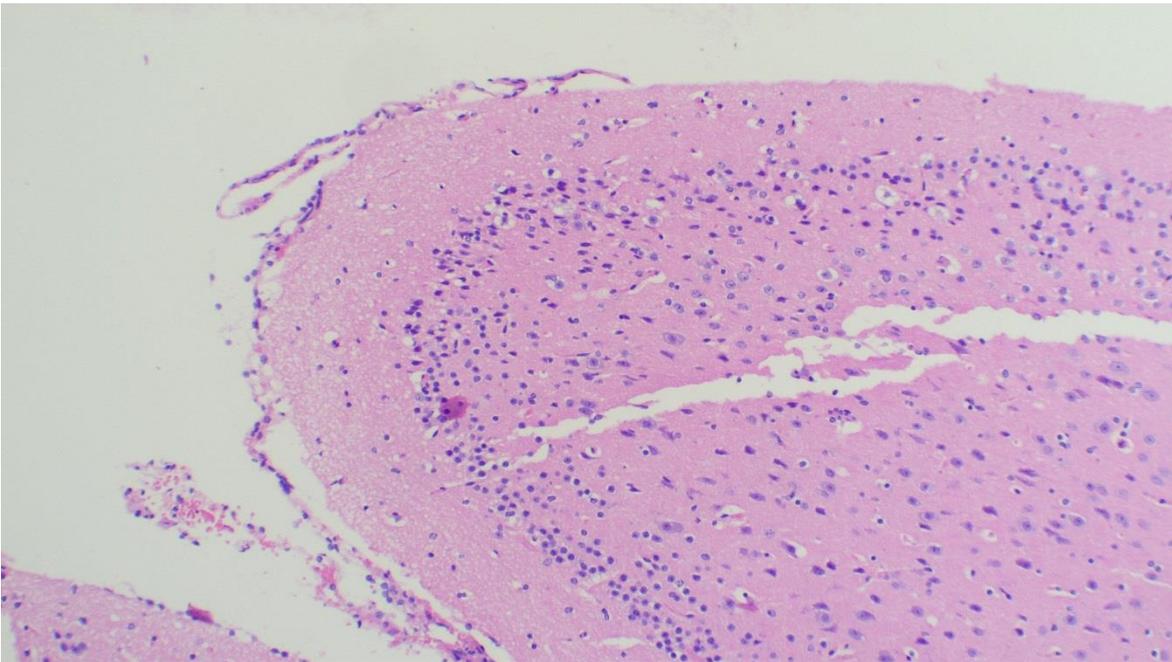
Tejido: Cerebelo. Técnica: Hematoxilina eosina. Aumento: 10x. No se observan lesiones.



Tejido: Riñón. Técnica: Hematoxilina eosina. Aumento: 10x. No se observan lesiones.

