

01674
7



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

**CARACTERIZACION DE LA CAPACIDAD DE
INVASION CELULAR Y CITOTOXICIDAD EN MACROFAGOS
DE *Salmonella gallinarum* CEPA FVA1.**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

INDA MARCELA FIGUEROA OCHOA

TUTOR: DR. ANTONIO VERDUGO RODRIGUEZ

COMITÉ TUTORAL:

DRA. YOLANDA LOPEZ VIDAL

DR. JOSE LUIS PUENTE GARCIA

MEXICO, D. F.

Aviso a la Dirección General de Bibliotecas: *
UNAM a difundir en formato electrónico e imp.
contenido de mi trabajo recepción

NOMBRE: INDA MARCELA
FIGUEROA OCHOA

FECHA: 28 FEBRERO 2003

FIRMA: [Signature]

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La presente tesis fue financiada por los proyectos:

PAPIIT número IN223398

Desarrollo de herramientas moleculares para el control de la salmonelosis aviar.

Fase III

UNAM-CONACyT número 27669-B

Desarrollo de herramientas moleculares para el control de la salmonelosis aviar.

A Marce, Daniel y Carlos

A mis padres y hermanos

**Con todo mi amor y agradecimiento
por su apoyo, ejemplo, paciencia y compañía**

LOS AMO

A mi jurado:

**Dr. Antonio Verdugo Rodríguez
Dra. Yolanda López Vidal
Dr. José Luis Puente García
Dr. Francisco Suárez Güemez
Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello**

Por su tiempo y por sus consejos

Quiero manifestar mi agradecimiento a todos los miembros del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM que de alguna manera colaboraron en la elaboración del presente trabajo. Que hubiera sido sin el apoyo incondicional de Rigo, Daniel, Hugo, Hector, Toño, Alfredo, Francisco.....

A todos muchas GRACIAS!

Pero sobre todo gracias por su AMISTAD.

ÍNDICE

RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	1
- Etiología	2
- Transmisión de la enfermedad	3
- Signos y lesiones	5
- Diagnóstico	6
- Inmunización	6
- Tratamiento	7
- Prevención	7
MECANISMOS MOLECULARES DE PATOGENICIDAD	7
- Mecanismos de adherencia	7
- Enteritis y diarrea	9
- Mecanismos de invasión	10
ISLAS DE PATOGENICIDAD	14
SISTEMAS DE SECRECIÓN	18
- Sistema de secreción tipo III	19
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES CONTENIDOS EN LAS ISLAS DE PATOGENICIDAD	24
SUPERVIVENCIA DENTRO DE LOS MACRÓFAGOS	26
ISLOTES DE PATOGENICIDAD	27
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
HÍPOTESIS	29
MATERIAL Y MÉTODOS	30
- Cepas bacterianas	30
- Medios de cultivo y soluciones	30
- Extracción del ADN de <i>S. gallinarum</i>	30
- Electroforesis	31
- Detección del gen <i>invA</i> en cepas de <i>S. gallinarum</i>	31
- Amplificación de las secuencias aledañas a <i>invA</i>	31
- Construcción de mutantes <i>invA</i> no polares	32
- Preparación del inóculo para la cinética de crecimiento	36
- Cinéticas de crecimiento	36
- Caracterización parcial de la patogenicidad de cepas de <i>S. gallinarum</i> en embrión de pollo	37

- Preparación del inóculo para infectar las líneas celulares	37
- Ensayo de invasión células BAT	37
- Ensayo de invasión células HeLa	38
- Ensayo de fagocitosis en macrófagos J774	38
- Tinción con azul de tripano	39
- Tinción de cromatina con yoduro de propidio	39
RESULTADOS	40
- Detección del gen <i>invA</i> en cepas de <i>S. gallinarum</i>	40
- Amplificación de las secuencias aledañas a <i>invA</i>	41
- Construcción de mutantes <i>invA</i> no polares	41
- Cinéticas de crecimiento	47
- Caracterización parcial de la patogenicidad de cepas de <i>S. gallinarum</i> en embrión de pollo	50
- Cultivos celulares	52
- Tinción con azul de tripano	57
- Tinción de cromatina con yoduro de propidio	64
DISCUSIÓN	66
CONCLUSIONES	75
REFERENCIAS	76
APÉNDICE	87

ÍNDICE DE FIGURAS

	página
1. Eventos en la patogenicidad de <i>Salmonella</i>	4
2. Cascadas de señalización de <i>Salmonella</i>	11
3. Localización de los genes de virulencia en el cromosoma de <i>Salmonella</i>	17
4. Representación esquemática de las islas de patogenicidad de <i>Salmonella</i>	18
5. Relación de los genes involucrados en la biogénesis del flagelo y los genes del SSTIII	20
6. Organización de los genes de <i>S. enterica</i>	21
7. Mutagénesis con casete de km	33
8. Fragmento <i>invEABC</i>	34
9. Casete de Km	35
10. Estandarización del inóculo	36
11. Ensayo de invasión en cultivo celulares	38
12. Producto de la PCR utilizando los iniciadores EAB	40
13. <i>invEAB</i> cortado con <i>BamHI</i>	40
14. Producto de la PCR con los oligos EAB2	41
15. Purificación de la banda de 3261 pb	41
16. Plásmido pCRT7/NT-TOPO	41
17. Análisis de restricción del pMFO1	42
18. Liberación del fragmento <i>invEABC</i> de 3208 pb con <i>SstI-SalI</i> del pMFO1	42
19. Plásmido pMFO1	42
20. Plásmido pBKS cortado con <i>SalI-SstI</i>	43
21. Plásmido pBKS	43
22. Análisis de restricción del pMFO2	43
23. Plásmido pMFO2	43
24. Producto de la PCR con los oligos Km	44
25. Plásmido pBSL46	44
26. Plásmido pMFO3 cortado con <i>SalI-SstI</i>	44
27. Plásmido pMFO3	44
28. Plásmido pRE107 cortado con <i>SalI-SstI</i>	45
29. Plásmido pRE107	45
30. Fragmento A	45
31. Fragmento B	45
32. Iniciadores combinados EAB2-EAB y segmento B-EAB	46
33. Curva de crecimiento de cepas de <i>S. gallinarum</i>	48
34. Curva de ecuación no-lineal de crecimiento exponencial de <i>S. gallinarum</i>	49
35. Embrión de pollo ALPES II de 8 días de edad sin inocular	50
36. Embrión de pollo ALPES II de 10 días de edad inoculado con <i>S. gallinarum</i> FVA1	50
37. Porcentaje de invasión de <i>Salmonella</i> en células BAT	54
38. Porcentaje de invasión de <i>Salmonella</i> en células HeLa	54
39. Porcentaje de fagocitosis de <i>Salmonella</i> en macrófagos J774	55
40. Porcentaje de invasión de <i>S. gallinarum</i> cepa FVA1 a las 2, 4 y 6 horas (MOI) 80:1) en células BAT	56
41. Porcentaje de invasión de <i>S. gallinarum</i> cepa FVA1 y <i>S. typhimurium</i> cepa	56

938 a las 2, 4 y 6 horas (MOI 80:1) en células HeLa	
42. Porcentaje de fagocitosis de <i>S. gallinarum</i> cepa FVA1 y <i>S. typhimurium</i> cepa 938 a la hora y 2 horas (MOI 80:1) en macrófagos J774.	57
43. Células BAT infectadas con <i>S. gallinarum</i> cepa FVA1 (MOI 80:1)	58
44. Células BAT infectadas con <i>S. typhimurium</i> cepa 938 (MOI 80:1)	59
45. Células HeLa infectadas con <i>S. gallinarum</i> cepa FVA1 (MOI 80:1)	60
46. Células HeLa infectadas con <i>S. typhimurium</i> cepa 938 (MOI 80:1)	61
47. Citotoxicidad inducida por la infección de <i>S. gallinarum</i> cepa FVA1 y <i>S. typhimurium</i> cepa 938 en macrófagos de ratón J774 (MOI 1:80)	62
48. Muerte celular en porcentaje inducida por la infección de <i>S. gallinarum</i> cepa FVA1 y <i>S. typhimurium</i> cepa 938 en macrófagos de ratón J774 (MOI 1:80)	63
49. Macrófagos J774 después de tres horas de infección (MOI 80:1) con <i>S. gallinarum</i> FVA1 y con <i>S. typhimurium</i>	63
50. Porcentaje de núcleos que presentan condensación de cromatina postinfección (2h) con <i>Salmonella gallinarum</i> cepa FVA1 y <i>S. typhimurium</i> cepa 938 en macrófagos 774 (MOI 1:80)	64
51. Macrófagos J774 después de dos horas de infección (MOI 80:1) con <i>S. gallinarum</i> FVA1 y con <i>S. typhimurium</i>	65

