

Producción de RNI en cultivo de células mononucleares de cabras vacunadas con Rev-1 de *Brucilla* (RNI production in culture of mononuclear cells of goats vaccinated with *Brucella* Rev-1)

Ortega-Sánchez, José L.(1), Martínez-Romero, Aurora(1), Hernández-Salgado, José R.(1), Rodríguez-Martínez, Rafael(2), Vásquez-Arroyo, Jesús(2,3), Robles-Trillo, Pedro A.(2,3)

1) Departamento de Sanidad Animal. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Universidad Autónoma Chapingo. AP No. 8 Bermejillo, Durango. México. Correo electrónico: jlortega@chapingo.uruza.edu.mx

2) Departamento de Postgrado e Investigación. Facultad de Ciencias Químicas, Unidad Gómez Palacio. Universidad Juárez del Estado de Durango. AP No. 51 Gómez Palacio, Durango. México. Correo electrónico: quimicaaurora@hotmail.com;

3) Departamento de Ciencias Médico Veterinarias. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Unidad Laguna. Torreón, Coahuila. México.

REDVET: 2008, Vol. IX, N° 8

Recibido: 18.02.08 / Referencia provisional: H031_RED VET / Revisado: 07.07.08 / Referencia definitiva: 080805_RED VET / Aceptado: 24.07.08 / Publicado: 01.08.08

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080808.html> concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080808/080805.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®. Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con REDVET® - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

Resumen

La brucelosis es una zoonosis antigua que permanece endémica en la mayoría de las ciudades del mundo. La acidificación de los nitritos (NO₂⁻) permite la producción no enzimática de óxido nítrico. El objetivo de este estudio fue determinar la respuesta inmunológica celular mediante la producción de intermediarios reactivos de nitrógeno por las células mononucleares en cabras vacunadas con la cepa mutante de *Brucella melitensis* Rev-1. Se seleccionaron 10 cabras raza *sannen*, de 3-4 meses de edad. Se realizaron cinco muestreos, previo a la inoculación (cero días),

3, 7, 14 y 21 días después de aplicar los tratamientos. Se obtuvieron las células mononucleares por el método Ficoll-histopaque. Los NO_2^- y nitratos (NO_3^-) fueron cuantificados por ELISA. La concentración de NO_3^- fluctuó entre 29.96 y 39.31 $\mu\text{M/l}$. Los NO_2^- se encontraron entre 32.49 y 92.85 $\mu\text{M/l}$. Se obtuvo mayor respuesta entre el período de 14 a 21 días, observándose un efecto significativo entre el periodo de estudio, tratamientos e interacción entre ambos. Podemos concluir que la vacuna rev-1 de *B. melitensis* estimula la producción de nitritos bajo condiciones de cultivo celular.

Palabras clave: zoonosis, brucelosis, cultivo celular, nitritos, ELISA

Abstract

Brucellosis is an ancient zoonosis that remains endemic in the majority of the cities of the world. Nitrite (NO_2^-) acidification leads to nonenzymatic nitric oxide production. The aim was to determine the immunological cellular response by means of the production of reactive nitrogen intermediates (RNI) for the mononuclear cells in goats vaccinated with the *Brucella melitensis* Rev-1 vaccine. Ten goats were selected *sannen* race, of 3-4 months of age. Five samplings were realized, previously the inoculation (zero days), 3, 7, 14 and 21 days after the applying the treatments. The mononuclear cells by the Ficoll-histopaque method were obtained. The NO_2^- and nitrates (NO_3^-) were quantified by ELISA. The NO_3^- fluctuated between 32.49 and 92.85 $\mu\text{M/l}$. Bigger response was obtained between the period from 14 to 21 days, observing a significant effect between the period of study, treatments and interaction between both. We can conclude that the *B. melitensis* Rev-1 vaccine stimulates the production of nitrites under cell culture conditions.

Key words: zoonosis, brucellosis, cell culture, nitrites, ELISA

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa considerada como la zoonosis más difundida del mundo y que puede causar una enfermedad seria en humanos. Conocida también con el nombre de fiebre ondulante, fiebre del Mediterráneo, fiebre de Malta (Roux y col., 2006, Godfroid y col., 2005) y enfermedad de Bang (Taminiau y col., 2002, Malavolta, 2002, Abbas, 2002, Kreeger, 2002). El agente causal de la brucelosis son las bacterias del género *Brucella* y puede afectar prácticamente a todos los animales domésticos, de vida silvestre y al hombre (Carle y col., 2006,

