

Proyecto interdisciplinario de investigación genera conocimiento sobre los mecanismos de adaptación a la vida intracelular de *Brucella abortus*

Olga Rivas Solano*
orivas@itcr.ac.cr

Las bacterias del género *Brucella* causan una enfermedad denominada brucelosis, la cual es endémica en países del Mediterráneo, Norte y Este de África, Medio Oriente, Asia, Centro y Suramérica. Esta enfermedad afecta una gran variedad de mamíferos. La especie *B. abortus*, genera grandes pérdidas económicas en América Central, debido a que produce abortos e infertilidad en ganado bovino. El ser humano también puede contagiarse, ya que se trata de una enfermedad zoonótica. En los humanos la enfermedad se conoce también como *fiebre de Malta*^{1,2,3}.

El Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC) participó, en conjunto con investigadores de la Universidad Nacional (UNA) y la Universidad de Costa Rica (UCR), en un proyecto interdisciplinario de investigación que contó con financiamiento del Fondo Especial para la Educación Superior (FEES) del Consejo Nacional de Rectores (CONARE). El objetivo consistió en investigar los mecanismos moleculares de adaptación de *B. abortus* a la vida intracelular.

B. abortus es una bacteria intracelular facultativa. Su patogénesis está relacionada con su capacidad para invadir las células de su hospedero. Después de internalizarse, la bacteria logra transitar dentro de la célula hospedera, evadiendo los mecanismos de defensa e inmunidad innata de la célula. Finalmente, la bacteria se establece dentro de un compartimento denominado nicho replicativo, en el cual es capaz de multiplicarse^{4,5}.

En el proyecto se trabajó con mutantes en el sistema de dos componentes (TCS) BvrR/

BvrS, los cuales son muy atenuados al no poder entrar y transitar dentro de las células. Los TCS son sistemas de regulación génica muy comunes en las bacterias. Como su nombre lo indica, presentan dos componentes. Uno de ellos se conoce como componente *sensor*, ya que su función consiste en detectar cambios en el entorno de la bacteria. Como respuesta a estos cambios, el componente sensor procede a activar al segundo componente, que recibe el nombre de componente *regulador*. Normalmente la activación ocurre mediante una reacción de fosforilación. En su forma activada, el componente regulador se encarga de regular la expresión de genes, lo que le permite a la bacteria adaptarse a las condiciones externas detectadas por el componente sensor. En el caso del TCS BvrR/BvrS, BvrR es el componente regulador y BvrS es el sensor. Cabe mencionar que este es uno de los TCS más estudiados en *Brucella* por su relación con la virulencia^{6,7}. En la figura 1 se ilustra el funcionamiento de un TCS bacteriano.