ÍNDICE DE TABLAS

	página
1. Fimbrias que se han reconocido en <i>Salmonella</i> .	8
2. Homología en los componentes de varios sistemas de secreción y el flagelo.	23
3. Homología en las proteínas efectoras.	23
4. Condiciones de amplificación de la PCR de los genes de invasión y Km	32
5. Cuantificación de las UFC/ml durante la cinética de crecimiento de las cepas de <i>S. gallinarum</i> en medio LB o LB 0.3 M NaCl	47
6. Pruebas bioquímicas de las cepas de <i>Salmonella</i> .	51
7. Identificación de <i>S. gallinarum</i> y <i>S. pullorum</i> por pruebas bioquímicas.	51
8. Susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de <i>Salmonella</i> .	52
9. Porcentaje de invasión reportado con infección de <i>Salmonella gallinarum</i> y <i>S. typhimurium</i> en diferentes cultivos celulares.	53
10. Porcentaje de invasión, en células HeLa, de <i>Salmonella</i> crecida en diferentes condiciones de osmolaridad.	53
11. Relación aproximada de bacterias internadas o fagocitadas dependiendo del cultivo celular, después de 2 h de infección.	57

RESUMEN

Varios genes involucrados en la invasión celular se encuentran en el centisoma 63, formando la isla de patogenicidad 1 (SPI-1) en *Salmonella gallinarum*; la SPI-1 codifica determinantes que median la invasión de células no fagocíticas, migración de polimorfonucleares (PMN), apoptosis de macrófagos *in vitro* y activación de rutas de MAP-quinasas y factores de transcripción. Los genes que codifican el aparato de secreción se denominan *inv-spa*.

InvA es una proteína de la membrana interna, necesaria para el ensamblaje del sistema de secreción y la exportación de proteínas efectoras de la SPI-1.

El gen *invA in vitro*, está regulado positivamente por alta osmolaridad, incremento de la temperatura, decremento de los niveles de oxígeno y disminución en los niveles de nutrientes, condiciones que aumentan la invasión de *Salmonella* en cultivo de células.

En trabajos previos se ha descrito el efecto de la mutación en genes de invasión en *S. typhimurium*, sin embargo, no se conoce el efecto que ocasiona la mutación de *invA* en *S. gallinarum* y sus implicaciones en cultivos de tejidos, sobrevivencia en macrófagos y en modelos animales aviares. La construcción de una mutante de *S. gallinarum* en el gen *invA* permitiría esclarecer parte de estas interrogantes y por lo tanto tener un mejor entendimiento de la patogénesis de la salmonelosis aviar.

Por medio de PCR se confirmó la presencia de *invA* en *S. gallinarum*. El producto de PCR se clonó en el vector pCRT7 NT-TOPO, obteniendo el plásmido **MFO1**, después de liberar el fragmento de PCR con las enzimas de restricción *SalI-SstI* se subclonó en el vector pBKS generando el plásmido **MFO2**, utilizando los sitios únicos de corte para *MluI-BamHI* se insertó el casete de Km para generar la mutación no polar del gen *invA*, en el plásmido **MFO3**.

Se determinó el porcentaje de invasión de *S. gallinarum* cepa FVA1, el cual corresponde al $0.89\% \pm 0.32$ en células HeLa y $0.07\% \pm 0.03$ en células BAT, así como el porcentaje de fagocitosis en macrófagos J774 2.47 ± 0.87 y para *S. typhimurium* es del $5.69\% \pm 0.89$, 1.02 ± 0.10 y 16.48 ± 3.49 , respectivamente. El porcentaje de mortalidad de macrófagos J774 infectados con ambas cepas se evaluó utilizando el colorante azul de tripano y la observación de condensación de la cromatina al teñir los núcleos con yoduro de propidio.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos se puede concluir que *S. gallinarum* invade diez veces menos que *S. typhimurium* y que conforme avanza el tiempo de infección aumenta el porcentaje de invasión y la citotoxicidad en macrófagos.

(invasión, mutación, *S. gallinarum*, SPI-1, gen *invA*)

SUMMARY

Several genes involved in the cellular invasion are located in the centisoma 63, forming the pathogenicity island 1 (SPI-1) in *S. enterica* Gallinarum. The SPI-1 encodes proteins that allow the invasion of nonphagocytic cells, the migration of polymorphonuclear leukocytes, the apoptosis of macrophages *in vitro* and the activation of routes of MAP-kinasas and transcription factors. The genes that encodes the secretion apparatus are known as *inv-spa*.

InvA is an inner membrane protein necessary for the assembling of the secretion system and the exportation of effector proteins.

The gen *invA* is positively regulated *in vitro* by high osmolarity, an increase of temperature, a decrease of the oxygen and nutrients levels. These conditions increase the invasion of *Salmonella* in cells culture.

In previous works the mutation effect in invasion genes of *S. typhimurium* has been described, nevertheless, this effect is not known in *S. gallinarum* neither its implications in cells cultures, survival in macrophages and animal models of chickens. The construction of a mutant in the gen *invA* of *S. gallinarum* would allow to answer partially of these questions and to have a better understanding of the pathogenesis of a bird's salmonellosis. By PCR the presence of *invA* in *S. gallinarum* was confirmed. The PCR product was cloned into the vector pCRT7 NT-TOPO, obtaining the pMFO1. After releasing the fragment of PCR with *SalI-SstI* we subcloned it in the pBKS vector generating the pMFO2. By using the single site for *MluI-BamHI* the cassette of Km was inserted to generate the non polar mutation of the *invA* gen creating the pMFO3.

On the other hand, the invasion percentage of *S. gallinarum* FVA1 was determined; in HeLa and BAT cells, it was $0.89\% \pm 0.32$ and $0.07\% \pm 0.03$ respectively the phagocytosis percentage in macrophages J774 was 2.47 ± 0.87 . In the case of *S. typhimurium* invasion percentage was $5.69\% \pm 0.89$, 1.02 ± 0.10 and phagocytosis percentage was 16.48 ± 3.49 . The death rate was evaluated on macrophages J774 staining with trypan blue as well as the chromatin condensation using propidium iodide.

In this paper we established that *S. gallinarum* invades ten times less than *S. typhimurium* and that the invasion percentage and the citotoxicity in macrophages increases with time infection.

(Invasion, mutation, *S. gallinarum*, SPI-1, gen *invA*)

INTRODUCCIÓN

En la economía mexicana la avicultura representa un rubro de vital importancia, debido a que sus productos representan la fuente de proteína animal de buena calidad al costo más accesible; además de ser una de las áreas de la producción pecuaria más dinámica y tecnificada.

De 1994 a 2001, la producción mundial de carne de pollo tuvo un crecimiento promedio anual de 5.3%. En este mismo periodo, la producción mundial de huevo se incrementó en 4.9 puntos porcentuales en promedio al año.

Entre 1996 y 2000 las exportaciones totales de pollo crecieron en 28.7%, promedio anual, en México.

De 1994 a 2001 México se ubicó como el sexto país productor de huevo y el cuarto productor de pollo. Por otra parte, en el 2002 se convirtió en el primer consumidor mundial de huevo, con 20.2 Kg per cápita y aumentó su consumo de pollo en aproximadamente 4%.

La industria avícola mexicana genera más de 900 mil empleos: 150 mil directos y 750 mil indirectos, en su mayoría en zonas rurales. Además produce más de 4 millones de toneladas de alimento al año.