Halling y Jensen, 2006). La incidencia y prevalencia de la brucelosis varía entre países; la brucelosis bovina es aún, una enfermedad muy extendida en algunos países de África, Asia, América y Europa (fundamentalmente Rusia), mientras que la infección con *B. melitensis* esta emergiendo como un serio problema en la salud pública de países en desarrollo. Las seis especies reconocidas dentro del género *Brucella* son: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* y *B. neotomae*; esta clasificación está basada en la diferencia en cuanto a patogenicidad y en el hospedero de su preferencia, bovinos, caprinos, porcinos, ovinos, caninos y roedores, respectivamente (Gomes y col., 2006, Ratushna y col., 2006, Whatmore y col., 2006). El Subcomité en Taxonomía de *Brucella* aceptó esta clasificación en 1986 (Ratushna y col., 2006). Recientemente, se ha aislado otra especie de *Brucella* de mamíferos marinos (lobos marinos, ballenas y delfines) y se ha denominado *B. maris* (Bhattacharjee y col., 2002). Dos nuevas especies han sido propuestas para ser adicionadas a este género, *B. cetaceae* y *B. pinnipediae* aisladas de mamíferos marinos, cetáceos y pinipedios, respectivamente (Godfroid y col., 2005, Xiang y col., 2006). También la *B. cetaceae* se ha aislado de focas (Vemulapalli y col., 2006). sobre las bases de estudios de hibridación DNA-DNA, las especies diferentes tienen más del 90% de homología (Jacques y col., 2007). De acuerdo a la naturaleza de la molécula de lipopolisacárido (LPS) las especies de *Brucella* se clasifican como rugosas (R) y lisas (S) (Cassataro y col., 2002). La *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis* son las cepas S más patógenas para los humanos (Jimenez de Bagues y col., 2005), y para animales domésticos (Zylberman y col., 2006). La infección es adquirida por el consumo de leche no pasteurizada y sus derivados, como quesos (Delpino y col., 2007) o por el contacto con material infeccioso (Whatmore y col., 2006), también a través del consumo de carne cruda o de cocimiento medio (Delpino y col., 2007). Estas bacterias intracelulares tienen la capacidad de multiplicarse dentro de los fagocitos profesionales y no profesionales (Al-Mariri y col., 2002). Actualmente, no existe una vacuna que proteja contra la brucelosis humana (Rajashkara y col., 2006) y el tratamiento de brucelosis requiere una combinación de terapia con antibióticos y mantiene la problemática por las recaídas potenciales. Inmediatamente, después de la penetración, las bacterias son transportadas libres o en el interior de las células fagocíticas hasta los ganglios linfáticos más próximos al lugar de entrada. Si las bacterias no son destruidas pueden vivir por largos períodos de tiempo en el interior de células fagocíticas, los ganglios linfáticos responden a la agresión mediante una hiperplasia reticuloendotelial y linfática, que puede durar varias semanas en producirse y persistir durante meses. En los fagosomas de los macrófagos la *Brucella* sobrevive y se multiplica, inhibiendo la fusión del fagosoma y el lisosoma que contiene la bacteria mediante la acidificación rápida del medio (Celli y col., 2003). Recientemente, se encontró que la mayoría de los miembros del género *Brucella* muestran fuerte actividad con la enzima ureasa, ésta protege a este género durante su paso a través del

estómago, cuando la bacteria es adquirida por vía oral, la cual es la principal ruta de infección en brucelosis humana (Sangari y col., 2007), las cepas de *Brucella* que producen ureasa fueron más resistentes *in vitro* a las fuertes condiciones ácidas. En su fase inicial, la enfermedad se caracteriza por originar una infección aguda, pero si no es tratada adecuadamente, puede llegar a ser una infección crónica y persistir durante la vida del hospedero (Spera y col., 2006). Una vez que la bacteria ingresa al organismo causa primero una invasión sistémica y posteriormente pasa a órganos relacionados con el sistema retículo endotelial tales como hígado, bazo y nódulos linfáticos, órganos reproductores y glándula mamaria (Jimenez de Bagues y col., 2007). La invasión del tejido trofoblástico del útero grávido y la rápida multiplicación de la bacteria terminan produciendo los síntomas característicos de aborto e infertilidad. En humanos, *B. melitensis* tiene un amplio espectro de manifestaciones clínicas y puede afectar una variedad de órganos y sistemas, con complicaciones en sistema nervioso central y cardiovasculares, causando gran morbilidad y requiere tratamiento médico prolongado (Falagas y Bliziotis, 2006). Inclusive, se ha determinado que el LPS confiere resistencia al ataque anti-microbiano y regula la respuesta inmune del huésped (Lapaque y col., 2005), estas propiedades hacen del LPS un factor importante de virulencia para la sobrevivencia y replicación de *Brucella* en el hospedero. La vacuna Rev-1 tiene su origen a partir de una cepa mutante de *B. melitensis* estreptomycin-dependiente procedente a la vez de la cepa virulenta 6056. Los orígenes de esta cepa se remontan al año 1953, en la Universidad de Berkely California, EUA. La cepa Rev-1 es una cepa viva atenuada por lo que su aplicación en caprinos supone siempre su penetración y multiplicación en los animales vacunados es decir se trata de una verdadera infección provocada. La vacuna Rev-1 se utiliza para ovejas y cabras (Adone y Ciuchini, 2001).

Desde tiempos remotos, la reducción de NO_3^- ha sido analizada por varios investigadores para distinguir entre las especies del género *Brucella*, la identificación de estas especies ha sido problemática por su similitud en pruebas bioquímicas y serológicas. *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis* reducen los NO_3^- y NO_2^- , de donde se observó diferencia significativa entre las especies. La acumulación de NO_2^- fue en el orden: *B. abortus* > *B. suis* ≥ *B. melitensis* (Pickett y Nelson, 1953). Los análisis para completar la secuencia de *B. melitensis* sugirieron la presencia de un sistema anaeróbico de transferencia de electrones y las enzimas que permiten la reducción de NO_3^- dentro del gas dinitrógeno (NO_3^- , NO_2^- , NO y óxido nítrico reductasa), esas reacciones son colectivamente llamadas reacciones de denitrificación y permite a la *Brucella* crecer bajo las condiciones con poco oxígeno por la respiración de NO_3^- (Haine y col., 2006). Gracias al conocimiento de la secuencia completa del genoma de *Brucella*, se ha revelado que posee todos los genes que son necesarios para completar la ruta de denitrificación, resultando en la reducción de NO_3^- a nitrógeno. Los