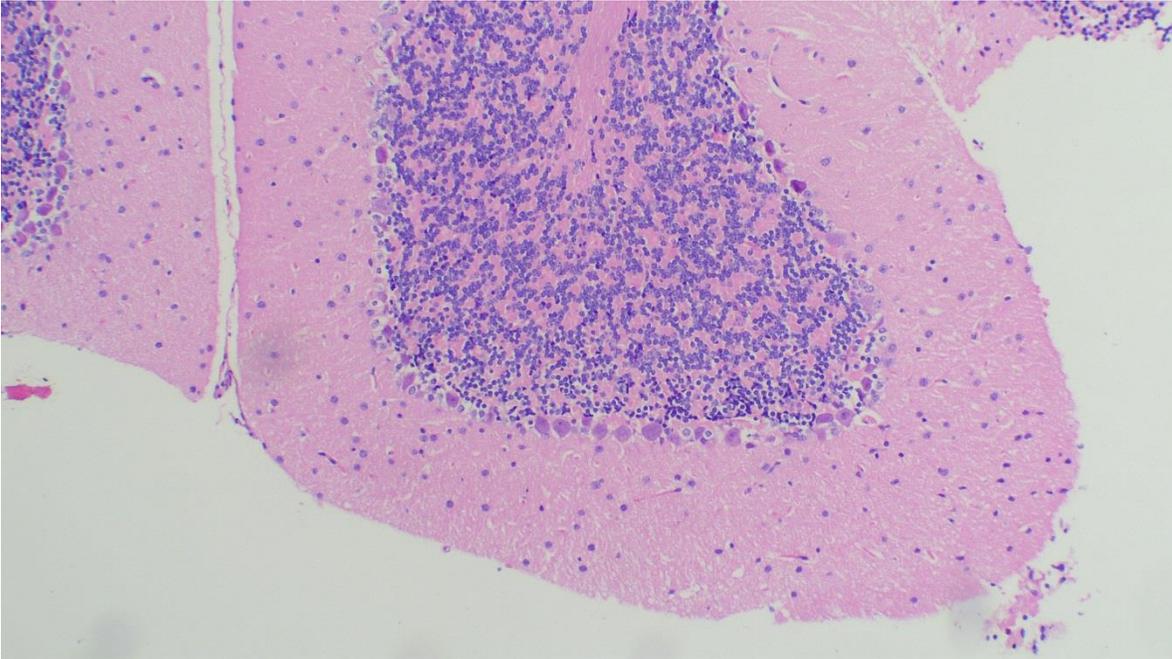


Tejido: Bazo. Técnica: Hematoxilina eosina. Aumento: 10x. No se observan lesiones.

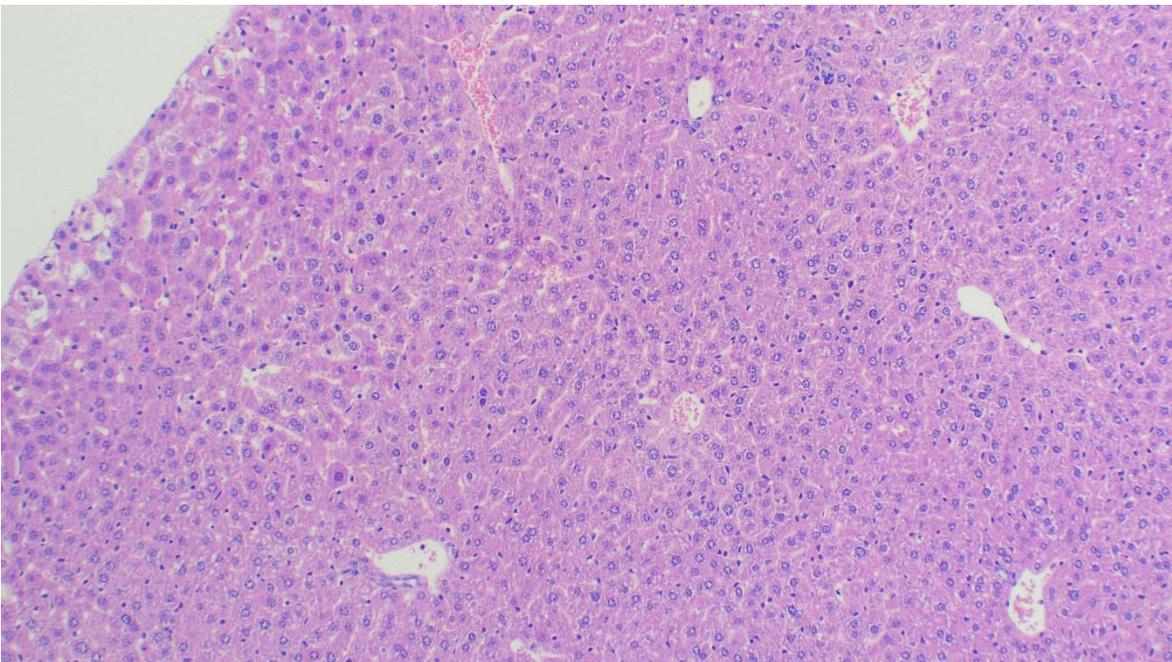


Tejido: Cerebro. Técnica: Hematoxilina eosina. Aumento: 10x. No se observan lesiones.