En el 2000, la participación de la avicultura en el Producto Interno Bruto (PIB) agropecuario fue de 8.3% y de 33.4% en el PIB pecuario.

Nuestro país cuenta con una parvada de más de 115 millones de gallinas ponedoras, 216 millones de pollo por ciclo y 801 mil pavos también por ciclo.

Durante los últimos cinco años la producción de pollo en México registró un ritmo de crecimiento anual de 5.8%, mientras que la del huevo fue de 5.3%.

De la producción de huevo en el 2001, el 95% se produce en siete entidades del país: Jalisco (43%), Puebla (22%), Sonora (8%), Nuevo León (7%), la zona de la Comarca Lagunera (6%), Yucatán (5%) y Guanajuato (4%). En cuanto a la producción de pavo, Sonora y Chihuahua son las de mayor producción con 50 y 40%, respectivamente. Por lo que toca a la producción de pollo 80%, se concentra en 11 estados: Querétaro (11%), Jalisco (11%), Veracruz (11%), Puebla (8%), la zona de la Comarca Lagunera (10%), Nuevo León (7%), Estado de México (6%), Guanajuato (5%), Yucatán (4%), Aguascalientes (5%) y Sinaloa (5%).¹

Salmonella es el género bacteriano que ocasiona mayores pérdidas a la industria avícola, así como problemas de salud pública para el consumidor (Rizo, 1987; Gordon, 1980; Vázquez, 1995).

Salmonella es un bacilo Gram-negativo que se comporta como patógeno intracelular facultativo; se divide en dos especies *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*; tomando en cuenta sus características bioquímicas generales, esta última se subdivide en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* y *houtenae*; las salmonelas de mayor importancia médica pertenecen a las subespecies *enterica* y *arizonae* (Clarke y Gyles, 1993).

¹ Información: Unión Nacional de Avicultores/UNA

PAGINACIÓN DISCONTINUA

Según el esquema clásico de Kauffman-White, basado en antígenos, somáticos, flagelares y ocasionalmente capsular (Vi), las salmonelas se clasifican en más de 2300 serotipos, que pueden ser móviles o inmóviles. Hay situaciones epidemiológicas en las que es preciso afinar aun mas la diferenciación dentro del serotipo correspondiente, para tal fin se utiliza la fagotipificación, sobre todo para las cepas causantes de epidemias en el hombre (Clarke y Gyles, 1993).

Su hábitat es el aparato gastrointestinal de los animales y el hombre, nunca como microbiota normal y se encuentra asociada a problemas septicémicos, gastrointestinales y aborto (Clarke y Gyles, 1993).

Etiología

Salmonella enterica serotipo Gallinarum es el agente etiológico de la Tifoidea Aviar (TA), que se caracteriza por ser una enfermedad septicémica, que involucra al sistema mononuclear fagocítico. Afecta, principalmente, al pollo y a la gallina de postura, así como también a la codorniz, pavo, gallina de Guinea y faisán; el gorrión, paloma de anillo, avestruz y cisne a menudo se infectan. El pato y ganso (palmípedos) son resistentes a la enfermedad (Padrón, 1987; Pomeroy y Najaraja, 1991). Su infectividad está determinada por la susceptibilidad genética, la edad de los pollos y su alimentación, siendo las estirpes pesadas, durante los primeros cinco días de edad y alimentadas con dietas que no acidifican el tracto intestinal, las más susceptibles (Mosqueda y Lucio, 1985; Silva, *et. al.*, 1981a; 1981b; Pomeroy y Najaraja, 1991; Urquiza, 1992). Las aves White Leghorn son más resistentes que las líneas de aves pesadas. (Prince y Garren, 1966; Padrón, 1991).

Salmonella gallinarum es una enterobacteria inmóvil que posee los antígenos somáticos (O) inmunodominantes: 1, 9, 12 y pertenece al grupo D del esquema de Kauffmann-White.

Metaboliza glucosa y maltosa, no fermenta rafinosa, inositol y sacarosa, no forma indol, no hidroliza la urea, los nitratos los reduce a nitritos y tiende a producir ácido sulfhídrico a partir de tiosulfato (Quinn, *et. al.*, 1994; Pomeroy y Nagaraja, 1991; Koneman, *et. al.*, 1989).

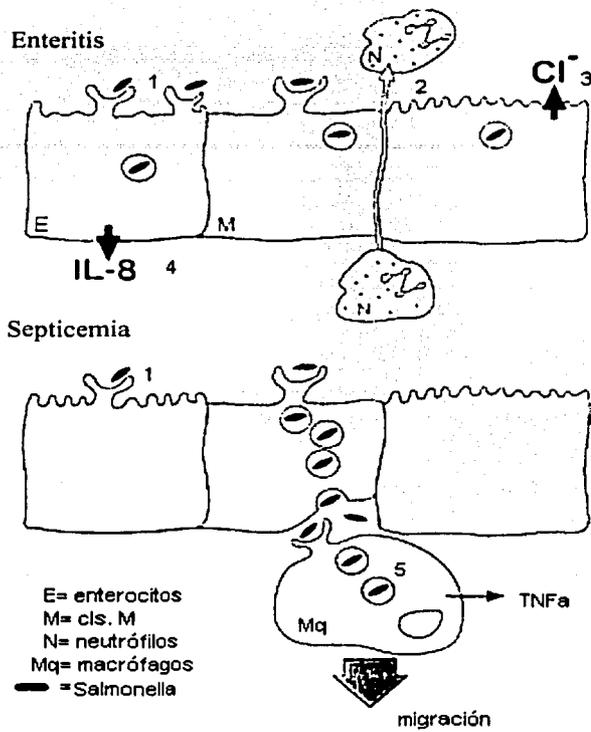
En México la TA ha ocasionado grandes pérdidas económicas a la avicultura a través de los años. Los principales efectos negativos son: pobre conversión alimenticia y disminución del crecimiento, aumento en los decesos en canal debido a lesiones por septicemia; las aves en postura disminuyen la producción hasta en un 30%, además de que existe una baja fertilidad e incubabilidad y alta mortalidad, sobre todo en aves jóvenes. Las aves que se recuperan de un brote son aves con retraso en el crecimiento considerándose aves de desecho y además existen portadoras asintomáticas (Padrón, 1989; Ashton, 1990; Mosqueda, 1987; Padrón, 1991; Pomeroy y Nagaraja, 1991).

Transmisión de la enfermedad

La transmisión de la enfermedad puede ser horizontal, en donde las aves silvestres, moscas y ratas pueden ser vectores mecánicos importantes; o vertical, por vía transovárica y su presentación de subaguda a crónica (Pomeroy Nagaraja, 1991; Clarke y Gyles, 1993; Gordon, 1980). Las aves en fase aguda excretan la bacteria a través de secreciones, mientras que en la fase crónica la bacteria se elimina a través del huevo. El periodo de incubación de la TA es de 4-5 días, con un curso de 5 días hasta dos semanas; produciendo una morbilidad del 5 al 20% y una mortalidad del 5 al 50%, lo cual depende de la edad de las aves y su susceptibilidad, así como de la virulencia de la cepa infectante (Ashton, 1990; Mosqueda, 1987; Padrón, 1991; Whiteman y Bickford, 1983; Gordon, 1980).

Cox, *et.al.*, en 1990, indican que *Salmonella* puede entrar y colonizar el ciego de aves recién eclosionadas, vía cloacal cuando ésta entra en contacto con superficies contaminadas de la incubadora. Sorvari, *et.al.*, en 1977 reportan que los movimientos de succión espontáneos de los labios de la cloaca de los pollos recién eclosionados, acompañados de contracciones peristálticas del colon, resultan en un movimiento de acarreo de materiales desde los labios de la cloaca al ciego.

En las aves se deben de considerar dos tipos de infección: salmonelosis entérica y sistémica. En la **figura 1** se esquematizan los eventos en la patogénesis de *Salmonella*.