genes codifican cuatro reductasas *Nar* (Nitrato reductasa), *Nir* (Nitrito reductasa), *Nor* (óxido nítrico reductasa) y *Nos* (óxido nitroso reductasa), constituye la denitrificación en *B. suis*, la cual tiene numerosas similitudes con *Sinorhizobium meliloti*; ambos microorganismos pertenecen a la subclase- α de la proteobacteria (Loisel-Meyer y col., 2006). La denitrificación es la reducción de NO_3^- o NO_2^- , a gases nitrogenados y pueden permitir la emisión de óxido nitroso (N_2O) del suelo. Durante la denitrificación, el nitrato es reducido a nitrógeno vía intermediarios de NO_2^- , NO y N_2O y los NO_2^- son un producto de oxidación del NO . Las oxidoreductasas que secuencialmente reducen NO_3^- a nitrógeno son llamados *Nar*, *Nir*, *Nor* y *Nos* (Horn y col., 2006). El objetivo de este estudio fue determinar la respuesta inmunológica celular mediante la producción de intermediarios reactivos de nitrógeno por las células mononucleares en cabras vacunadas con la cepa mutante de *Brucella melitensis* Rev-1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio, selección y muestreo de animales

El área de trabajo está localizada entre $103^\circ 03' 13''$ y $103^\circ 44' 54''$ Longitud Oeste, $25^\circ 24' 58''$ y $25^\circ 56' 06''$ Latitud Norte pertenecientes a la Comarca Lagunera a una altitud que oscila entre los 1150 y 1300 msnm. Se llevó a cabo en los laboratorios de la Facultad de Medicina, en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango así como en los laboratorios de la Unidad Regional Universitaria de Zonas áridas de la Universidad Autónoma Chapingo y en el establo caprino del ejido Banco Nacional del Municipio de Tlahualilo, Durango.

Se seleccionaron 10 cabras de raza *sannen*, clínicamente sanos y libres de tuberculosis y brucelosis (NOM-014-ZOO-1995). Adicionalmente, con el propósito de eliminar las parasitosis ocasionadas por parásitos helmintos gastrointestinales, pulmonares, así como miasis, pediculosis, sarna y garrapatas, se suministro a cada animal una dosis única de 1 ml/50kg por vía IM de una solución inyectable del antiparasitario DECTOMAX® (doramectina) Laboratorios PFIZER LTDA. S.A.G.A.R. Q-0001-064. Se consideró el aspecto bioético según la Norma NOM-062-ZOO-1999, la cual discurre sobre las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales.

Los animales empleados en el estudio se mantuvieron en corrales aislados del resto del ganado. Previa desinfección de la región media de la canaladura yugular con alcohol etílico al 70 % se tomaron las muestras sanguíneas mediante venopunción de la vena yugular utilizando tubos vacutainer de 7 ml con anticoagulante EDTA.

Se realizaron cinco muestreos uno previo a la aplicación de los tratamientos (día cero) y, posteriormente, a los 3, 7, 14 y 21 d, después de la aplicación de los mismos. El grupo control constituido por cinco cabras fueron inoculadas por vía subcutánea en la región cervical con 1 ml de solución salina fisiológica.

Se inocularon cinco cabras por vía subcutánea en la región cervical con 1 ml. de vacuna *B. melitensis* Rev-1 (NOM-EM-O11-ZOO-1-1994) de laboratorios Productora Nacional de biológicos Veterinarios (PRONABIVE) (Li y col., 2006). Se tomaron muestras en el momento previo a la inoculación (cero días), y posteriormente, a los 3, 7, 14 y 21 d, después de inocular a los animales y se evaluaron los RNI (NO_3^- y NO_2^-) en los sobrenadantes de cultivo ($\mu\text{moles/l}$).

Obtención de células mononucleares a partir de sangre total por el método Ficoll-Histopaque

La sangre periférica colectada fue procesada a temperatura ambiente y en un lapso de tiempo que nunca rebasó 3 h. Las muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 15 min acto seguido, se recolectó la capa flogística y se depositó en un tubo cónico de 15 ml y posteriormente resuspendidas en RPMI llevándolas a 6 ml (Luo y col., 2006), la suspensión se transfirió a otro tubo cónico con 3 ml de Ficoll-histopaque la transferencia se realizó por las paredes del tubo y de una manera lenta para evitar mezclarse con el Ficoll, nuevamente se centrifugo pero ahora a 1,500 rpm durante 15 min para lograr la formación de cuatro capas Ficoll, MN, Ficoll, y PMN con eritrocitos. Posteriormente, se recuperó el paquete de células MN mediante aspiración con una pipeta Pasteur y se lavó dos veces con PBS estéril llevándolo hasta 10 ml para retirar el Ficoll, la muestra se mantuvo en hielo para después centrifugar a 1500 rpm durante 5 min. Se eliminó el PBS por decantación y el botón celular se resuspendió con 1 ml (2 ml si es una SC grande) de medio de cultivo RPMI-1640 completo (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, inactivado por calor, se mezcló dentro del medio para no formar burbujas con la misma micropipeta (Gasbarre y col., 1985).

