

# ***Brucella abortus*: patogénesis y regulación génica de la virulencia**

## ***Brucella abortus*: pathogenicity and gene regulation of virulence**

Olga Rivas-Solano<sup>1</sup>

---

*Fecha de recepción: 19 de setiembre del 2014*  
*Fecha de aprobación: 17 de diciembre del 2014*

Rivas-Solano, O. *Brucella abortus*: patogénesis y regulación génica de la virulencia. *Tecnología en Marcha*. Vol. 28, N° 2, Abril-Junio. Pág 61-73.

---

<sup>1</sup> Ingeniera en Biotecnología, Máster en Microbiología, Estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias de la Universidad de Costa Rica. Teléfono: (506) 2550-9026. Correo electrónico: orivas@itcr.ac.cr. Centro de Investigación en Biotecnología. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica.

## Palabras clave

*Brucella abortus*; Omp25; VirB; BvrR/BvrS; VjbR.

## Resumen

*Brucella abortus* es un patógeno intracelular facultativo que pertenece a la subdivisión  $\alpha 2$  de la clase Proteobacteria. Causa una brucelosis, una zoonosis ampliamente distribuida a nivel mundial. Los principales síntomas incluyen abortos y esterilidad en ganado, así como fiebre ondulante en humanos. En regiones endémicas como Centroamérica, la brucelosis tiene un alto impacto socioeconómico. En el Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) se desarrolló en fecha reciente un proyecto de investigación básica, con el objetivo de estudiar la regulación de algunos genes implicados en la virulencia, estructura e inmunogenicidad de *B. abortus*. Como parte de ese proyecto se elaboró el presente artículo de revisión de literatura. La virulencia de esta bacteria parece estar determinada por su habilidad para internalizarse, sobrevivir y replicarse dentro de fagocitos profesionales y no profesionales. *B. abortus* alcanza su nicho replicativo sin activar los mecanismos antimicrobianos de la inmunidad innata del hospedero. Esta bacteria posee sistemas de regulación génica a nivel transcripcional que le permiten una rápida adaptación al ambiente intracelular, entre ellos el sistema de transducción de señales de dos componentes BvrR/BvrS y el regulador de Quorum Sensing llamado Vjbr, así como otros factores de transcripción que, en conjunto, forman una compleja red de regulación génica.

## Keywords

*Brucella abortus*; Omp25; VirB; BvrR/BvrS; VjbR.

## Abstract

*Brucella abortus* is a zoonotic intracellular facultative pathogen belonging to the subdivision  $\alpha 2$  of class Proteobacteria. It causes a worldwide distributed zoonotic disease called brucellosis. The main symptoms are abortion and sterility in cattle, as well as an undulant febrile condition in humans. In endemic regions like Central America, brucellosis has a high socioeconomic impact. A basic research project was recently conducted at the ITCR with the purpose of studying gene regulation of virulence, structure and immunogenicity in *B. abortus*. The present review was written as part of this project. *B. abortus* virulence seems to be determined by its ability to invade, survive and replicate inside professional and non-professional phagocytes. It reaches its intracellular replicative niche without the activation of host antimicrobial mechanisms of innate immunity. It also has gene regulation mechanisms for a rapid adaptation to an intracellular environment such as the two-component signal transduction system BvrR/BvrS and the quorum sensing regulator called Vjbr, as well as other transcription factors. All of them integrate a complex gene regulation network.

## Descripción del género *Brucella*

El género *Brucella* está constituido por bacterias cocobacilares, Gram negativas, aerobias, no móviles, no esporuladas y no encapsuladas (Corbel y Brinley-Morgan, 1984). Filogenéticamente, se clasifican en la subdivisión  $\alpha 2$  de las Proteobacterias (Moreno et al., 1990). Las Alfabroteobacterias agrupan patógenos de plantas y mamíferos, así como simbioses y organismos de vida libre. *Brucella* se comporta como un patógeno zoonótico intracelular facultativo (Ficht, 2010). En el cuadro 1 se describen las nueve especies reconocidas por

el Subcomité Internacional de Taxonomía de *Brucella*. Existe una especie adicional que fue propuesta en 2008 pero no ha sido aceptada (Banai y Corbel, 2010).

**Cuadro 1.** Especies reconocidas y propuestas del género *Brucella*.

Especies		Preferencia de hospedero	Patogenicidad para los humanos	Referencias bibliográficas
Reconocidas	<i>B. melitensis</i>	Cabras	Alta	Bruce, 1887
	<i>B. abortus</i>	Ganado vacuno	Alta	Bang, 1906
	<i>B. suis</i>	Cerdos	Alta	Huddleson et al., 1929
	<i>B. ovis</i>	Ovejas	Ninguna	Buddle, 1956
	<i>B. neotomae</i>	Rata del desierto	Ninguna	Stoenner y Lackman, 1957
	<i>B. canis</i>	Perros	Moderada	Carmichael & Bruner, 1968
	<i>B. ceti</i>	Cetáceos	Desconocida	Ewalt et al., 1994 Ross et al., 1994 Foster et al., 2007 <sup>2</sup>
	<i>B. pinnipidialis</i>	Pinípedos	Desconocida	Ross et al., 1994 Foster et al., 2007
	<i>B. microti</i>	Zorros y roedores <sup>1</sup>	Desconocida	Scholz et al., 2008
Propuesta	<i>B. innopinata</i>	Desconocida <sup>2</sup>	Alta	De et al., 2008 Tiller et al., 2010

<sup>1</sup> *B. microti* también se ha aislado del suelo; <sup>2</sup> *B. innopinata* se ha aislado de implantes mamarios y biopsias de pulmón en humanos, pero aún no se ha encontrado un reservorio animal.

Fuente: Adaptado de Godfroid et al. (2011), Ficht (2010) y Banai y Corbel (2010).