Eventos

- 1 endocitosis
- 2 migración de neutrófilos
- 3 secreción de líquidos y electrolitos
- 4 secreción de citocinas

SPI-1

- 5 sobrevivencia dentro de macrófagos

SPI-2, SPI-3,
SPI-4, SODs

Adaptado de Ohl y Miller, 2001.

Figura 1. Eventos en la patogénesis de *Salmonella*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La infección por *Salmonella* ocurre en el intestino grueso, probablemente por la poca motilidad, pH alcalino y la falta de enzimas digestivas (Corrier, *et. al.*, 1994). Se sabe que los ácidos grasos volátiles, en estado de disociación, ejercen una actividad inhibitoria en infecciones por *Salmonella*, el cual está determinado por el pH (Barnes e Impery, 1980; Pjescak, 1970).

Signos y lesiones

Las aves procedentes de huevos infectados por *S. gallinarum* se observan moribundas, presentan pobre crecimiento, inapetencia, respiración forzada y taponamiento de la cloaca por un excremento blanquecino rico en uratos, debido a un proceso de deshidratación. En aves adultas se observa baja repentina en el consumo de alimento, diarrea verdosa o amarillenta, hipertermia, erizamiento de plumas, encogimiento e ictericia de barbilla y cresta como consecuencia de anemia hemolítica, debido a que la endotoxina provoca cambios en los eritrocitos por lo que éstos son eliminados por el bazo (Mosqueda, 1987; Pomeroy y Nagaraja, 1991; Mosqueda y Lucio, 1985; Padrón, 1993). La diarrea es de tipo secretor, similar a las diarreas producidas por otras bacterias enteropatógenas productoras de enterotoxinas como *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae*, *S. typhi* y *S. typhimurium* (Clarke y Gyles, 1993).

La infección oral conduce a la colonización cecal, hígado, bazo e intestino. En animales adultos en la fase aguda de la enfermedad, se presenta inflamación de la mucosa del intestino, hepatomegalia y esplenomegalia con necrosis focal, hígado color café-verdoso o bronceado y focos necróticos en miocardio, pulmón y molleja. En las aves jóvenes se puede observar, además, retención del saco vitelino, peritonitis, riñones pálidos y aumentados de tamaño.

Las aves adultas en fase crónica, también presentan folículos ováricos hemorrágicos, deformes y pendulosos, artritis y opacidad en la cámara anterior del ojo debido a la formación de abscesos.

Las bacterias pueden ser aisladas de hígado y bazo, siendo éstos los órganos de elección para el cultivo, debido a la capacidad de *S. gallinarum* para penetrar la pared intestinal y diseminarse a través del torrente sanguíneo a órganos internos (Gillingham, 1992; Pomeroy y Nagaraja, 1991). Los cultivos en medios artificiales pierden rápidamente su patogenicidad por lo que se recomienda dar varios pases en embriones de pollo, antes de probarla. La patogenicidad de los cultivos se conserva mejor en estado liofilizado o congelado.

S. pullorum, biotipo de *S. gallinarum* produce mortalidad sólo en aves jóvenes. *S. typhimurium* y *S. enteritidis* producen enfermedad en una amplia variedad de huéspedes susceptibles que incluyen: bovinos, ovinos, cerdos, aves, hombre y roedores. Las características del huésped y del microorganismo que afectan la habilidad de *Salmonella* para sobrevivir, multiplicarse y producir enfermedad sistémica en huéspedes particulares está siendo elucidada. En aves y ratones, la variación en la susceptibilidad entre líneas

genéticas, es atribuida al locus *Ity* (Barrow, *et. al.*, 1994) que porta al gen *Nramp1* (natural resistance-associated macrophage protein 1) (Vidal, *et.al.*, 1995). La persistencia de la bacteria y su multiplicación en los macrófagos, aunado a la habilidad de provocar muerte de los macrófagos infectados, contribuye al tipo y severidad de la enfermedad. *S.gallinarum* puede persistir en bazo y en tracto reproductivo por más de cuarenta semanas, la persistencia ocurre a pesar de una fuerte respuesta inmune, lo que sugiere un sitio de infección intracelular (Wigley, *et. al.*, 2001).

Kaiser, *et. al.* (2000) utilizando un modelo de cultivo celular primario de ave, infectado con *S. gallinarum* no detectaron aumento de IL-6; cuando infectaron con *S. typhimurium* y *S. enteritidis* observaron un aumento de 10 veces. *S. gallinarum* también provocó una reducción en los niveles de IL-1 β mRNA. Esto correlaciona con la patogénesis de la salmonelosis en las aves, donde la inflamación intestinal es relativamente escasa y la diseminación sistémica ocurre rápidamente.

Diagnóstico

Los métodos empleados para el diagnóstico de la TA son aglutinación con sangre completa, aglutinación en placa, microaglutinación; cuya desventaja son las reacciones cruzadas con otras bacterias como *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *E. coli*, *Citrobacter* y salmonelas móviles, por lo que se requiere el examen bacteriológico.

Recientemente, se han obtenido buenos resultados con la técnica de ELISA empleando como antígenos LPS (lipopolisacárido) (Minga, 1992; Nicholas y Cuellan, 1991) y pPME (preparaciones de proteínas de membrana externa) (Vázquez, 1995; Vázquez, *et. al.*, 1993; Verdugo-Rodríguez y Calva 1993; Verdugo-Rodríguez, 1993; Verdugo-Rodríguez, *et. al.* 1993a, 1993b). Así mismo, mediante recación en cadena de la polierasa (PCR) utilizando los iniciadores 5'-GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA-3' y 5'-TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C-3' correspondientes a la secuencia de *invA* (Rahn, *et. al.*, 1992; Tuchili, *et. al.*, 1995).

Inmunización

En la actualidad, para inmunizar a las aves se utiliza la vacuna 9R, elaborada a partir de una cepa viva, rugosa y semivirulenta que genera mejor protección que las vacunas inactivadas (Smith, 1956). Se produce por pasajes en medios de baja calidad nutricional; no interfiere con las pruebas serológicas ya que no estimula la producción de anticuerpos contra el LPS (Zhang-Barber, *et. al.*, 1999). Se recomienda cuando las aves tienen entre 9-10 semanas de edad; sin embargo, genera un efecto adverso en la subsiguiente producción de huevo, además, posee virulencia residual en algunas razas y la inmunidad inducida puede desaparecer 5 a 6 meses después de la vacunación (Gordon, 1980). Bouzoubaa (1987) demuestra que PME inducen mejor protección. Barrow (1990) desarrolló una vacuna con una cepa de *S. gallinarum* curada del plásmido asociado a virulencia (85Kb); la cepa fue menos virulenta pero la protección que se obtuvo fue también menor que la que se obtiene con la cepa 9R.

Actualmente, se están produciendo mutantes en genes de rutas biosintéticas de aminoácidos aromáticos: *aro A* (ac. *p*-aminobenzoico y ac. dihidroxibenzoico) cepa F98 y *nuoG* (NADH deshidrogenasa I), para ser utilizados como inmunógenos, con esta última cepa (SG9NGK) después de la inmunización oral se logró disminuir la mortalidad en pollos de dos semanas de edad, de un 75% a menos del 8%; la mutación en *aroA* no dio tan buenos resultados (Griffin y Barrow, 1993; Zhang-Barber, *et. al.*, 1998).

Tratamiento

La sulfaquinolonas y nitrofuranos son efectivos en el tratamiento de la TA pero hay que recordar que existen cepas de *S. gallinarum* resistentes a nitrofuranos, por lo que cualquier tratamiento que se aplique nunca será 100% satisfactorio. Los antimicrobianos se utilizan para disminuir las pérdidas por mortalidad, pero no impiden la transmisión transovárica, ni eliminan la infección (Pomeroy y Nagaraja, 1991; Smith, *et. al.*, 1981; Mosqueda, 1990).

Prevención

Actualmente en México, cuando se presenta una infección a nivel de progenitoras, la parvada debe ser eliminada por completo. En el caso de gallinas reproductoras, se debe muestrear el 100% de las aves, y eliminar a las reactores positivas. Además, se emplea el tratamiento masivo con antibióticos, y la vacunación sobre brote con la vacuna 9R. En muchas ocasiones, la culminación de todos los esfuerzos por controlar el brote es el envío de la parvada al rastro.