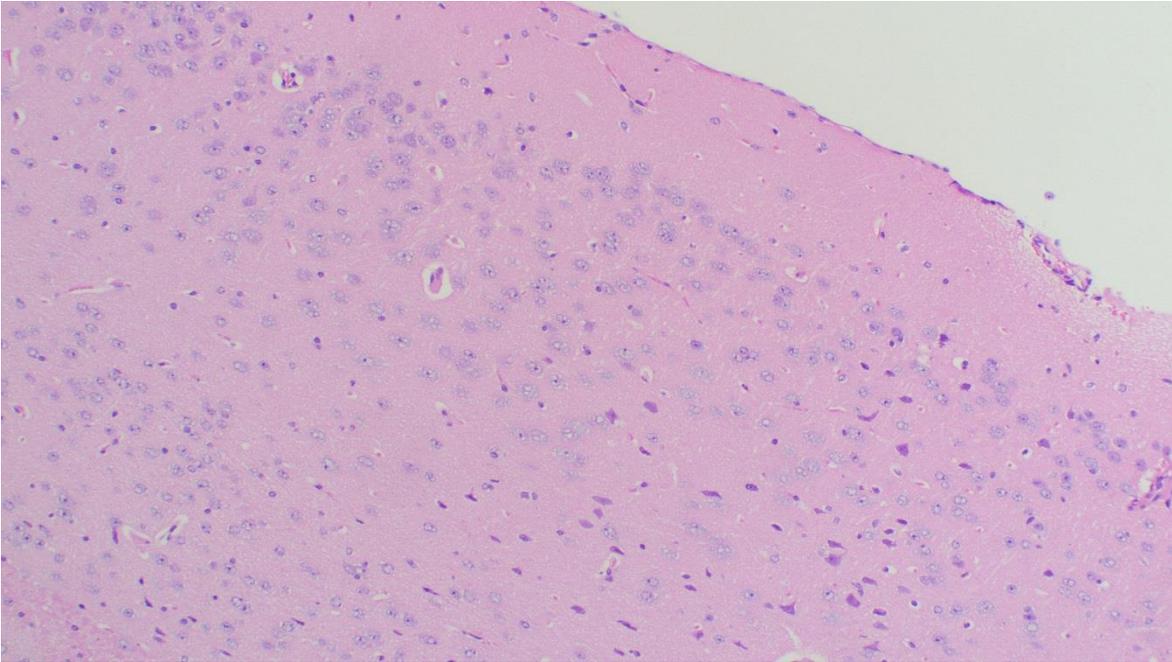
Control



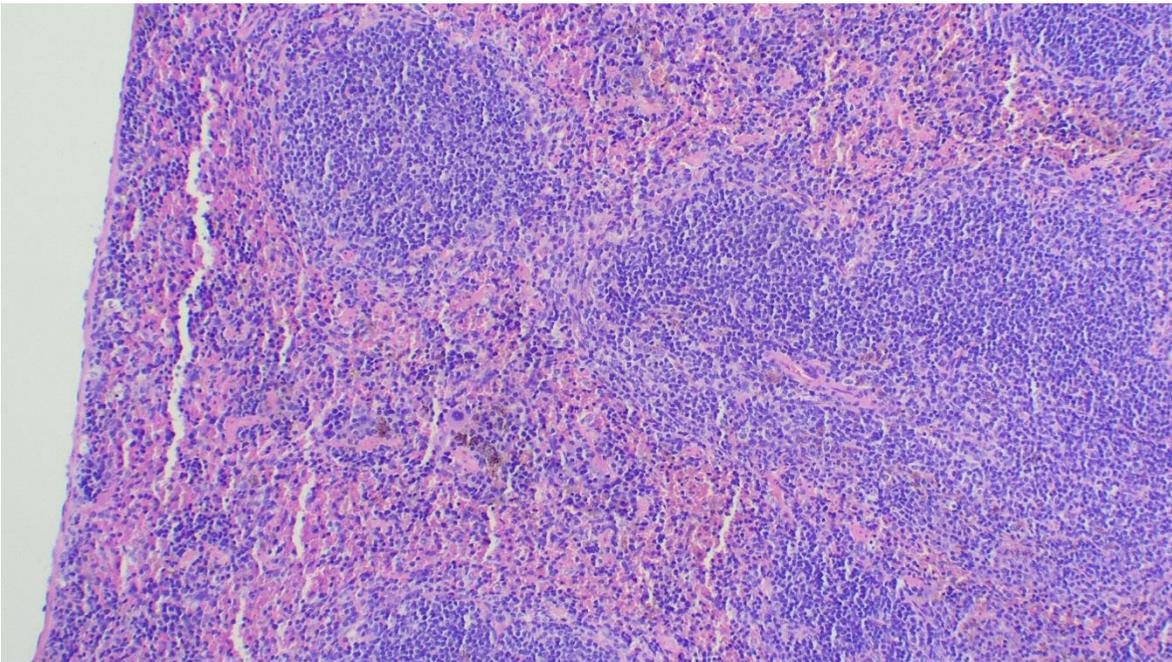
Tejido: Cerebelo. Técnica: Hematoxilina eosina. Aumento: 10x. No se observan lesiones.