El genoma de la mayoría de las brucelas posee dos cromosomas circulares, uno de de 2.1 Mb (cromosoma 1) y otro de 1.2 Mb (cromosoma 2). Entre ambos codifican aproximadamente 3500 genes (Michaux et al., 1993).

### Características de la brucelosis

Las bacterias del género *Brucella* causan brucelosis, enfermedad endémica en países de Centroamérica y Suramérica, la cuenca mediterránea, el Norte y el Este de África, Medio Oriente y Asia (Corbel, 2006). La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera la brucelosis como una de las siete zoonosis más extendidas a nivel mundial y menos priorizada por los sistemas de salud ([http://www.who.int/zoonoses/neglected\\_zoonotic\\_diseases/en/index.html](http://www.who.int/zoonoses/neglected_zoonotic_diseases/en/index.html)).

*B. abortus* presenta tropismo por el sistema reproductor del ganado vacuno. En los machos, la infección puede ocasionar epididimitis, orquitis o atrofia testicular; mientras que las

hembras infectadas desarrollan abortos, retención de placenta, infertilidad y disminución en la producción de leche (Songer y Post, 2005). En placentas de rumiantes, la replicación bacteriana intracelular destruye los trofoblastos y las bacterias se diseminan a los tejidos y fluidos cercanos. La transmisión de animal a animal se da generalmente por ingestión de material contaminado después del aborto, ya que las bacterias son eliminadas a través del feto, las membranas fetales y las secreciones uterinas (Corbel, 2006). De esta manera, se reanuda el ciclo de infección, replicación intracelular y muerte de la célula hospedera (Anderson et al., 1986a; Anderson et al., 1986b).

En humanos, *B. abortus* causa una infección caracterizada por síntomas inespecíficos como malestar, anorexia y postración. En ausencia de tratamiento, estos síntomas pueden persistir por semanas o meses. Algunos signos reportados son fiebre intermitente, engrosamiento del hígado, bazo o nódulos linfáticos (Corbel, 2006). La diseminación y multiplicación de la bacteria en los nódulos linfáticos, bazo, hígado, médula ósea y órganos sexuales ocurre, principal pero no exclusivamente, por medio de los macrófagos (Ko y Splitter, 2003). La infección puede tornarse crónica y presentar complicaciones osteoarticulares, gastrointestinales, hepatobiliares, pulmonares, genitourinarias, cardiovasculares y neurológicas, entre otras consecuencias potencialmente mortales (Corbel, 2006). Las vías de transmisión al ser humano incluyen la ingestión de productos lácteos no pasteurizados, el contacto directo con animales infectados y la inhalación de aerosoles bacterianos (Godfroid et al., 2005).

En América Central, las pérdidas económicas por brucelosis ascienden a US\$25 millones por año. Esta cifra resulta significativa si se considera que los países centroamericanos cuentan con bajos recursos y que la ganadería es una de las diez principales fuentes de ingresos de la región (Moreno, 2002). Además, el costo del tratamiento en humanos implica una inversión alta por parte de los sistemas de salud, ya que consiste en una terapia combinada de varios antibióticos durante periodos que van desde tres hasta ocho semanas (Akova et al., 1993; Ariza et al., 1985; FAO & WHO, 1986).

## Patogénesis

En una gran parte de los patógenos bacterianos conocidos se han descrito factores de virulencia considerados clásicos, por ejemplo, cápsulas, fimbrias y exotoxinas. Sin embargo, la mayoría de estos factores no se han encontrado en *Brucella*. La virulencia de esta bacteria pareciera estar determinada por su habilidad para internalizarse, sobrevivir y replicarse dentro de fagocitos profesionales y no profesionales (Moreno y Moriyón, 2002; Moreno y Gorvel, 2004).

*Brucella* emplea distintas estrategias para invadir a sus células hospederas. En macrófagos, la cadena O del lipopolisacárido (LPS) liso de las bacterias no opsonizadas interactúa con moléculas receptoras ubicadas en la membrana de la célula hospedera, como ManR, entre otros. Luego es ingerida por medio de las balsas lipídicas. Generalmente ingresa a la célula hospedera mediante un mecanismo de fagocitosis tipo “zipper”, el cual se caracteriza por la inducción de rearrreglos moderados en la membrana y el citoesqueleto de la célula hospedera, aunque no se da un reclutamiento extensivo de actina (Porte et al., 2003; Moreno y Gorvel, 2004). Los macrófagos también pueden ingerir brucelas opsonizadas a través de receptores de Fc, de complemento o de fibronectina (Moreno y Gorvel, 2004). En células intestinales M y epiteliales, también se ha constatado el ingreso de *Brucella* por medio del mecanismo tipo “zipper”. En células HeLa, *Brucella* se une a receptores desconocidos en la membrana y penetra por fagocitosis con reclutamiento moderado de actina y activación de GTPasas pequeñas como Cdc42, Rac y Rho. La bacteria se une en mayor cantidad y se internaliza de manera más eficiente cuando las células HeLa se tratan con el factor citotóxico necrotizante

(CNF), el cual induce la formación de pliegues y fibras de estrés en la membrana de la célula hospedera (Guzmán-Verri et al., 2001).

En general, los fagocitos profesionales logran internalizar un alto número de bacterias debido a su naturaleza fagocítica (Celli et al., 2003). Sin embargo, la eficiencia de internalización en fagocitos no profesionales suele ser baja, lo que sugiere que no todas las células son permisivas, o bien que no todas las bacterias son capaces de unirse a fagocitos no profesionales (Sola-Landa et al., 1998). En macrófagos, la mayoría de las bacterias ingeridas son dirigidas a los fagolisosomas y muy pocas logran alcanzar el retículo endoplásmico, que es su nicho replicativo. Por el contrario, en células epiteliales, la mayoría de las bacterias ingeridas son dirigidas al retículo endoplásmico y en menor proporción a los lisosomas (Moreno y Gorvel, 2004).