La manera más efectiva de iniciar un programa preventivo contra la TA es el uso de antibióticos, exclusión competitiva y vacunas, la adquisición de aves libres de *S.gallinarum*, sometiéndolas a programas sanitarios estrictos para impedir la infección horizontal, realizando las pruebas serológicas y bacteriológicas necesarias para el control de la enfermedad. La TA en México tiene un impacto económico significativo, su control es una prioridad sanitaria avícola, ya que existe la Norma Oficial Mexicana NOM-005-ZOO-1993: Campaña Nacional Contra la Salmonelosis Aviar, que incluye a los guajolotes (Diario Oficial, 1994), enfocada a la prevención, control y erradicación de la Tifoidea Aviar.

MECANISMOS MOLECULARES DE PATOGENICIDAD

Mecanismos de adherencia

Para el desarrollo de una enfermedad bacteriana es necesario la localización de la bacteria en un ambiente adecuado para su crecimiento, desarrollo y expresión de sus factores de virulencia. La supervivencia de un microorganismo en un nicho determinado depende de su habilidad para adherirse; las adhesinas tienen una estructura que les permite reconocer moléculas presentes en las células del huésped llamadas receptores, con una estereoquímica específica. Esta unión determina los huéspedes y el organotropismo de las bacterias patógenas; además, las adhesinas tienen la capacidad de activar a los linfocitos B

y neutrófilos, lo que resulta en una variedad de respuestas biológicas incluyendo proliferación celular y secreción de linfocinas (Hultgren, *et. al.*, 1996).

En las bacterias, se puede encontrar una amplia variedad de adhesinas, las cuales se dividen en dos grandes grupos: adhesinas fimbriales y adhesinas afimbriales, como la hemaglutinina filamentosa de *Bordetella pertussis* y el antígeno pH6 de *Yersinia pestis*, AfaD, AfaE en *E. coli*, proteína M de *Streptococcus*. En general, las adhesinas de bacterias Gram-negativas son: fimbria, fibrilla, flagelo, LPS y cápsula.

Es común el aislamiento de una bacteria que exprese múltiples tipos de fimbria, *Salmonella* expresa una amplia variedad de fimbrias con diferente especificidad de unión se muestran en la **tabla 1**.

Tabla 1. Las fimbrias que se han reconocido en *Salmonella* son:

fimbria	serovares	Dimensión	adhesina	subunidad mayor	masa molecular (kDa)	receptor
Tipo 1 (Sef21)	muchos	8 nm	FimH	Fim	21	manosa, fibronectina, laminina
Tipo 2	<i>S. gallinarum</i> <i>S. pullorum</i>	8 nm	ausente			hemaglutinación negativa
Tipo 3	<i>S. typhimurium</i> y otras ?		MrkD-like	?		colágeno tipoV
SEF 17	muchos	4 nm	AgfA(thin agregative fimbria)		17	fibronectina
SEF14	Grupo D y otras ?	delgado	SefA	SEF	14	?
SEF18	todos	2 nm	SefD	SEF	18	?
Pef (fimbria encoded plasmid) adherencia a enterocitos	<i>S. typhimurium</i>		PefA		15	?

LPF (long polar fimbria) adherencia a células M

BFP (bundle-forming pilus) no ha podido ser confirmado *in vivo*

Adaptado de (Low, *et. al.*, 1996)

Otro gen involucrado en la adherencia e invasión de *Salmonella* es *invH*. Las mutaciones en *invH* afectan la habilidad de *Salmonella* para adherirse y para invadir cultivos celulares. Las cepas adaptadas al huésped como *S. typhi* y *S. gallinarum* son más

perjudicadas por la mutación en dicho gen que las cepas no adaptadas al huésped como *S. enteritidis* y *S. typhimurium* (Altmeyer, *et. al.*, 1993; Galán y Sansonetti, 1996; Porter y Curtiss, 1997). Watson, *et. al.*, en 1998, encontraron que una mutación *TnphoA* en *invH* no afecta la virulencia de *S. choleraesuis*, después de la inoculación oral en ratones; esta mutación en *S. typhimurium*, después de la inoculación oral en aves, afecta su recuperación de ileon y bazo. La secreción y respuesta inflamatoria inducida en asas ligadas de bovino es completamente eliminada después de dicha mutación.

Enteritis y diarrea

Los mecanismos de patogenicidad con que *Salmonella* induce diarrea y septicemia no han sido descritos al detalle, pero parece ser un fenómeno complejo que involucra diversos factores de virulencia. Se ha demostrado la presencia de enterotoxina en *S. typhimurium* y *S. typhi* similar a las enterotoxinas de *Vibrio cholerae* (CT) y toxina termolábil (LT) de *E. coli*.

Balcázar (1993) amplificó un fragmento del gen que hemos denominado *eltA-like*, en *S. gallinarum*, que presenta secuencia nucleotídica homóloga con un fragmento del gen *eltA* de ETEC en un 95% y con el gen *ctxA* de *V. cholerae* en un 83% (Verdugo, *et. al.*, 1994). Posteriormente Vázquez, *et. al.*, (1999) amplificaron 1276 pb, fragmento que corresponde al tamaño de ambos genes (*eltAB*); la secuencia nucleotídica de estos genes tiene una similitud del 98% con respecto a los genes *eltAB* de ETEC y del 79% con el gen *ctxAB*, dichos genes fueron clonados y capaces de expresar una toxina, la cual fue reconocida con anticuerpos anti-CT. La participación de la enterotoxina en la producción de enteritis ha sido propuesta sin ser comprobada; la disrupción del gen de la toxina no afecta la enteropatogenicidad de *S. typhimurium* y *S. dublin* en el ganado (Watson, *et. al.*, 1998), se sugiere realizar nuevos ensayos donde se prueben mutaciones en *stn* para corroborar la importancia de la enterotoxina. Urquiza (1995) encontró que las proteínas obtenidas del sobrenadante del cultivo y las proteínas de espacio periplasmático de *S. gallinarum* FVA-1, tienen actividad enterotóxica, la cual fue observada mediante elongación de células CHO.

Actualmente se sabe que la proteína efectora **SopB** (*Salmonella* outer protein), como se conoce para *S. dublin*, o **SigD** (*Salmonella* invasión genes) para *S. typhimurium*, tiene actividad de inositol fosfato fosfatasa, por lo que genera una gran cantidad de fosfolípidos de inositol e inositol fosfato con capacidad de señalación, que entre otras funciones, se encuentra involucrada en la secreción de fase flúida, al estimular la secreción de cloro (Galyov, *et. al.*, 1997; Hong y Miller, 1998). **PipC/SigE** funciona como su chaperona. Su presencia se ha demostrado en *S. gallinarum* (Jones, *et. al.*, 1998).

La proteína **PipA** (pathogenicity island encoded protein) contribuye a la secreción fluida y reacción inflamatoria en la mucosa intestinal (Cotter y DiRita, 2000), su mutación muestra marcada disminución de la respuesta inflamatoria en el modelo de asa ligada de bovino. Los genes responsables de codificar dichas proteínas, se localizan en el centisoma 23.

La proteína efectora **SopD**, secretada en el centisoma 64 (Miroid, *et. al.*, 2001), trabaja en conjunto con SopB (Jones, *et. al.*, 1998).

Salmonella induce la migración de PMN y la liberación de IL8, GM-CSF, IFN γ y TNF α que reclutan células fagocíticas. En la cara apical y lateral de los enterocitos se sobreexpresa ICAM-1, que colabora en el movimiento fagocítico de los neutrófilos (Eckmann, *et. al.*, 1993; McCormick, *et. al.*, 1998; Gewirtz, *et. al.*, 1999; Jung, *et. al.*, 1995). No es necesaria la internación de la bacteria para inducir la migración, lo hace por medio de la proteína efectora **SopB** (Hong y Miller, 1998) que también se encuentra involucrada en el flujo de macrófagos. Esta migración es dependiente de la síntesis de proteínas en la bacteria y células eucarióticas.