Viabilidad celular

Los botones celulares se resuspendieron en RPMI completo con SFB, 100 U/ml de penicilina/100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina, 2 mM de L-glutamina, 15 mM de hepes, aminoácidos esenciales y 50 μM de 2-mercaptoetanol (2-Me). La viabilidad de las células se determinó utilizando la prueba de exclusión del colorante azul de tripano. Se realizó en un hematocitómetro (cámara de Neubauer) de la siguiente manera: se prepararon 100 μl de suspensión (1:10): en un tubo eppendorf se agregaron 90 μl de PBS + 10

μl de suspensión celular, se mezcló y en otro tubo se tomaron de esta suspensión 10 μl + 80 μl de PBS + 10 μl de azul de tripano, se mezcló e inmediatamente se tomaron 10 μl y se agregaron a un hematocitómetro para determinar la viabilidad celular (Pasquali y col., 2001).

Transformación blastoide de linfocitos

Las células MN obtenidas, se ajustaron a 1.32×10^6 células por pozo en placas de poliestireno de 24 pozos (Corning) para cultivo celular y se les adicionó por triplicado RPMI-1640 suplementado con SFB al 10%. Se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂, por ser una transformación blastoide con antígenos específicos, la duración del cultivo fue de 48 h. Luego fue removido el sobrenadante de las células adheridas y éstas fueron resuspendidas por raspado en 300 μl de PBS frío/pozo, y la suspensión celular fue obtenida en tubos eppendorf Axygen® posteriormente, se podía efectuar la lectura de la placa en un lector de ELISA a una densidad óptica (DO) de 540 nm. Al no poder realizar la lectura a la brevedad posible, se prepararon para congelación.

Congelación y descongelación de células mononucleares

Cuando fue necesario se llevó a cabo la congelación de linfocitos la cual consistió en que una vez obtenidos los linfocitos de sangre periférica se suspendieron en 0.1 ml de RPMI 1640 y se colocaron en un criotubo, inmediatamente se adicionó 90% (90 μl) de SFB y 10% (10 μl) de dimetilsulfóxido (DMSO) (Pankuch y Appelbaum, 2006) y luego se congelaron a -70°C. Para descongelar las células, se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 min y luego se centrifugaron a 800 rpm durante 10 min a 10°C; después se descartó el sobrenadante y el paquete celular fue suspendido en RPMI 1640. El DMSO fue esterilizado por filtración a través de una membrana de celulosa de 0.2 μm y se hicieron alícuotas en pequeñas cantidades (2 ml) para su almacenamiento y uso posterior.

Detección y cuantificación de intermediarios reactivos de nitrógeno por ELISA

Las soluciones stock de nitrito de sodio y de nitrato de sodio (SIGMA®) en 100 mM de agua fueron almacenados a 4°C, la solución de nitrato reductasa (Boehringer Mannheim®, Lewes, United Kingdom) a 2.5 U/ml y una mezcla de NADPH (SIGMA®) a 1.67 mg/ml más FAD (Boehringer Mannheim®, Lewes, United Kingdom) a 0.05 mg/ml en agua fueron almacenados a -20°C. Antes de usarlo, un volumen de nitrato reductasa fue mezclado con tres volúmenes de NADPH-FAD (mezcla enzimática). El reactivo de Griess también fue preparado. El ensayo fue realizado en microplacas de fondo plano de 96 pozos. Las muestras (100 μl de

sobrenadante y se transfirieron a placas de 96 pozos) fueron divididas entre dos placas, adicionando 50 μl a cada una, uno para la medición de NO_2^- y otra para la medición de NO_3^- , cada uno conteniendo los estándares apropiados. Agua (20 μl por pozo) fue adicionado a la microplaca del NO_2^- y la mezcla enzimática (20 μl por pozo) fue adicionado a la microplaca del NO_3^- . Todas las microplacas fueron incubadas durante 30 min a temperatura ambiente. El reactivo de Griess (100 μl por pozo) fue adicionado y después de 5 min a temperatura ambiente se realizó en todas las microplacas la lectura de la OD a 620 nm (referencia) y 540 nm (prueba) se midió la absorbancia en un lector de ELISA (Organon Tecknika, Microwell system) (Luo y col., 2006). La cantidad de NO se midió como NO_2^- utilizando una curva patrón de NaNO_2 en solución PBS en un rango de concentraciones de 0 a 100 μM . Los ensayos se realizaron por duplicado obteniéndose la media de éstos.

Análisis estadístico

Con el objeto de obtener la diferenciación de efectos de la vacunación con respecto a los animales control (no vacunados), se aplicó la prueba de t con el procedimiento de estimación de efectos de máxima verosimilitud, considerando un diseño completamente al azar con mediciones repetidas en los períodos de muestreo. El procedimiento empleado fue el PRO MIXED (SAS, 1992) y el modelo estadístico aplicado fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + \zeta_i + C\zeta_{j(i)} + P_k + \zeta P_{ik} + \beta (x_{i.} - x_{..}) + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde:

Y_{ijkl} = medición sanguínea de cada cabra de nitritos en $\mu\text{M/l}$

μ = media general

ζ_i = efecto del i-ésimo nivel de tratamiento

$C\zeta_{j(i)}$ = efecto aleatorio de la j-ésimo nivel de cada unidad experimental dentro de cada tratamiento

P_k = efecto del k-ésimo nivel de período

ζP_{ik} = efecto de la interacción entre el tratamiento y el período

β = factor de ponderación lineal

$\beta (x_{i.} - x_{..})$ = ajuste lineal por la covariable peso al inicio del estudio

ε_{ijkl} = error experimental $e_{ijkl} \sim \text{NID}(0, \sigma_e^2)$

RESULTADOS

Los datos generales de la población en estudio son los siguientes: se incluyeron animales de ganado caprino, raza *sannen*, con un peso promedio de 27.604 Kg. El comportamiento de los diferentes tratamientos durante el período de los muestreos, aunque fue variable, se observó un

incremento de NO_2^- . En el control la concentración de NO_2^- fluctuó entre 32.64 y 41.52 $\mu\text{M/l}$ (Cuadro 4). En el tratamiento con la vacuna Rev-1, se observó un incremento en la respuesta entre el período de 14 a 21 días los NO_2^- elevaron de 36.23 a 92.85 $\mu\text{M/l}$ (Cuadro 1, Figura 1).