Según el modelo propuesto por Celli et al. (2003), una vez que *Brucella* se internaliza en los macrófagos, escapa de la vía endocítica y se localiza en un compartimento no replicativo denominado BCV (*Brucella-containing vacuole*), el cual interactúa brevemente con los lisosomas, pero escapa de ellos y se transforma en una vacuola con pH ácido. Luego, interactúa de manera prolongada con el retículo endoplásmico e inclusive se fusiona de forma limitada con esta organela, lo que conlleva a la adquisición de algunas de sus propiedades como, por ejemplo, el pH neutro. Así, la BCV se transforma en una organela derivada del retículo endoplásmico que permite la replicación bacteriana.

Tanto en macrófagos como en células epiteliales, *Brucella* inhibe o retrasa la fusión de fagosomas y lisosomas (Ko y Splitter, 2003). Una vez que la bacteria alcanza su nicho replicativo, se encuentra protegida de antibióticos y factores bactericidas del hospedero como el complemento y los anticuerpos, lo cual facilita el establecimiento de una infección crónica (Roop et al., 2009). Luego de la replicación de la bacteria, la BCV se convierte en un compartimento con características autofágicas abreviado como aBCV. La formación de la aBCV requiere algunas proteínas que están implicadas en el inicio de la autofagia, pero es independiente de proteínas asociadas a la elongación. La aBCV es necesaria para completar el ciclo intracelular de *Brucella* y para la diseminación de la bacteria entre célula y célula, lo que demuestra que esta bacteria es capaz de apropiarse selectivamente de los complejos de iniciación de la autofagia para tomar control de la célula hospedera y promover la infección (Starr et al., 2012). *Brucella* también logra reconocer algunas señales de estrés (ácido o nutricional) a nivel intracelular para regular su propia expresión génica e incluso modificar algunas funciones de los fagocitos profesionales. Por ejemplo, puede inducir resistencia a la apoptosis en macrófagos, así como inhibir la capacidad de presentación de antígenos de las células dendríticas (Roop et al., 2009).

### Determinantes bacterianos asociados a la patogenicidad

En patógenos Gram negativos, los componentes de la membrana externa pueden contribuir al establecimiento de la infección, pero también pueden convertirse en blancos para su neutralización por parte del hospedero (Cloekaert et al., 2002). En cambio, el lipopolisacárido (LPS) de *Brucella* presenta particularidades que contribuyen a su supervivencia intracelular, algunas de ellas ancestrales como, por ejemplo, su baja actividad biológica (no induce signos de sepsis, fase de respuesta aguda, reclutamiento de neutrófilos ni producción significativa de citoquinas), y otras intrínsecas, como su resistencia a péptidos catiónicos bactericidas producidos por el hospedero. El LPS de *Brucella* tampoco activa la vía alterna del complemento (Moreno y Moriyón, 2002; Ko y Splitter, 2003; Roop et al., 2009).

*Brucella* presenta además una reducción en los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), los cuales normalmente se ubican en la envoltura celular y son reconocidos por los

mecanismos antimicrobianos de la inmunidad innata del hospedero (Janeway et al., 2002; Lapaque et al., 2006; Moreno et al., 1981; Rasool et al., 1992; Barquero-Calvo et al., 2007).

Las bacterias del género *Brucella* presentan gran heterogeneidad en los componentes y en la topología de su membrana externa, lo cual se traduce en propiedades antigénicas y funcionales diferentes que influyen en la interacción con el hospedero. Las proteínas de membrana externa (OMP) de *Brucella* se clasifican en tres grupos de acuerdo con su peso molecular. El grupo 1 está constituido por OMP menos abundantes con pesos moleculares de 88-94 kDa. El grupo 2 consiste de porinas de 36-38 kDa, mientras que en el grupo 3 se incluyeron inicialmente proteínas de 25-27 kDa y posteriormente se incluyeron otras proteínas de 31-34 kDa. En *B. abortus* se encontró que las OMP de 25-27 kDa y las de 31-34 kDa están codificadas por los genes *omp25* y *omp31*, respectivamente, por lo que estas OMP se designaron Omp25 y Omp31. La secuenciación de genomas de las diferentes especies de *Brucella* ha revelado que existe una familia de siete OMP constituida por Omp31b, Omp25b, Omp25c, Omp25d, Omp22, Omp25 y Omp31. En conjunto, esta familia se conoce como Omp25/Omp31 y se ha visto que sus miembros se encuentran fuertemente unidos al LPS en la membrana externa. La familia Omp25/Omp31 posee proteínas ortólogas en otras alfaproteobacterias como *Rhizobium*, *Bartonella* y *Agrobacterium*. Algunas de estas OMP ortólogas están implicadas en la interacción hospedero-patógeno (Cloekaert et al., 2002).