La producción de citocinas proinflamatorias, inducida por *Salmonella*, es debida a la activación del factor de transcripción NF- κ B y AP-1, como consecuencia de la estimulación de las MAP cinasas (Mitogen-activated protein), Erk (quinasa reguladora por señales extracelulares), JNK (quinasa terminal) y p38 (Hobbie, *et. al.*, 1997). La proteína efectora **SopE**, además de iniciar el proceso de invasión, al activar pequeñas GTPasas como Rac y CDC42, permite la activación de MAP cinasa (Hardt, *et. al.*, 1998a) (**Figura 2**). SopE es codificada por un fago temperado defectuoso de la familia P2 localizado en el centisoma 60 (Hardt, *et. al.*, 1998b).

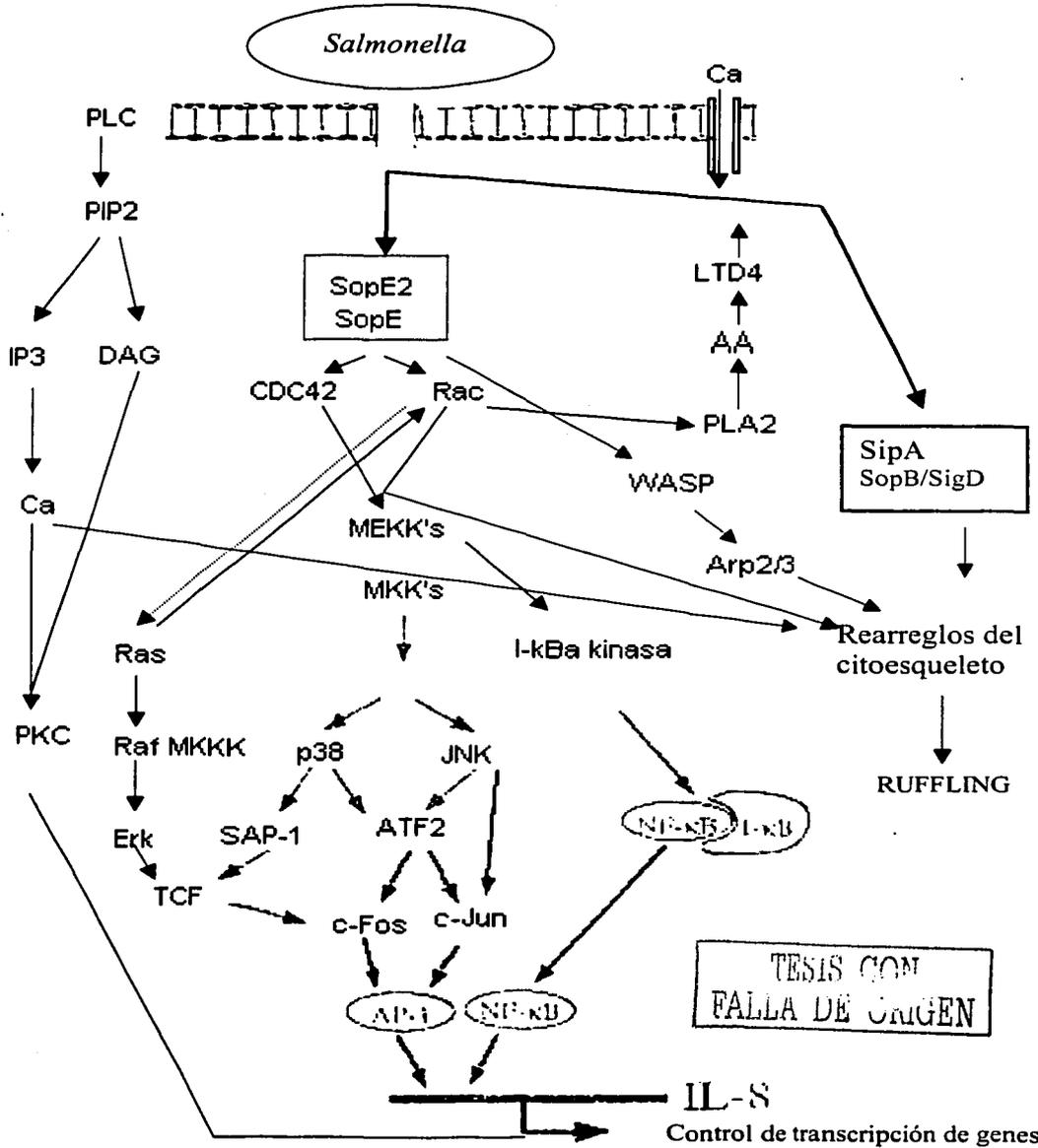
Las cepas de *Salmonella* con mutaciones que afectan el sistema *inv/spa*, *phoP* y *hilA* son incapaces de provocar la migración de PMN al foco de la infección (Galyov, *et. al.*, 1997). Murray y Lee, en el año 2000, reportaron que cepas de *S. dublin* mutadas en *invA* no producen migración de PMN al foco de la infección.

Mecanismos de invasión

Después de la ingestión de agua y alimento contaminado, *Salmonella* inicia su ciclo de infección, invadiendo al huésped a través de tejido linfoide, incluyendo las placas de Peyer y tonsilas cecales en las aves (Barrow, Rychlik y Lovell, no publicado; en Zhang-Barber, *et. al.*, 1999). Se adhiere, apicalmente, a las células epiteliales del íleon y a las células M. Debido a la ausencia del borde de cepillo así como de glicocalix (Galán y Sansonetti, 1996), las células M representan una puerta de entrada ideal para las enterobacterias (Siebers y Finlay, 1996; Kernéis, *et. al.*, 1997; Jepson y Clark, 1998; Jensen, 1998).

Salmonella tiene efectos citotóxicos que resultan en la destrucción de las células M y la invasión de enterocitos adyacentes tanto por la cara apical como por la basolateral. La habilidad de *Salmonella* para inducir la entrada a las células epiteliales y macrófagos es para evitar su destrucción por neutrófilos (Ernst, *et. al.*, 1999). *Salmonella* induce apoptosis de macrófagos activados mediante la proteína efectora **SipB** (*Salmonella* invasión protein) (Chen, *et. al.*, 1996a; Hersh, *et. al.*, 1999); y fagocitosis inducida en macrófagos no activados, para poder ser transportada a hígado y bazo (Cotter y DiRita, 2000). Se ha confirmado la presencia de SipB en *S. gallinarum* (Monack, *et. al.*, 1996). SipB se asocia

Figura 2. Cascadas de señalización de *Salmonella*.
 Adaptado de Hobbie, *et al.*, 1997.



con la proteasa proapoptótica, caspasa I, que activa a la IL-1 β ; no es necesario que la bacteria se interne para inducir apoptosis. El fenotipo citotóxico es dependiente de la fase de crecimiento bacteriano. Lundberg, *et al.*, en 1999, demostraron que cultivos bacterianos en la fase logarítmica de crecimiento son citotóxicos, mientras que en la fase estacionaria no lo son. Recientemente, Santos, *et al.*, (2001), reportan que los cultivos en fase estacionaria también son citotóxicos, de manera SipB-independiente después de 12-18 horas postinfección.

S. typhimurium puede llegar a hígado y a bazo por un ruta alterna, que no requiere colonización intestinal o invasión de células epiteliales intestinales, la bacteria es llevada directamente del lumen intestinal a circulación, bazo e hígado por fagocitos que expresan CD18 (Vázquez-Torres, 1999; Cotter y DiRita, 2000).

Salmonella invade las células del huésped por un mecanismo conocido como disparo (*trigger*) (Galán 1996; Finlay y Cossart, 1997). La bacteria envía señales a la célula que induce rearrreglos del citoesqueleto, dando lugar a la formación de ondulamiento (*ruffling*) en la superficie de las células epiteliales, como respuesta al contacto. Se han reconocido varias proteínas efectoras involucradas en estos rearrreglos: SipA, SopE, SopE2 y SopB. **SipA** es una proteína de unión a actina, que inhibe la despolimerización de F-actina y activa T-plasmina (Zhou, *et al.*, 1999, Galán y Collmer, 1999); su chaperona es SicA (**SipE** en *S.typhi*).