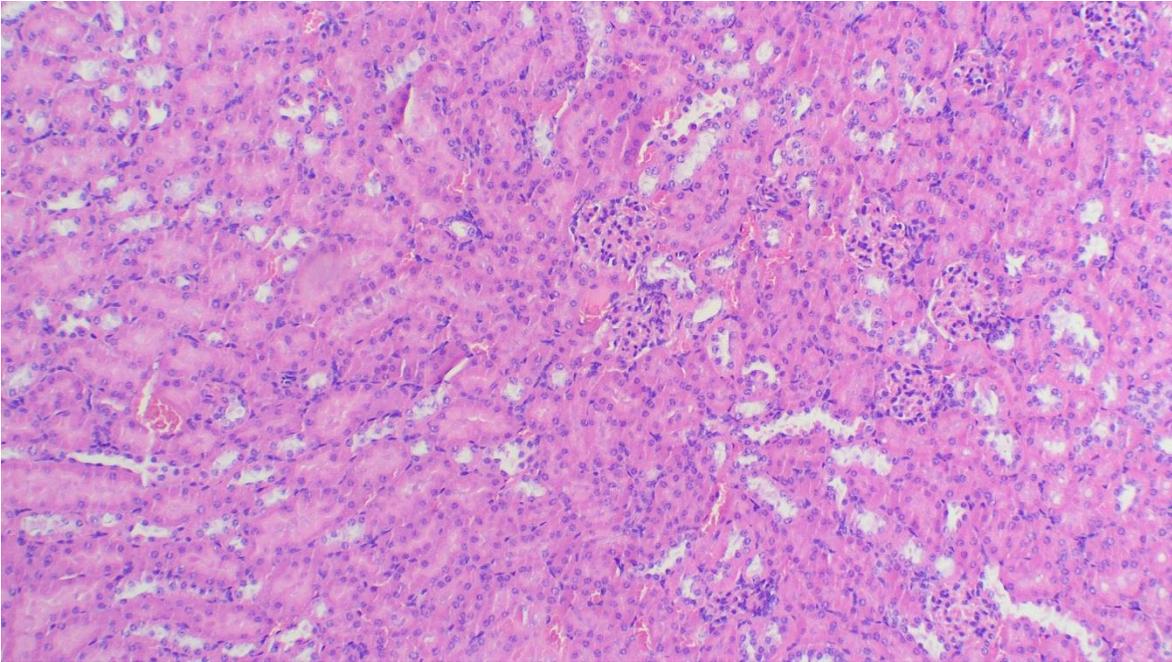
Tejido: Hígado. Técnica: Hematoxilina eosina. Aumento: 10x. No se observan lesiones.



Tejido: Cerebro. Técnica: Hematoxilina eosina. Aumento: 10x. No se observan lesiones.



Tejido: Bazo. Técnica: Hematoxilina eosina. Aumento: 10x. No se observan lesiones.



Tejido: Riñón. Técnica: Hematoxilina eosina. Aumento: 10x. No se observan lesiones.

Esquema hipotético interacción producto génico BAB2_0534 de *Brucella abortus* 2308 con ambiente extra e intracelular del macrofago hospedador.