Algunos patógenos Gram negativos presentan en su envoltura celular complejos multiproteicos conocidos como sistemas de secreción tipo IV (T4SS), que están implicados en la traslocación de efectores de virulencia a la célula hospedera (Backert y Meyer, 2006). En *Brucella* se ha descrito el T4SS VirB (Delrue et al., 2001) que está codificado por un operón de 12 genes. Los mutantes para el T4SS VirB no pueden controlar las interacciones de la BCV con el retículo endoplásmico y permanecen en compartimentos inmaduros que eventualmente se fusionan con los lisosomas. Por lo tanto, el T4SS VirB es esencial para el establecimiento de un nicho intracelular seguro que posibilite la supervivencia a largo plazo de la bacteria (Celli et al., 2003). Según Sieira y colaboradores (2004), la expresión del operón *virB* depende de la acidificación de la BCV y alcanza su máximo nivel a las 5 h post-infección pero luego es rápidamente apagada. de Jong y colaboradores (2008) describieron dos efectores traslocados por el T4SS VirB, denominados VceA y VceC, pero se desconoce su función. Marchesini y colaboradores (2011), por su parte, confirmaron por inmunofluorescencia el transporte de la proteína BPE123 a través del T4SS VirB. Esta es una proteína de 17 kDa altamente conservada en las especies de *Brucella* con genoma secuenciado. Además, presenta homología con proteínas descritas en otras alfaproteobacterias filogenéticamente relacionadas como *Ochrobactrum* y *Bartonella*. Sin embargo, BPE123 no es esencial para la virulencia de *B. abortus*. Los autores especulan que podría haber una redundancia en la función de los diferentes efectores secretados a través del T4SS VirB. Finalmente, de Barys y colaboradores (2011) identificaron otro efector designado como RicA que es traslocado a través del T4SS VirB y que recluta la GTPasa Rab2 del hospedero hacia la vacuola que contiene a la bacteria durante el tráfico intracelular de *Brucella*. Recientemente, Döhmer y colaboradores (2014) identificaron otro efector codificado en el locus Bab1\_1492 y denominado SepA (*Secreted Effector Protein A*), el cual participa en etapas tempranas de la infección. Sin embargo, tampoco es esencial para la virulencia en ratones.

### Regulación de la expresión de genes implicados en la virulencia

Generalmente, las bacterias están expuestas a condiciones ambientales cambiantes y para poder adaptarse deben alterar sus patrones de expresión génica. Los genes bacterianos están organizados como operones. Estos son un conjunto de genes que se encuentran bajo

el control de un mismo promotor, por lo que su transcripción puede ser apagada o encendida de manera simultánea para dar una respuesta rápida a los cambios ambientales (Ralston, 2008). Los procariotas emplean distintos mecanismos para regular la expresión de sus genes. A nivel transcripcional destacan, por ejemplo, los sistemas de transducción de señales de dos componentes (TCS) y el *quorum sensing* (QS), entre otros.

En general, los TCS comprenden una proteína integral de membrana con actividad histidina quinasa, que constituye el componente sensor, y una proteína citoplasmática separada conocida como componente regulador. La proteína sensora tiene dos dominios, uno extracelular que reconoce señales externas, y otro citoplasmático, que transduce la señal al interior celular. Cuando una señal es reconocida por el dominio extracelular del componente sensor, se produce un cambio conformacional en el mismo, lo que cual desencadena una autofosforilación del dominio citoplasmático en un residuo conservado de histidina. El sensor fosforilado interactúa con su proteína contraparte reguladora, estimulando la fosforilación de residuos de aspartato en su dominio receptor. Este, una vez fosforilado, puede unirse al ADN mediante su dominio efector regulando la transcripción de genes blanco (Dale y Park, 2004; López-Goñi et al., 2004). Se estima que en *Brucella* podrían existir alrededor de 15 TCS (Lavín et al., 2010).

El TCS BvrRS está constituido por BvrS y BvrR. La primera es una proteína sensora de 601 aminoácidos que está asociada a la membrana interna. Su extremo amino-terminal tiene dos dominios transmembrana y una región periplásmica, que son importantes para el reconocimiento de señales ambientales. Su extremo carboxilo terminal tiene un dominio citoplasmático de dimerización y autofosforilación, así como un dominio con actividad ATPasa. BvrS tiene secuencias altamente conservadas que son típicas de las proteínas sensoras de los TCS. La proteína BvrR, por su parte, contiene 237 aminoácidos y pertenece a la familia de reguladores génicos OmpR. Tiene un dominio regulador conservado en el extremo amino terminal y un dominio efector en el extremo carboxilo. En el dominio regulador hay presencia de residuos de aspartato y lisina altamente conservados que interactúan con grupos fosfato. El dominio efector tiene un motivo de unión a ADN (Sola-Landa et al., 1998; López-Goñi et al., 2002).

Sola-Landa y colaboradores (1998) realizaron una mutagénesis por transposición insertando el Tn5 en el genoma de *B. abortus* y posteriormente seleccionando mutantes sensibles a péptidos catiónicos que afectan la envoltura celular, como la polimixina B. Solo obtuvieron dos mutantes con estas características, uno para *bvrR* (*bvrR::Tn5*) y otro para *bvrS* (*bvrS::Tn5*). En ambos mutantes, el Tn5 interrumpió el marco de lectura de cada gen. Los dos mutantes han sido utilizados en estudios previos sobre el papel del TCS BvrR/BvrS en la virulencia de *B. abortus*, determinándose que ambos, en comparación con la cepa silvestre, aparte de ser sensibles a péptidos bactericidas, tienen mayor permeabilidad a surfactantes, invasión celular reducida, tráfico intracelular deficiente y ausencia de virulencia en ratones (Guzmán-Verri et al., 2002; Sola-Landa et al., 1998). Los mutantes *bvrR::Tn5* y *bvrS::Tn5* no presentan la proteína Omp25 (Guzmán-Verri et al., 2002) y expresan bajos niveles de las proteínas VirB1, VirB5, VirB8 y VirB9 (Martínez-Núñez et al., 2010). Un estudio de proteómica por espectrometría de masas con fragmentos de membrana externa liberados espontáneamente y recuperados a partir de sobrenadantes de cultivos bacterianos en fase de crecimiento exponencial, señaló que los mutantes por transposición expresan 167 proteínas de forma diferencial en comparación con la cepa silvestre y con la cepa *bvrR::Tn5* complementada con un plásmido que expresa BvrR. 25 de las proteínas diferencialmente expresadas corresponden a OMP. La expresión de aproximadamente la mitad de las OMP disminuyó, mientras que la otra mitad aumentó. Entre las OMP disminuidas se encuentran cinco proteínas de la familia Omp3 (que incluye Omp25), mientras que la expresión de cinco lipoproteínas se incrementó. También hubo una expresión diferencial de 60 proteínas periplásmicas, de las cuales el 80% aumentó su expresión en al menos uno de los dos mutantes por transposición. Las proteínas periplásmicas son importantes