La concentración de los NO_3^- fluctuó entre 29.96 y 39.31 $\mu\text{M/l}$ (Cuadro 1). En la determinación de NO_3^- entre el control y el problema, el efecto del periodo y de la interacción tratamiento-periodo no fue significativo (Cuadro 2). Sin embargo, en cuanto al factor período y la interacción entre tratamiento-periodo el efecto fue muy significativo para la concentración de NO_2^- (0.0005*) (Cuadro 3). En el cuadro 4, se observa la concentración obtenida de NO_2^- en el control y en la aplicación de la vacuna Rev-1, durante el periodo de estudio.

Cuadro 1. Concentración obtenida en $\mu\text{M/l}$ de Nitratos (NO_3^-) y Nitritos (NO_2^-) durante el período de estudio del tratamiento Rev-1

Tiempo (días)	Nitratos ($\mu\text{M/l}$)	Nitritos ($\mu\text{M/l}$)
0	29.96581196	32.4957265
3	36.72142546	41.982906
7	33.82905982	40.9059829
14	38.41025642	36.2393162
21	39.31623932	92.8547009

Cuadro 2. Efecto de la variación de tratamientos en cuanto a la determinación de Nitratos (NO_3^-) en sobrenadantes de cultivo.

Efecto	Num DF	Den DF	F-valor	Pr > F
Tratamiento	2	11	14.29	0.0009*
Período	4	11	3.55	0.0429*
Tratamiento* período	8	11	4.75	0.01*
Peso inicial	1	11	2.26	0.1612 NS

Cuadro 3. Efecto de la variación entre los tratamientos control y la vacuna Rev-1, en cuanto a la determinación de Nitritos (NO_2^-) en sobrenadantes de cultivo.

Efecto	Num DF	Den DF	F-valor	Pr >	F
Tratamiento		1	7	.8.12	0.0247
Período	4	7	21.5	0.0005*	
Tratamiento* período	4	7	25.23	0.0003*	

Cuadro 4. Comportamiento de los dos tratamientos durante el periodo de estudio, en $\mu\text{M/l}$ de Nitritos (NO_2^-)

Tiempo (días)	Control ($\mu\text{M/l}$)	Rev-1 ($\mu\text{M/l}$)
0	35.0854701	32.4957265
3	41.5213675	41.982906
7	36.5811966	40.9059829
14	34.2735043	36.2393162
21	32.6495726	92.8547009

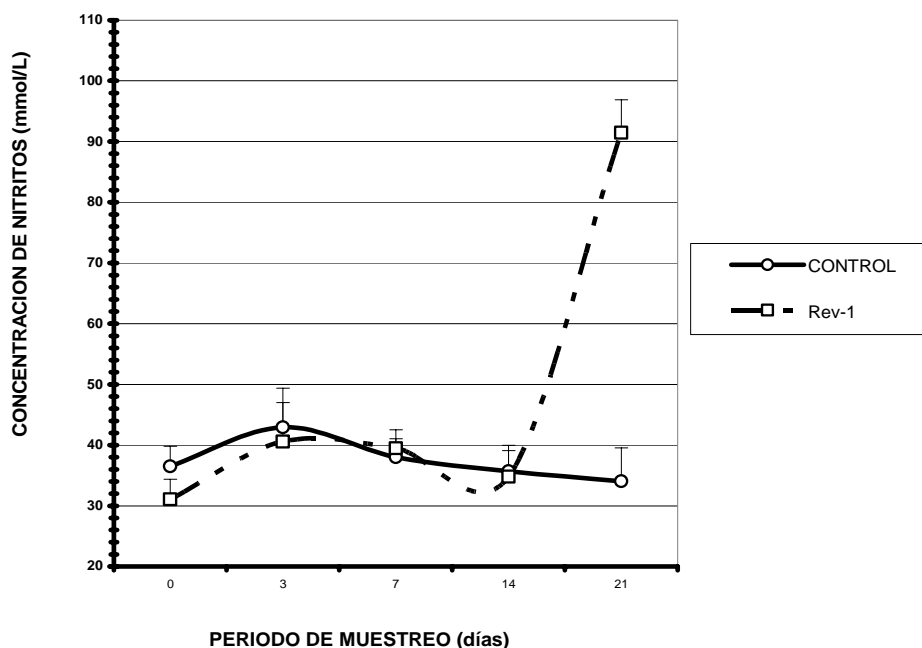


Figura 1. Comportamiento de los tratamientos durante el periodo de estudio, en $\mu\text{M/l}$ de Nitritos (NO_2^-).