Como se mencionó anteriormente, SopE se comporta como GEF (guanine exchange factor) (Fu y Galán, 1999) en las proteínas RhoGTPasas CDC42 y Rac e induce *ruffling* de la membrana, que permite la internación de *Salmonella* y estimula Erk, JNK y p38 (Hardt, *et al.*, 1998a). Se sugiere que su origen se debe a duplicación del gen *sopE2* (Miroid, *et al.*, 2001).

Análisis de la secuencia del DNA aledañas a *sopE*, revelaron marcos abiertos de lectura (ORF) con secuencias significativamente similares a la cola de fagos y recombinasas sitio específico (Hardt, *et al.*, 1998b). Se ha reportado su presencia en *S. dublin* en el centisoma 60 (Wood, *et al.*, 1996).

La proteína **SopE2** se encuentra en todas las salmonelas, es de 25 kDa; muestra un 69% de homología con la secuencia de SopE. SopE2 activa a CDC42, el cual actúa con la familia de proteínas del síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP), para activar al complejo Arp2/3, compuesto de 7 subunidades; incluyendo dos proteínas relacionadas a actina y la proteína p41-Arc. Este complejo inicia la polimerización de actina y ramifica filamentos de actina (Stender, *et al.*, 2000; Miroid, *et al.*, 2001). El gen responsable de codificar dicha proteína se encuentra localizado en el centisoma 40-42. Mutaciones en SopE2 reducen la habilidad de *Salmonella* de invadir células HeLa (Bakshi, *et al.*, 2000). SopB/SigD por su actividad de inositol fosfato fosfatasa, también reorganiza el citoesqueleto de actina.

La proteína **SptP** (*Salmonella* protein tirosin phosphatase) es una tirosin fosfatasa, que independientemente de esta actividad, se comporta como GAP (GTPasa activating protein),

es decir, cambia Rac-GTP a Rac-GDP, con lo que evita el *ruffling* estimulado por SopE (Fu y Galán, 1998); inactiva CDC42 y Rac1, al estimular la hidrólisis de GTP y antagoniza la activación de SAPK/JNK. La porción amino-terminal comparte secuencias similares con YopE; en su porción carboxi-terminal es semejante a YopH, así como al dominio catalítico de algunas tirosin fosfatasa de células eucarióticas (Kaniga, *et. al.*, 1996; Fu y Galán, 1999). Su chaperona es SicP. Su expresión es controlada por HilA e InvF (Eichelberg, 1999).

Salmonella puede invadir varias líneas celulares; se considera que puede estimular más de un camino de transducción de señales, para promover su entrada a las células del huésped (Galán, 1994; Galán y Sansonetti, 1996). En células HeLa y en fibroblastos de ratón B82, la bacteria estimula a la fosfolipasa C, que cataliza la escisión del fosfatidilinositol 4-5 bifosfato (PIP₂) de membrana, generando inositol 1,4-5 trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). IP₃ induce la liberación del Ca²⁺, almacenado en el retículo endoplásmico. El calcio y fosfoinositol afectan proteínas de unión a actina, muchas de las cuales (alfa-actinina, talina, tubulina, tropomiosina y ezrina) son recluidas en el sitio de entrada de la bacteria. El DAG junto con el Ca²⁺ activan a la proteína quinasa C (PKC); el Ca²⁺ y la PKC sirven para activar a otras enzimas y finalmente a factores de transcripción.

Las citocalasinas B y D, que evitan la polimerización de los microfilamentos de actina; previenen la entrada de *Salmonella* (Elsinghorst, *et. al.*, 1989); los inhibidores de la tirosin cinasas no bloquean la entrada (Finlay y Cossart, 1997). El evento involucra CDC42 y Rac1 (Chen, *et. al.*, 1996b) pero no Rho (Sirard 1999; Hardt, *et. al.*, 1998a). Por el contrario, la fosfolipasa C no juega un papel importante en la entrada de *Salmonella* a las células Henle-407, en donde la infección desencadena MAP, que a su vez activa a la fosfolipasa A₂ (PLA₂) que da como resultado la producción de ácido araquidónico (AA), que es convertido a leucotrienos D₄ (LTD₄) por varias enzimas, incluyendo 5-lipooxigenasas (5-LO). LTD₄, directa o indirectamente, activa los canales de calcio, lo que causa la entrada del catión, que trae como consecuencia rearrreglos del citoesqueleto (Ginocchio, *et. al.*, 1994; Galán, 1994). El aumento de calcio estimula la secreción de cloro y por lo tanto se produce diarrea, ya que el agua lo acompaña. La internación es rápida. *Salmonella* se observa dentro de vacuolas en las células fagocíticas y no fagocíticas (SCV), posteriormente la superficie celular vuelve a la normalidad gracias al efecto de SptP (Figura 2).

Las proteínas SipB, SipC y SipD comparten dominio hidrofóbico presente en la familia RTX (toxina formadora de poro), se comportan como translocasas y son las responsables de formar poros en la membrana de las células eucarióticas. SipC se transloca junto con Sip B de manera *inv*-dependiente (Collazo y Galán, 1997; Eichelberg, *et. al.*, 1994). Sip D además regula el SSTIII (Sistema de secreción tipo III) de manera similar a YopN /LcrE (Lee, 1997), ya que su mutación produce un aumento en la secreción de proteínas efectoras.

Para identificar los elementos genéticos que contribuyen a que *Salmonella* entre a las células de huésped, Galán y Curtiss, 1989, llevaron a cabo complementación de una cepa de *Salmonella* no invasiva, con cósmidos de un banco genómico, lo cual permitió la

identificación inicial de los genes de invasión *invA*, *B*, *C*, y *D*. La expresión del fenotipo invasivo está regulada por señales fisiológicas que incluyen la fase de crecimiento bacteriana, osmolaridad del medio y las concentraciones de oxígeno.

ISLAS DE PATOGENICIDAD

Varios genes involucrados en la invasión se encuentran en el centisoma 63, formando la isla de patogenicidad 1 (SPI-1); se trata de un segmento de 35-40 kb que contiene 31 genes; éstos pueden ser divididos en categorías que incluyen: genes que codifican el SSTIII, denominados *inv-spa* (Ginocchio, *et. al.*; 1994, Galán y Curtiss, 1989); genes que codifican proteínas involucradas en la translocación de las moléculas efectoras dentro del citoplasma de la célula huésped; así como genes que codifican las proteínas efectoras y sus chaperonas, algunas de las cuales se mencionaron anteriormente.

Las islas de patogenicidad se constituyen por un grupo de genes involucrados en codificar factores específicos de virulencia, su porcentaje de G-C difiere al promedio del genoma bacteriano; se presentan repeticiones directas en sus extremos; portan genes que codifican factores de movilidad como integrasas, transposasas o secuencias de inserción y se encuentran frecuentemente insertadas en un loci de un tARN (Blanc-Potard, *et. al.*, 1999; Marcus, *et. al.*, 2000). A diferencia de otras islas de patogenicidad de *S. enterica*, SPI1 no está localizada inmediatamente adyacente a genes tRNA (Groisman y Ochman, 2000).

La SPI-1 fue probablemente adquirida en la evolución temprana de *S. enterica* por transferencia de genes, de manera horizontal; lo que se propone al determinar el % de G-C, que es de 42-47% mientras que el del cromosoma de *Salmonella* es del 52-54%. El tamaño, ordenamiento y orientación de los genes *inv/spa* en SPI-1 es similar a los genes de invasión del plásmido de virulencia de *Shigella*, lo que sugiere que estas secuencias son transferibles (Galán, 1996).