para la captura y transporte de nutrientes, por lo que se cree que el incremento en las mismas está relacionado con una respuesta de los mutantes ante un posible estrés nutricional debido a la falta de algunas OMP (Lamontagne et al., 2007). Por otra parte, un análisis de transcriptómica reveló que el mutante *bvrR::Tn5* presenta, en comparación con la cepa silvestre, una expresión diferencial en 127 genes, entre ellos genes para OMP, lipoproteínas, biosíntesis de LPS y ácidos grasos, respuesta a estrés, flagelos, sistemas de transporte, metabolismo del carbono y desnitrificación, así como otros reguladores transcripcionales (Viadas et al., 2010). Estos datos, junto con los de proteómica, sugieren que el TCS BvrR/BvrS es un regulador global muy importante para la transición entre la vida extra e intracelular.

Cabe mencionar que el TCS BvrR/BvrS está altamente conservado en el género *Brucella* y en otras alfaproteobacterias filogenéticamente relacionadas. BvrR tiene 76-86% de similitud con BatR de *Bartonella bacilliformis* y con ChvI presente en *Mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti* y *Agrobacterium tumefaciens*. BvrS, por su parte, tiene 59-68% de similitud con BatS de *B. bacilliformis*, ChvG de *A. tumefaciens* y ExoS de *M. loti* y *S. meliloti* (Cheng & Walker, 1998). En la bacteria fitopatógena *A. tumefaciens*, el TCS ChvI/ChvG es esencial para la virulencia. Los mutantes en este sistema no inducen la formación de tumores en el tejido vegetal, son sensibles a detergentes, antibióticos y pH ácido y presentan alteraciones en la permeabilidad de su envoltura externa (Charles y Nester, 1993; Mantis y Winans, 1993). En el endosimbionte de plantas *S. meliloti*, el TCS ChvI/ExoS está implicado en el control de la interacción entre la bacteria y la célula hospedera, la producción de succinoglicano, la movilidad flagelar, la formación de biofilms, la utilización de nutrientes y la simbiosis (Chen et al., 2008).

El TCS *bvrR/bvRS* afecta positivamente la transcripción de un regulador génico de tipo QS similar a LuxR denominado VjbR (*Vacuolar Jacking Brucella Regulator*) (Martínez-Núñez et al., 2010). El QS es un mecanismo de comunicación celular para sincronizar la expresión génica en una población bacteriana. Consiste en la liberación al medio externo de pequeñas moléculas autoinductoras. Conforme aumenta la densidad poblacional, se incrementa la concentración extracelular del autoinductor hasta alcanzar un umbral determinado. En este punto la molécula señal es reconocida por receptores y, como consecuencia, se activan o reprimen factores de transcripción citoplasmáticos que regulan la expresión génica de forma coordinada en la población bacteriana (Bassler, 1999).

Los mutantes en *vjbR* presentan un fenotipo atenuado en cultivos celulares (macrófagos y células HeLa) y en ratones infectados experimentalmente (Delrue et al., 2005). Además, presentan cambios en la superficie celular (Uzureau et al., 2007). En *B. melitensis*, VjbR regula la expresión de algunas OMP implicadas en la virulencia (Uzureau et al., 2010; de Jong et al., 2008). En *B. abortus*, VjbR activa directamente la transcripción del T4SS VirB mediante unión al promotor del operón *virB* y a la región intergénica entre *virB1* y *virB2*. También activa la transcripción de *vceA* y *vceB* que codifican para dos efectores del T4SS VirB (de Jong et al., 2008). Por último, está implicado en la regulación de genes flagelares (Léonard et al., 2007).

Además de VjbR, en *Brucella* se ha reportado otro regulador de QS, denominado BlxR (*Brucella LuxR-like Regulator*) (BlxR también es conocido como BabR) (Rambow-Larsen et al., 2008). VjbR activa la transcripción de *blxR* y, por el contrario, BlxR reprime la expresión de *vjbR*. Además existen 27 genes blanco regulados por ambos mecanismos de QS. Para el 55% de ellos, los dos reguladores actúan de forma opuesta. Según la etapa de la infección, pareciera existir una interregulación entre VjbR y BlxR (Rambow-Larsen et al., 2008; Uzureau et al., 2010). Se cree que VjbR actúa al inicio de la infección, posibilitando la adaptación temprana a las condiciones de estrés que predominan en la BCV, disminuyendo el metabolismo básico (para evitar la replicación bacteriana mientras la vacuola madura) y promoviendo el ensamblaje del T4SS, que es importante para alcanzar el nicho replicativo. BlxR, por su parte, actúa en etapas posteriores de la infección para reactivar el metabolismo y permitir la replicación (Uzureau et

al., 2010). Lo anterior sugiere que, aunque la función de ambos reguladores no es redundante, los dos participan en una vía en común que regula la expresión de procesos importantes para la vida intracelular de la bacteria (Rambow-Larsen et al., 2008).

En la regulación del operón *virB* también participan otros factores de transcripción como IHF (*Integration Host Factor*), HutC (*Histidine UTILization pathway*) y MdrA (*MarR-like sodium deoxicholate-responsive activator*). Los dos primeros se unen al promotor del operón *virB*, aumentando la expresión del mismo (Arocena et al., 2010; Sieira et al., 2010). Sieira y colaboradores (2012) mencionan que IHF es una proteína asociada al nucleoide y HutC es un regulador de la familia GntR que relaciona la expresión del operón *virB* con el catabolismo de histidina. Por otro lado, MdrA es un regulador de la familia de factores de transcripción MarR, que regula genes de virulencia, genes implicados en el catabolismo de compuestos aromáticos y genes de respuesta a estrés (Wilkinson y Grove, 2006). MdrA se une a dos sitios diferentes en el promotor del operón *virB* y regula su expresión de acuerdo con la fase de crecimiento. La función de MdrA es redundante con respecto a la de HutC. Además, compite con IHF y HutC por la unión al promotor del operón *virB*. Como es común en la familia de reguladores MarR, la presencia de un ligando disocia al regulador de su sitio de unión. En el caso de MdrA, el ligando identificado es el deoxicolato de sodio, lo que indica que *in vivo* MdrA podría responder a señales ambientales (Sieira et al., 2012).

## Conclusión

Más que de factores discretos, la virulencia de *B. abortus* depende de complejas redes de regulación génica que afectan principalmente la envoltura celular, así como el metabolismo. Algunos mecanismos de regulación génica de la virulencia son redundantes, mientras que otros son complementarios ya que actúan en diferentes etapas de la infección. El TCS BvrR/BvrS actúa como un regulador global que afecta la expresión de una gran variedad de genes y factores de transcripción importantes para la transición entre la vida extra e intracelular. Lo mismo pareciera ocurrir en otras alfaproteobacterias que poseen sistemas ortólogos al TCS BvrR/BvrS como *A. tumefaciens* y *S. meliloti*. Por este motivo, el estudio detallado del TCS BvrR/BvrS podría considerarse como un modelo para comprender mejor los fenómenos de parasitismo y endosimbiosis de las alfaproteobacterias. En el ITCR se continúa investigando sobre este tema, en conjunto con el Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales (PIET) la Escuela de Medicina de la Universidad Nacional y el Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET) de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica. Se espera que en un futuro el conocimiento generado pueda contribuir a contar con mejores herramientas terapéuticas y preventivas.

## Bibliografía

- Anderson, T. D., Meador, V. P. & Cheville, N. F. (1986a). Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*: I. Gross and histologic lesions. *Vet Pathol*, 23, 219-226.
- Anderson, T. D., Cheville, N. F. & Meador, V. P. (1986b). Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*: II. Ultrastructural studies. *Vet Pathol*, 23, 227-239.
- Akova, M., Uzun, O., Akalin, H. E., Hayran, M., Unal, S. & Gur, D. (1993). Quinolones in the treatment of human brucellosis; comparative trial of ofloxacin-rifampin versus doxycyclinerifampin. *J Antimicrob Chemother*, 37, 1831-1834.
- Ariza, J., Gudíol, F., Pallarés, R., Rufi, G. & Fernández-Viladrich, P. (1985). Comparative trial of rifampicin-doxycycline versus tetracycline-streptomycin in the therapy of human brucellosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 28, 548-551.

- Arocena, G. M., Sieira, R., Comerci, D. J. & Ugalde, R. A. (2010). Identification of the quorum-sensing target DNA sequence and N-acyl homoserine lactone responsiveness of the *Brucella abortus virB promoter*. *J Bacteriol*, 192(13), 3434-3440.
- Backert, S. & Meyer, T. F. (2006). Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, 9, 207-217.
- Banai, M. & Corbel, M. (2010). Taxonomy of *Brucella*. *The Open Vet Sci J*, 2010, 4, 85-101.
- Bang, B. (1906). Infectious abortion in cattle. *J Comp Pathol*, 19, 191-202.
- Barquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., Weiss, D. S., Guzmán-Verri, C., Chacón-Díaz, 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), 631-644.
- Bassler, B. L. (1999). How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol*, 2(6), 582-587.
- Bruce, D. (1887). Note on the discovery of a micro-organism in Malta fever. *Practitioner*, 39, 161.
- Buddle, M. B. (1956). Studies on *Brucella ovis* (n.sp.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. *J. Hyg. (Lond)*, 54(3), 351-364.
- Carmichael, L. E. & Bruner, D. W. (1968). Characteristics of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. *Cornell Vet*, 58, 579-592.
- 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.
- Charles, T. C. & Nester, E. W. (1993). A chromosomally encoded two-component sensory transduction system is required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 175(20), 6614-6625.
- Chen, E. J., Sabio, E. A. & Long S. R. (2008). The periplasmic regulator ExoR inhibits ExoS/ChvI two-component signaling in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Microbiol*, 69(5), 1290-303.
- Cheng, H. P. & Walker, G. C. (1998). Succinoglycan production by *Rhizobium meliloti* is regulated through the ExoS-ChvI two-component regulatory system. *J Bacteriol*, 180(1), 20-26.
- Cloekaert, A., Vizcaino, N., Paquet, J., Bowden, R. A. & Elzer, P. H. (2002). Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past present and future. *Vet Microbiol*, 90, 229-247.
- Corbel, M. J. & Brinley-Morgan, W. J. (1984). Genus *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173 AL. (pp. 377-388). En J. G. Holt (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. Baltimore: MD Williams and Wilkins.
- Corbel, M. J. (2006). *Brucellosis in humans and animals*. Genève: WHO Press.
- Dale, J. W. & Park, S. F. (2004). *Molecular genetics of bacteria*. (p. 92). West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd.
- De, B. K., Stauffer L., Koylass M. S., Sharp, S. E., Gee, J. E., Helsel, L. O., Steigerwalt, A. G., Vega, R., Clark, T. A., Daneshvar, M. I., Wilkins, P. P. & Whatmore, A. M. (2008). Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. *J Clin Microbiol*, 46(1), 43-49.
- de Barsy, M., Jamet, A., Filipon, D., Nicolas, C., Laloux, G., Rual, J. F, Muller, A., Twizere, J. C., Nkengfac, B., Vandenhoute, 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. *Cell Microbiol* 13, 1044-58.
- de Jong, M. F., Sun, Y. H., den Hartingh, A. B., Maarten van Dijl, J. & Tsolis, R. N. (2008). Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the *Brucella* Type IV secretion system. *Mol Microbiol*, 70(6), 1378-1396.
- 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.
- Delrue, R. M., Deschamps, C., Léonard, S., Nijskens, C., Danese I., Shaus, J. M, Bonnot, S., Ferooz, J., Tibor A., De Bolle, X. & Letesson, J. J. (2005). A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. *Cell Microbiol*, 7(8), 1151-1161.
- Ewalt, D. R., Payeur, J. B., Martin, B. M., Cummins, D. R. & Miller, G. M. (1994). Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Vet Diagn Invest*, 6, 448-452.