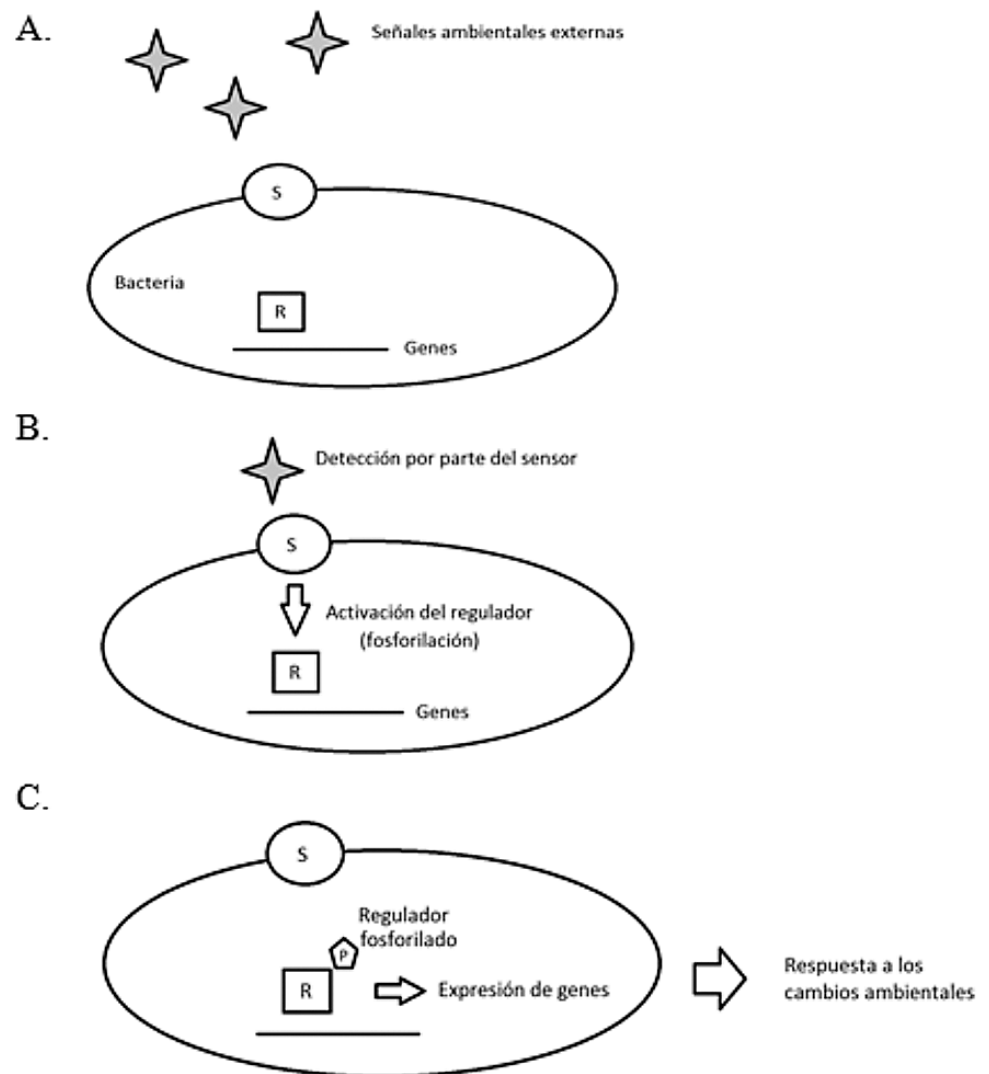


Figura 1. Ilustración del funcionamiento de un TCS bacteriano. **A.** Estos sistemas entran en juego cuando se presentan cambios en el entorno de la bacteria, los cuales constituyen señales ambientales externas a la célula bacteriana. **B.** El componente sensor detecta estas señales y activa al componente regulador por fosforilación. **C.** El componente regulador fosforilado regula (es decir, enciende o apaga) la expresión de ciertos genes para que la bacteria pueda generar una respuesta a los cambios ambientales, lo que eventualmente le permite adaptarse a las condiciones de su entorno.

Como parte de las actividades del proyecto, se trabajó implementando y midiendo la reacción de fosforilación de BvrR en bacterias intactas y extraídas de condiciones intracelulares. Para ello se empleó la técnica del Phos-tagTM, que permite detectar moléculas fosforiladas, ya que se une selectivamente a los grupos fosfato⁸. El fundamento consiste en hacer migrar las moléculas a estudiar, en este caso el componente BvrR, a través de una matriz porosa que contiene el Phos-tagTM, de manera tal que este se va a unir a las moléculas fosforiladas retrasando su movilidad, lo que permite diferenciar cuándo se encuentran fosforiladas y cuándo no lo están. En la figura 2 se muestra un ejemplo del resultado esperado al comparar los patrones de migración de moléculas fosforiladas y sin fosforilar. Como se puede observar, la proteína fosforilada presenta un patrón de migración electroforética retrasado en comparación con la proteína no fosforilada.

Por otra parte, se sabe que *Brucella* presenta un sistema de secreción Tipo 4 (T4SS), denominado VirB. Los T4SS son también muy comunes en otros patógenos bacterianos. Normalmente están constituidos por un conjunto de proteínas que se encuentran en la membrana de las bacterias, formando una especie de jeringa que permite transportar directamente sustancias desde la bacteria hacia otras células, en el caso de *Brucella* hacia la célula hospedera⁹. Las cepas de *Brucella* con mutaciones en el T4SS, no son capaces de establecer el nicho replicativo, por lo que se sospecha que este sistema es crucial para la patogénesis de esta bacteria^{10,11}.