Discusión

En la presente investigación se planteó la siguiente hipótesis, la vacuna Rev-1 favorece la respuesta inmune celular, en sobrenadantes de cultivo obtenidos de células mononucleares de cabras, *in vivo*. Se llevó a cabo la selección de animales, a los cuales se les realizó la prueba rosa de Bengala (RBT), para descartar posible presencia de brucelosis en las cabras e interfiriera en nuestros resultados. Para tal fin se utilizó el antígeno rosa de bengala 3%. Incluso, recientemente, se realizó un estudio en donde se determinó que la RBT con una concentración celular del 3% tiene una especificidad y sensibilidad relativa de 99.7% y 32.5%, respectivamente, y la RBT con una concentración celular del 8% mostró una especificidad y sensibilidad relativa de 92.8% y 68.8%, respectivamente (Ramirez-Pfeiffer y col., 2007). El NO es una molécula inestable encontrada en los sistemas biológicos y es rápidamente convertida en NO_2^- . El NO en los macrófagos actúa como un potente microbicida para destruir a los microorganismos ingeridos. Se obtuvo una constante elevación en lo que respecta a la exposición con la vacuna Rev-1, en donde la concentración de NO_2^- al transcurso del período del estudio llegó a los 21 d a una concentración de $92.85 \mu\text{mol/l}$. En adición, se ha determinado que la iNOS, cuyo producto enzimático, es el óxido nítrico, posee directa actividad antimicrobiana (Hofmann y Eckmann, 2006). Por lo tanto, se deduce que la producción de RNI en macrófagos es esencial para la defensa del hospedero, principalmente para ejercer acciones bactericidas. Además, los macrófagos activados pueden convertir la L-arginina a NO_2^- en presencia de la enzima iNOS, con el desarrollo de una actividad citotóxica contra células tumorales (Hibbs, 1991). Hay pocos trabajos donde reportan que macrófagos humanos sean capaces de expresar iNOS y presentar actividad enzimática. Una serie de experimentos con modelo de macrófagos de ratón con la infección de *B. suis* apoyan la posibilidad de que en ratón, el NO favorece la eliminación de *Brucella*, considerando que están presentes el $\text{IFN-}\gamma$ y los anticuerpos anti-*Brucella*, seguido de la expresión de la inmunidad adquirida (Gross y col., 1998). En otro estudio realizado en el estudio de la sobrevivencia de *Neisseria meningitidis*, se encontró que a pesar de los bajos niveles de NO que fueron liberados por macrófagos humanos, se encontró que la óxido nítrico reductasa de *Neisseria meningitidis* confiere resistencia intracelular al NO permitiendo su utilización, resultando la sobrevivencia óptima de esta bacteria en la mucosa nasofaríngea (Stevanin y col., 2005). La producción de NO por macrófagos infectados es el principal sistema de defensa en el control de la infección por brucelosis en ratones y posiblemente aunque más controversial en la infección en humanos, como es observado por el uso de macrófagos humanos transfectados con iNOS (Loisel-Meyer y col., 2006). La biosíntesis de NO_2^- esta directamente relacionada con el estado de activación del sistema inmune, observándose mayor respuesta en producción de NO con la vacuna Rev-1, esta producción se deriva de la elevada concentración de NO_2^-

obtenida en los sobrenadantes de cultivo. Sería interesante, en otro trabajo incrementar el número de muestra, con estudios más específicos de expresión y actividad de la enzima iNOS, que no existe en los macrófagos en reposo, pero puede inducirse en respuesta al LPS en combinación con IFN- γ , ya que la enzima iNOS cataliza la conversión de arginina a citrulina liberando NO. También se puede aplicar algún método más sensible y específico de la expresión y actividad de iNOS. Podemos concluir que la vacuna Rev-1 de *B. melitensis* estimula la producción de nitritos bajo condiciones de cultivo celular, por lo que es posible, evaluar la respuesta inmune celular mediante la producción de intermediarios reactivos de nitrógeno por células mononucleares en cabras vacunadas con la cepa mutante de *Brucella melitensis* Rev-1.

Agradecimientos: Especial agradecimiento al caprinocultor Guadalupe Maciel Sarmiento del ejido Banco Nacional del Municipio Tlahualilo, Durango, México. A María de Jesús Cedillo Gómez, directora de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango; Guillermina Chanes Tovar, jefa del Laboratorio de Análisis Clínicos de la Clínica Hospital ISSSTE; José de Jesús Alba Romero, jefe del laboratorio de análisis microbiológicos, en Gómez Palacio, Durango, México, por darnos la oportunidad de hacer uso de sus laboratorios durante el tiempo del estudio. Una mención especial a Jesús Jaime Duarte Sustaita por el apoyo técnico.

REFERENCIAS

1. Abbas, B., Agab, H. A review of camel brucellosis. *Prev Vet Med*, 2002, vol. 55, p. 47-56.
2. Adone, R., Ciuchini, F. *Brucella abortus* RB51 and hot saline extract from *Brucella ovis* as antigens in a complement fixation test used To detect sheep vaccinated with *Brucella abortus* RB51. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2001, vol. 8, n° 1, p. 119-122.
3. Al-Mariri, A., Tibor, A., Lestrade, P., Mertens, P., De Bolle, X., Letesson, J. J. *Yersinia enterocolitica* as a vehicle for a naked DNA vaccine encoding *Brucella abortus* bacterioferritin or P39 antigen. *Infect Immun*, 2002, vol. 70, n°4, p. 1915-1923.
4. Bhattacharjee, A. K., Van De Verg, L., Izadjoo, M. J., Yuan, L., Hadfield, T. L., Zollinger, W. D., Hoover, D. L. Protection of mice against brucellosis by intranasal immunization with *Brucella melitensis* lipopolysaccharide as a noncovalent complex with *Neisseria meningitidis* group B outer membrane protein. *Infect Immun*, 2002, vol. 70, n° 7, p. 3324-3329.
5. Carle, A., Hoppner, C., Ahmed Aly, K., Yuan, Q., Den Dulk-Ras, A., Vergunst, A., O'Callaghan, D., Baron, C. The *Brucella suis* type IV secretion system assembles in the cell envelope of the heterologous host *Agrobacterium tumefaciens* and increases IncQ plasmid pLS1 recipient competence. *Infect Immun*, 2006, vol. 74, n° 1, p. 108-117.

6. Cassataro, J., Delpino, M. V., Velikovskiy, C. A., Bruno, L., Fossati, C. A., Baldi, P. C. Diagnostic usefulness of antibodies against ribosome recycling factor from *Brucella melitensis* in human or canine brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002, vol. 9, nº 2, p. 366-369.
7. 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, vol. 198, nº 4, p. 545-556.
8. Delpino, M. V., Marchesini, M. I., Estein, S. M., Comerci, D. J., Cassataro, J., Fossati, C. A., Baldi, P. C. A bile salt hydrolase of *Brucella abortus* contributes to the establishment of a successful infection through the oral route in mice. *Infect Immun*, 2007, vol. 75, nº 1, p. 299-305.
9. Falagas, M. E., Bliziotis, I. A. Quinolones for treatment of human brucellosis: critical review of the evidence from microbiological and clinical studies. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, vol. 50, nº 1, p. 22-33.
10. Gasbarre, L. C., Romanowski, R. D., Douvres, F. W. Suppression of antigen- and mitogen-induced proliferation of bovine lymphocytes by excretory-secretory products of *Oesophagostomum radiatum*. *Infect Immun*, 1985, vol. 48, nº 2, p. 540-545.
11. Godfroid, J., Cloeckert, A., Lliutard, J. P., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., Garin-Bastuji, B., Letesson, J. J. 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*, 2005, vol. 36, nº 3, p. 313-326.
12. Gomes, C. P., Costa, M. G., Azevedo, V., Costa, O. S. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial Cell Factories*, 2006, vol. 5, nº 13, p. 1-11.
13. Gross, A., Spiesser, S., Terraza, A., Rouot, B., Caron, E., Dornand, J. Expression and bactericidal activity of nitric oxide synthase in *Brucella suis* infected murine macrophages. *Infect Immun*, 1998, vol. 66, p. 1309-1316.
14. Haine, V., Dozot, M., Dornand, J., Letesson, J. J., De Bolle, X. NnrA is required for full virulence and regulates several *Brucella melitensis* denitrification genes. *J Bacteriol*, 2006, vol. 188, nº4, p. 1615-9.
15. Halling, S. M., Jensen, A. E. Intrinsic and selected resistance to antibiotics binding the ribosome: analyses of *Brucella* 23S rrn, L4, L22, EF-Tu1, EF-Tu2, efflux and phylogenetic implications. *BMC Microbiol*, 2006, vol. 6, p. 84.
16. Hibbs, J. B. Synthesis of nitric oxide from L-arginine: a recently discovered pathway induced by cytokines with antitumour and antimicrobial activity. *Res Immunol*, 1991, vol. 142, nº 7, p. 565-569.

17. Hofmann, A. F., Eckmann, L. How bile acids confer gut mucosal protection against bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, vol. 103, n° 12, p. 4333-4334.
18. Horn, M. A., Drake, H. L., Schramm, A. Nitrous Oxide Reductase Genes (nosZ) of Denitrifying Microbial Populations in Soil and the Earthworm Gut Are Phylogenetically Similar. *Applied and environmental microbiology*, 2006, vol. 72, n° 2, p. 1019-1026.
19. Jacques, I., Grayon, M., Verger, J. M. Oxidative metabolic profiles of *Brucella* strains isolated from marine mammals: contribution to their species classification. *FEMS Microbiol Lett*, 2007.
20. Jimenez de Bagues, M. P., Gross, A., Terraza, A., Dornand, J. Regulation of the mitogen-activated protein kinases by *Brucella* spp. expressing a smooth and rough phenotype: relationship to pathogen invasiveness. *Infect Immun*, 2005, vol. 73, n° 5, p. 3178-3183.
21. Jimenez de Bagues, M. P., Loisel-Meyer, S., Liautard, J. P., Jubier-Maurin, V. Different roles of the two high-oxygen-affinity terminal oxidases of *Brucella suis*: Cytochrome c oxidase, but not ubiquinol oxidase, is required for persistence in mice. *Infect Immun*, 2007, vol. 75, n° 1, p. 531-535.
22. Kreeger, T. J., Deliberto, T. J., Olsen, S. C., Edwards, W. H. Cook, W. E. Safety of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in non-target ungulates and coyotes. *J Wildl Dis*, 2002, vol. 38, p. 552-557.
23. Lapaque, N., Moriyon, I., Moreno, E., Gorvel, J. P. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol*, 2005, vol. 8, n° 1, p. 60-66.
24. Li, R., Yang, X., Wang, L., Liu, E. Respiratory syncytial virus infection reversed anti-asthma effect of neonatal Bacillus Calmette-Guerin vaccination in BALB/c mice. *Pediatr Res*, 2006, vol. 59, n° 2, p. 210-215.
25. Loisel-Meyer, S., Jimenez de Bagues, M. P., Basseres, E., Dornand, J., Kohler, S., Liautard, J. P., Jubier-Maurin, V. Requirement of norD for *Brucella suis* virulence in a murine model of *in vitro* and *in vivo* infection. *Infect Immun*, 2006, vol. 74, n° 3, p. 1973-1976.
26. Luo, D. Y., Li, P., Xing, L., Zhao, G. Y., Shi, W., Zhang, S. L., Wang, X. L. DNA vaccine encoding L7/L12-P39 of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Chin Med J (Engl)*, 2006, vol. 119, n° 4, p. 331-334.
27. Malavolta, N., Frigato, M., Zanardi, M., Mule, R., Lisi, L., Gudi, S., Fini, M. *Brucella* spondylitis with paravertebral abscess due to *Brucella melitensis* infection: a case report. *Drugs Exp Clin Res*, 2002, vol. 28, p. 95-98.
28. Pankuch, G. A., Appelbaum, P. C. Activities of tizoxanide and nitazoxanide compared to those of five other thiazolides and three other agents against anaerobic species. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, vol. 50, n° 3, p. 1112-1117.

29. Pasquali, P., Adone, R., Gasbarre, L. C., Pistoia, C., Ciuchini, F. Mouse cytokine profiles associated with *Brucella abortus* RB51 vaccination or *B. abortus* 2308 infection. *Infect Immun*, 2001, vol. 69, n° 10, p. 6541-6544.
30. Pickett, M. J., Nelson, E. L. Speciation within the genus *Brucella*. III. Nitrate reduction and nitrite toxicity tests. *J Bact*, 1953, vol. 68, p. 63-66.
31. Rajashekara, G., Glover, D. A., Banai, M., O'Callaghan, D., Splitter, G. A. Attenuated bioluminescent *Brucella melitensis* mutants GR019 (virB4), GR024 (galE), and GR026 (BMEI1090-BMEI1091) confer protection in mice. *Infect Immun*, 2006, vol. 74, n° 5, p. 2925-2936.
32. Ramirez-Pfeiffer, C., Nielsen, K., Smith, P., Marin-Ricalde, F., Rodriguez-Padilla, C., Gomez-Flores, R. Application of the fluorescence polarization assay for detection of caprine antibodies to *Brucella melitensis* in areas of high prevalence and widespread vaccination. *Clin Vaccine Immunol*, 2007, vol. 14, n° 3, p. 299-303.
33. Ratushna, V. G., Sturgill, D. M., Ramamoorthy, S., Reichow, S. A., He, Y., Lathigra, R., Sriranganathan, N., Halling, S. M., Boyle, S. M., Gibas, C. J. Molecular targets for rapid identification of *Brucella* spp. *BMC Microbiol*, 2006, vol. 6, p. 13.
34. Roux, C. M., Booth, N. J., Bellaire, B. H., Gee, J. M., Roop, R. M., Kovach, M. E., Tsolis, R. M., Elzer, P. H., Ennis, D. G. RecA and RadA proteins of *Brucella abortus* do not perform overlapping protective DNA repair functions following oxidative burst. *J Bacteriol*, 2006, vol. 188, n° 14, p. 5187-5195.
35. Sangari, F. J., Seoane, A., Rodriguez, M. C., Aguero, J., Garcia Lobo, J. M. Characterization of the urease operon of *Brucella abortus* and assessment of its role in virulence of the bacterium. *Infect Immun*, 2007, vol. 75, n° 2, p. 774-780.
36. Spera, J. M., Ugalde, J. E., Mucci, J., Commerci, D. J., Ugalde, R. A. A B lymphocyte mitogen is a *Brucella abortus* virulence factor required for persistent infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, vol. 103, n° 44, p. 16514-16519.
37. Stevanin, T. M., Moir, J. W., Read, R. C. Nitric oxide detoxification systems enhance survival of *Neisseria meningitidis* in human macrophages and in nasopharyngeal mucosa. *Infect Immun*, 2005, vol. 73, n° 6, p. 3322-3329.
38. Taminiou, B., Daykin, M., Swift, S., Boschioli, M. L., Tibor, A., Lestrade, P., De Bolle, X., O'Callaghan, D., Williams, P., Letesson, J. J. Identification of a quorum-sensing signal molecule in the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Infect Immun*, 2002, vol. 70, n° 6, p. 3004-3011.
39. Vemulapalli, T. H., Vemulapalli, R., Schurig, G. G., Boyle, S. M., Sriranganathan, N. Role in virulence of a *Brucella abortus* protein exhibiting lectin-like activity. *Infect Immun*, 2006, vol. 74, n° 1, p. 183-191.

40. Whatmore, A. M., Shankster, S. J., Perrett, L. L., Murphy, T. J., Brew, S. D., Thirlwall, R. E., Cutler, S. J., MacMillan, A. P. Identification and characterization of variable-number tandem-repeat markers for typing of *Brucella* spp. *J Clin Microbiol*, 2006, vol. 44, n°6, p. 1982-1993.
41. Xiang, Z., Zheng, W., He, Y. BBP: *Brucella* genome annotation with literature mining and curation. *BMC Bioinformatics*, 2006, vol. 7, p. 347.
42. Zylberman, V., Klinke, S., Haase, I., Bacher, A., Fischer, M., Goldbaum, F. A. Evolution of vitamin B2 biosynthesis: 6, 7-dimethyl-8-ribityllumazine synthases of *Brucella*. *J Bacteriol*, 2006, vol. 188, n° 17, p. 6135-6142.