- FAO & WHO. (1986). *Expert Committee on Brucellosis*. (6<sup>th</sup> Report, Series No. 740). Genève: World Health Organization.
- Ficht, T. (2010). *Brucella* taxonomy and evolution. *Future Microbiol*, 5(6), 859-866.
- Foster, G., Osterman, B., Godfroid, J., Jacques, I. & Cloeckeaert, A. (2007). *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57, 2688-2693.
- Godfroid, J., Cloeckeaert, 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.
- Godfroid, J., Scholz, H. C., Barbier, T., Nicolas, C., Wattiau, P., Fretin, D., Whatmore, A. M., Cloeckeaert, A., Blasco, J. M., Moriyon, I., Saegerman, C., Muma, J. B., Al Dahouk, S., Neubauer, H. & Letesson, J. J. (2011). Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. *Prev Vet Med*, 102(2), 118-31.
- Guzmán-Verri, C., Chaves-Olarte, E., Thelestam, M., Arvidson, S., Gorvel, J. P. & Moreno, E. (2001). GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in non-professional phagocytes: direct activation of CDC42. *J Biol Chem*, 276, 44435-44443.
- Guzmán-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, L., Parra, A., Cloeckeaert, A., Garin, J., Gorvel, J-P, Moriyón, I. & López-Goñi, I. (2002). The two-component system BvrR\_BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae. *Proc Natl Acad Sci*, 99(19), 12375-12380.
- Huddleson, F. & Hallman, E. T. (1929). The pathogenicity of the species of the genus *Brucella* for monkeys. *J Infect Dis*, 45, 293-303.
- Janeway, C. A. Jr. & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20, 197-216.
- Ko, J. & Splitter, G. A. (2003). Molecular Host-Pathogen Interaction in Brucellosis: Current Understanding and Future Approaches to Vaccine Development for Mice and Humans. *Clin Microbiol Rev*, 16(1), 65-78.
- Lamontagne, J., Butler, H., Chaves-Olarte, E., Hunter, J., Schirm, M., Paquet, C., Tian, M., Kearney, P., Hamaidi, L., Chelsky, D., Moriyón, I., Moreno, E. & Paramithiotis, E. (2007). Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*. *J Proteome Res*, 6, 1519-1529.
- Lapaque N., Takeuchi O., Corrales F., Akira S., Moriyón I., Howard, J. C. & Gorvel, J-P. (2006). Differential inductions of TNF-alpha and IGTP, IIGP by structurally diverse classic and non-classic lipopolysaccharides. *Cell Microbiol*, 8, 401-413.
- Léonard, S., Ferooz, J., Haine, V., Danese, I., Fretin, D., Tibor, A., de Walque, S., De Bolle, X. & Letesson, J. J. (2007). FtcR is a new master regulator of the flagellar system of *Brucella melitensis* 16M with homologs in Rhizobiaceae. *J Bacteriol*, 189, 131-141.
- Lavín, J. L., Binnewies, T. T., Pisabarro, A. G., Ussery, D. W., García-Lobo, J. M. & Oguiza, J. A. (2010). Differences in two-component signal transduction proteins among the genus *Brucella*: implications for host preference and pathogenesis. *Vet Microbiol*, 144, 478-483.
- López-Goñi, I., Guzmán-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, A., Moriyón, I. & Moreno, E. (2002). Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS. *Vet Microbiol*, 90, 329-339.
- López-Goñi, I., Manterola, L. & Pan, S.Q. (2004). The *Brucella* BvrR/BvrS and related two component regulatory systems of the  $\alpha$ -2 Proteobacteria: common regulatory strategies of animal and plant pathogens and endosymbionts. (pp. 287-312). En I. López-Goñi & I. Moriyón (Eds.), *Brucella Molecular and Cellular Biology*. Wyomondham: Horizon Bioscience.
- López-Goñi, I. (2012). The two-component system BvrR/BvS: a master regulator of *Brucella* virulence. (pp. 201-209). En I. López-Goñi & O'Callaghan, D. (Eds.), *Brucella molecular microbiology and genomics*. Norfolk: Caister Academic Press.
- Mantis, N. J. & Winans, S. C. (1993). The chromosomal response regulatory gene *chvI* of *Agrobacterium tumefaciens* complements an *Escherichia coli* *phoB* mutation and is required for virulence. *J Bacteriology*, 175(20), 6626-6636.
- Marchesini, M. I., Herrmann, C. K., Salcedo, S. P., Gorvel, J. P. & Comerci, D. J. (2011). In search of *Brucella abortus* Type IV secretion substrates: screening and identification of four proteins translocated into host cells through VirB system. *Cell Microbiol*, 13(8), 1261-1274.

- Martínez-Núñez, C., Altamirano-Silva, P., Alvarado-Guillén, F., Moreno, E., Guzmán-Verri, C. & Chaves-Olarte, E. (2010). The Two-Component system BvrR/BvrS regulates the expression of the type IV secretion system VirB in *Brucella abortus*. *J Bacteriol*, 192(21), 5603-5608.
- Michaux- S., Paillisson J., Carles-Nurit M. J., Bourg, G., Allardet-Servent, A. & Ramuz, M. (1993). Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. *J Bacteriol*, 175(3), 701-705.
- Moreno E., Berman D. T. & Boettcher L. A. (1981). Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infect Immun*, 31,362-370.
- Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M. & Mayer, H. (1990). *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *J Bacteriol*, 172(7), 3569-3576.
- Moreno, E. (2002). Brucellosis in Central America. *Vet Microbiol*, 90, 31-38.
- Moreno, E. & Moriyón, I. (2002). *Brucella melitensis*: A nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proc Natl Acad Sci*, 99, 1-3.
- Moreno, E. & Gorvel, J. P. (2004). Invasion, intracellular trafficking and replication of *Brucella* organisms in professional and non-professional phagocytes. (pp. 287-312). En I. López-Goñi & I. Moriyón (Eds.), *Brucella Molecular and Cellular Biology*. Norfolk: Horizon Bioscience.
- Porte, F., Naroeni, A., Ouahrani-Bettache, S. & Liautard, J. P. (2003). Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect Immun*, 71(3), 1481-1490.
- Ralston, A. (2008). Operons and prokaryotic gene regulation. *Nature Education*, 1(1), 216.
- Rambow-Larsen, A. A., Rajashekara, G., Petersen, E. & Petersen, G. (2008). Putative Quorum-Sensing regulator BlxR of *Brucella melitensis* regulates virulence factors including the type IV secretion system and flagella. *J Bacteriol*, 190(9), 3274-3282.
- Rasool, O., Freer, E., Moreno, E. & Jarstrand, C. (1992). Effect of *Brucella abortus* lipopolysaccharides on the oxidative metabolism and enzyme release of neutrophils. *Infect Immun*, 60, 4-7.
- Roop, R. M. II, Gaines, J. M., Anderson, E. S., Caswell, C. C. & Martin, D. W. (2009). Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med Microbiol Immunol*, 198, 221-238.
- Ross, H. M., Foster, G., Reid, R. J., Jahans, K. L. & MacMillan, A. P. (1994). *Brucella* species infection in sea-mammals. *Vet Rec*, 134, 359.
- Scholz, H. C., Hubalek, Z., Sedlacek, I., Vergnaud, G., Tomaso, H. Dahouk, S. A., Melzer, F., Kampfer, P., Neubauer, H., Cloeckaert, A., Maquart, M., Zygmunt, S., Whatmore, A. M., Falsen, E., Bahn, P., Gollner, C., Pfeffer, M., Huber, B., Bussel, H. J. & Nockler, K. (2008). *Brucella microti* sp nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58, 375-382.
- Sieira, R., Comerci, D. J., Pietrasanta, L. I. & Ugalde, R. A. (2004). Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the *Brucella abortus* virB operon. *Mol Microbiol*, 54(3), 808-822.
- Sieira, R., Arocena, G. M., Bukata, L., Comerci, D. J. & Ugalde, R. A. (2010). Metabolic control of virulence genes in *Brucella abortus*: HutC coordinates virB expression and the histidine utilization pathway by direct binding to both promoters. *J Bacteriol*, 192(1), 217-224.
- Sieira, R., Arocena, G. M., Zorreguieta, A., Comerci, D. J. & Ugalde, R. A. (2012). A MarR-type regulator directly activates transcription 2 from the *Brucella abortus* virB promoter by sharing a redundant role with HutC. *J Bacteriol*, 194, 6431-6440.
- Sola-Landa, A., Pizarro-Cerdá, J., Grilló, M.-J., Moreno, E., Moriyón, I., Blasco, J.-M., Gorvel, J.-P. & López-Goñi, I. (1998). A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol Microbiol*, 29(1), 125-138.
- Songer, J. G. & Post, K. W. (2005). *Veterinary microbiology: bacterial and fungal agents of animal disease*. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Starr, T., Child, R., Wehrly, T. D., Hansen, B., Hwang, S., López-Otin, C. Virgin, H.W. & Celli, J. (2012). Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the *Brucella* intracellular cycle. *Cell Host Microbe*, 11(1), 33-45.
- Stoenner, H. G. & Lackman, D. B. (1957). A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida* Thomas. *Am J Vet Res*, 18, 947-951.

- Tiller, R. V., Gee, J. E., Lonsway, D. R., Gribble, S., Bell, S. C., Jennison, A. V., Bates, J., Coulter, C. Hoffmaster, A. R. & De, B. K. (2010). Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia. *BMC Microbiol*, 10, 23.
- Uzureau, S., Godefroid, M., Deschamps, C., Lemaire, J., De Bolle, X. & Letesson, J. J. (2007). Mutations of the quorum sensing-dependent regulator VjbR lead to drastic surface modifications in *Brucella melitensis*. *J Bacteriol*, 189(16), 6035-6047.
- Uzureau, S., Lemaire, J., Delaive, E., Dieu, M., Gaigneaux, A., Raes, M., De Bolle, X. & Letesson, J. J. (2010). Global analysis of quorum sensing targets in the intracellular pathogen *Brucella melitensis* 16 M. *J Proteome Res*, 9, 3200-3217.
- Viadas, C., Rodríguez, C., Sangari, F., Gorvel, J. P., García, J. & López, I. (2010). Transcriptome analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS two-component regulatory system. *PLOS ONE*, 5(4), 1-8.
- Wilkinson, S. P. & Grove, A. (2006). Ligand-responsive transcriptional 772 regulation by members of the MarR family of winged helix proteins. *Curr Issues Mol Biol*, 8, 51-62.