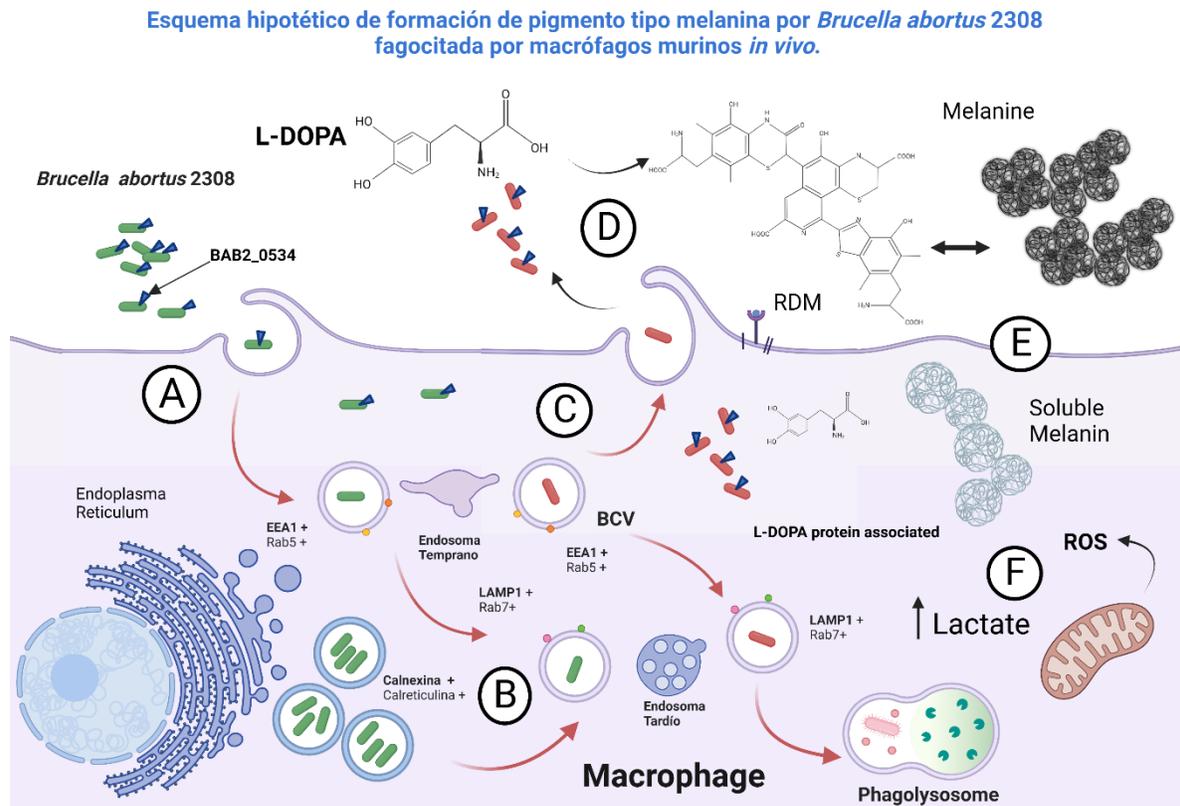


Figura 26: Esquema hipotético propuesto para la formación del pigmento tipo melanina por *Brucella abortus* 2308 fagocitado por macrófagos murinos *in vivo*. (A) una vez internalizada *B. abortus* 2308 por los macrófagos murinos, se encuentra involucrada en procesos que le permiten adquirir en su vacuola membranosa otras proteínas (B) que le permiten el normal tránsito intracelular, algunas bacterias son exocitadas de la célula con

sus proteínas de membrana activas entre ellas el producto génico del marco de lectura BAB2_0534 (C) el que por medio de reacciones exogénicas (sin la intervención de ATP) al estar en presencia del sustrato (L-DOPA) tanto extracelular como intracelular asociado a proteínas por las cuales circula por los transportadores de dopamina estaría formando este pigmento tipo melanina (D), la que es acumulada en los tejidos intersticiales y así también ocurre el mismo procedimiento a nivel intracelular acumulándose (E) dentro de los macrófagos permitiendo movilizar estos pigmentos y provocando diferentes cambios a nivel intracelular como disminuyendo el efecto microbicida de ERDOS y permitiendo el cambio metabólico de macrófagos murinos aumentando la producción de lactato (F)