En el proyecto se estandarizó un ensayo para determinar, en bacterias extracelulares e intracelulares, los niveles de VirB8. Esta es una de las proteínas que forman parte del T4SS VirB de *Brucella*. De manera que este proyecto permitió abordar los eventos moleculares que tienen lugar durante las primeras horas de la infección por *B. abortus*, las cuales son esenciales para permitir el establecimiento de una infección intracelular.

El TEC continúa investigando sobre este tema, en conjunto con las otras universidades participantes. ■

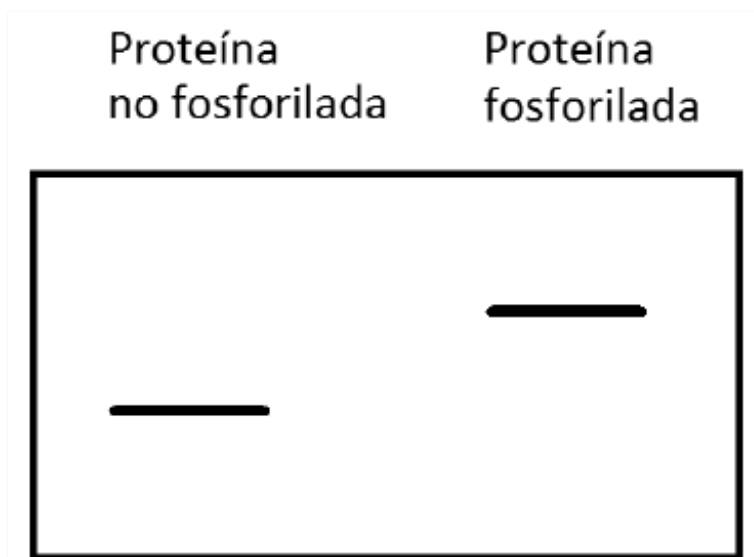


Figura 2. Esquema del resultado esperado al realizar la técnica del Phos-tagTM para diferenciar entre proteínas no fosforiladas y proteínas fosforiladas.

Referencias

1. Corbel, M.J. (2006). *Brucellosis in humans and animals*. Genova: WHO Press.
2. Godfroid, J., Cloeckert, A., Liautard, J.P., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., Garin-Bastuji, B. & Letesson, J.J. (2005). From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet Res*, 36(3), 313-326.
3. Moreno, E. (2002). *Brucellosis in Central America*. *Vet Microbiol*, 90, 31-38.
4. Moreno, E. & Gorvel, J.P. (2004). Invasion, intracellular trafficking and replication of *Brucella* organisms in professional and non-professional phagocytes. En López-Goñi, I. & Moriyón, I. (Ed.), *Brucella Molecular and Cellular Biology*. (pp. 287-312). Norfolk: Horizon Bioscience.
5. Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D.M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. & Gorvel, J.P. (2003). *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med*, 198, 545-556.
6. Dale, J.W. & Park, S.F. (2004). *Molecular genetics of bacteria*. (p. 92). John Wiley & Sons, Ltd.
7. López-Goñi, I., Manterola, L. & Pan, S.Q. (2004). The *Brucella* BvrR/BvrS and related two component regulatory systems of the σ -2 Proteobacteria: common regulatory strategies of animal and plant pathogens and endosymbionts. En López-Goñi, I. & Moriyón, I. (Ed.), *Brucella Molecular and Cellular Biology*. (pp. 287-312). Wymondham: Horizon Bioscience.
8. Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., & Koike, T. (2009). Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE. *Nature protocols*, 4(10), 1513-1521.
9. Backert, S. & Meyer, T.F. (2006). Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, 9, 207-217.
10. Delrue, R.M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrade, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Gorvel, J.-P. & Letesson, J.-J. (2001). Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol*, 3(7), 487-497.
11. Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D.M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. & Gorvel, J.P. (2003). *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med*, 198, 545-556.

*Ingeniera en biotecnología, máster en microbiología, estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias de la UCR. Actualmente realiza su tesis doctoral en aspectos relacionados con la regulación génica de la virulencia de *B. abortus*.

Centro de Investigación en Biotecnología. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica.