

RESUMEN

Una de las capacidades desarrolladas por las bacterias para sobrevivir a nuevos ambientes, ha sido la adquisición de grandes fragmentos de ADN provenientes de otras bacterias no relacionadas filogenéticamente. Dentro de estos segmentos de ADN se destacan las islas genómicas (IGs). Estas islas pueden codificar vías metabólicas y/o factores de virulencia que otorgan nuevas características, pudiendo transformar una bacteria no patógena en patógena. En algunos casos, las IGs pueden prescindirse del sitio de integración y eventualmente perderse, por lo tanto, una especie que ha adquirido una IG determinada, puede ser reconocida frente a otras bacterias de la misma especie, detectando la presencia de la IG completa o de regiones presentes en su secuencia. Esta situación, permite el uso de estos elementos genéticos como indicadores de ciertos tipos de bacterias, especialmente de aquellas patógenas de interés clínico-microbiológico e incluso permite desarrollar herramientas de diagnóstico molecular o ser utilizadas como blancos para el desarrollo de vacunas de última generación.

En *Brucella* se han identificado nueve islas genómicas, de estas, dos no se encuentran en *B. abortus* la isla genómica 4 y la isla genómica 8 (GI-4, GI-8). En este estudio nos centraremos en la isla genómica 3 (GI-3), la cual está presente en las cepas secuenciadas de *B. abortus* 2308 y 9-941. La mayoría de los genes presentes en GI-3 no tienen función asignada, por esta razón se presenta como un excelente sustrato de estudio en cepas silvestres chilenas.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el grado de conservación genética de la isla genómica 3 en cepas chilenas aisladas de bovinos, utilizando técnicas como “Tiling-path PCR” y PCR-RFLP, para posteriormente determinar en fragmentos conservados de esta

isla, marcos de lectura abiertos con potencialidad de ser utilizados como blancos para el desarrollo de estrategias de vacunación molecular.

Los resultados obtenidos por PCR demostraron que 69/70 cepas de campo de *B. abortus* aisladas de bovinos infectados presentaron la isla GI-3, lo que nos indico la alta estabilidad de esta isla en cepas silvestres. Por otro lado al dividir GI-3 en cuatro fragmentos (A, B, C y D) y ser analizada por “Tiling-path PCR”, encontramos que todos los fragmentos A, B, C y D, comprendido entre los genes BruAb1_0244 - BruAb1_0251, BruAb1_0251 - BruAb1_0256, BruAb1_0256 - BruAb1_0266 y BruAb1_0266 - BruAb1_0274 respectivamente, estuvieron presentes en las 69 cepas que poseen la isla. Luego de obtener estos resultados, nos abocamos a caracterizar el grado de conservación de la estructura de cada uno de los fragmentos constituyentes de IG-3, para esto aplicamos la técnica de RFLP. Como resultado de este análisis encontramos que en cepas de campo IG-3 es conservada, ya que al digerir los productos A, B, C y D generados por “Tiling path-PCR” con las endonucleasas *AvaII* (A), *EaeI* (B), *BanI* (C), y *BspHI* (D) se observa que cada fragmento presentó el mismos patrón de corte que la cepa tipo.

Luego de comprobar el nivel de conservación de IG-3, se procedió a analizar cada uno sus marcos de lectura abiertos (ORFs) a fin de determinar cuál de ellos pudiese servir como un posible blanco para el diseño de vacunas. Para esto, se realizó un análisis “in silico” de cada ORF que constituye la isla. Como resultado de este análisis, se encontró dos ORFs de interés, Bru Ab1_0257 y Bru Ab1_0273. Posteriormente se procedió a mutar ambos ORFs por delección sitio-específica y a evaluar la virulencia de ambas mutantes en un modelo murino y en fagocitos profesionales y no profesionales. Nuestros resultados indican que la mutación en el gen BruAb1_ 273 reduce la capacidad de *B. abortus* de persistir en los órganos de ratones infectados y en los dos tipos celulares, a

diferencia de la mutación generada en el gen BruAb1_257, la que se comporta igual a la cepa “wild-tipe” 2308.