La SPI-1 codifica determinantes que median: la invasión de células del huésped no fagocíticas, apoptosis de macrófagos *in vitro* y activación de caminos MAP-cinasas y factores de transcripción (Groisman y Ochman, 1997; Hardt, *et. al.*, 1998b). La capacidad de destruir y dañar a las células M depende de los genes de la SPI-1 y del gen *stxA* (Clark, *et. al.*, 1998), también involucrado en supervivencia dentro de los macrófagos, gracias a la resistencia a radicales reactivos del oxígeno (Cotter y DiRita, 2000). La SPI-1 se encuentra presente en *S. bongori* y todas las especies de *S. enterica* (Miroid, *et. al.*, 2001).

Actualmente se sabe que *Salmonella* cuenta con cinco islas de patogenicidad, SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4 y SPI-5 (Figura 3). La SPI-2 se encuentra en el centisoma 31, localizada inmediatamente adyacente al gen tRNA *valV*; su tamaño es de 40 kb y tiene un porcentaje de G-C del 44.6%.

La SPI-2 consta de 32 genes que regulan la supervivencia y replicación bacteriana en los compartimentos intracelulares de fagocitos y células epiteliales (Hensel, *et. al.*, 1998;

Valdivia y Falkow, 1997). Esta dividida en dos segmentos, los cuales se obtuvieron en diferentes eventos de transferencia horizontal; la porción más pequeña es de 14.5 kb, contiene un grupo de cinco genes *ttr* involucrados en la reducción del tetratonato y 7 ORFs con función desconocida, está presente en *S. bongori* y parece que no interviene significativamente en la infección sistémica; la porción mayor, 25.3 kb, está presente únicamente en *S. enterica* y alberga genes importantes de virulencia (Marcus, *et. al.*, 2000).

Los genes que codifican los componentes del sistema de secreción tipoIII (SSTIII) se denominan *spi/ssa* (Figura 4). Ochman, *et.al.* (1996a), reportan que son exclusivos del género *Salmonella*, aunque no se han detectado en *S. bongori*. Shea, *et.al.*, en 1996, sugieren que en *S. gallinarum* y *S. typhi*, las regiones de SPI-2 están duplicadas.

Los genes que conforman la SPI-2 se pueden dividir en categorías (Figura 4):
ssa (secretion system apparatus): representadas por *ssaB-E* y *ssaG-V*, cuyos productos conforman el aparato de secreción (Hensel, *et. al.*, 1997; Hensel, *et. al.*, 1998).
ssr/spiR (secretion system regulator): *ssrA/ssrB* codifica para un sistema regulador de dos componentes, requerido para la expresión de los genes *sse*, encargados de codificar las proteínas efectoras (Hensel, *et. al.*, 1998). El gen *ssrA* está a su vez regulado por OmpR-EnvZ, que es responsable de la activación y represión de genes en respuesta a cambios de osmolaridad y pH (Lee, *et. al.*, 2000; Beuzón, *et. al.*, 2001).
ssc (secretion system chaperone): codifican las proteínas SscA y SscB. La proteína SscA es similar a SycD, producto de *icrH* de *Yersinia pseudotuberculosis*, chaperona de YopB y YopD; SscB es semejante a la proteína IpaI de *Shigella flexneri* (Klein y Jones, 2001).
sse (secretion system effector), representados por los genes *sseA-sseG*. Ensayos de virulencia, *in vitro*, con cepas con mutaciones no polares muestran que los genes *sse* son críticos para la virulencia de *Salmonella* (Hensel, *et. al.*, 1998). La proteína SseB, semejante a EspA (Marcus, *et. al.*, 2000), es secretada a la superficie bacteriana y necesaria para prevenir la localización de NADPH oxidasa, así como la formación de radicales reactivos del oxígeno en la membrana del fagosoma de macrófagos murinos; en la actualidad no se sabe si este efecto es debido a la actividad directa de SseB dentro del macrófago o si SseB se requiere para translocar otras proteínas dentro de los macrófagos (Klein y Jones, 2001).

La proteína SseD es semejante a EspB; SseC se comportan como EspD y YopB, proteínas formadoras de poro requeridas para la translocación. Las condiciones que se han utilizado *in vitro*, como el medio mínimo con concentraciones limitadas de Mg, pH 5, no han sido las óptimas para la expresión de estas proteínas en el medio (Klein y Jones, 2001).

Dos proteínas codificadas por genes localizados fuera de SPI-2, SspH1 y SspH2, son secretados a través de este SSTIII, estas dos proteínas son similares a IpaH y YopM y contribuyen a la patogénesis de la salmonelosis en becerros. SspH2 es dependiente del regulador SsrA/SsrB, secuencias *sppH2-like* se han detectado en la mayoría de los serotipos examinados de *Salmonella*. SspH1 es independiente del regulador SsrA/SsrB y puede ser translocada por los SSTIII de SPI-1 y SPI-2 al igual que la proteína SirP, sólo se han detectado en *S. typhimurium* (Miao, *et. al.*, 1999).

Buchmeier y Heffron (1989) realizaron estudios con cepas mutantes de *S. typhimurium* que poseían inserciones Tn10 en SPI-2, para evaluar la capacidad de supervivencia. Shea, *et.al.* (1996), demostraron la disminución de la virulencia en por lo menos cinco órdenes de magnitud al inocular, oral o intraperitonealmente, con mutantes en SPI 2. Ochman, *et.al.* (1996b), proponen que las proteínas efectoras modifican factores del huésped requeridos para la fusión fago-lisosoma o para la acidificación del fagosoma. Uchiya, *et.al.* (1999) demostraron que SpiC/SseC/SsaB, proteína efectora de SPI-2, interfiere con el tráfico intracelular de membranas, inhibiendo la fusión de SCV con endosoma y lisosomas y probaron que las mutantes en *spiC* atenúan su virulencia.

Sorprendentemente, mutantes en SPI2 de *S. typhimurium*, muestran dificultad para invadir cultivos de células epiteliales o macrófagos y la cantidad de SipC, proteína secretada por la SPI-1, disminuye; además se observa resistencia alterada a varios agentes antibacterianos (Deiwick, *et. al.*, 1998). Los genes de la SPI-2 son inducidos varios horas después de que *Salmonella* es ingerida por los macrófagos.

La SPI-3 también es requerida para la supervivencia intracelular en macrófagos, provee productos esenciales para el crecimiento en condiciones limitadas de Mg^{2+} . Se compone de 17 kb y tiene un porcentaje de G-C del 39.8-49.3%, está localizada en el centisoma 82 inmediatamente adyacente al gen tRNA *serC* (Figura 3). Está transcripcionalmente controlada por PhoP/PhoQ (Blanc Potard, *et. al.*, 1999; Groisman y Ochman, 2000). Alberga 10 ORFs organizados en 6 unidades transcripcionales, incluye al operón *mgtCB* que codifica la proteína MgtC (intramacrophage survival protein) y el transportador de Mg^{2+} de alta afinidad MgtB (Marcus, *et. al.*, 2000; Blanc Potard, *et. al.*, 1999) (Figura 4).

La SPI-4 codifica un supuesto sistema de secreción tipo I (SSTI) que media la secreción de toxinas y se cree que participa en la adaptación de *Salmonella* al ambiente intracelular en los macrófagos; es de 27 kb y está compuesta por 18 genes (Figura 4) localizados en el centisoma 92 (Figura 3).

Finalmente, la SPI-5 es de 7.5 kb se encuentra localizada en el gen tRNA *serT*, centisoma 20 (Figura 3); su porcentaje de G-C es de 43.6%. Se encuentra presente en *S.gallinarum* (Wood, *et. al.*, 1998) codifica para factores involucrados en la secreción fluida y reacción inflamatoria en la mucosa intestinal, como SopB/SigD, y como se mencionó anteriormente, reorganiza el citoesqueleto de actina, se encuentra involucrada en el flujo de macrófagos y estimula la secreción de cloro. SopB está codificada en la SPI-5 y se secreta por la SPI-1 (De Vinney, *et. al.*, 2000). Hila no es activador transcripcional del promotor *sigDE* y está bajo el control de InvF (Eichelberg y Galán, 1999). Otra proteína codificada es MarT con secuencia similar a ToxR, proteína reguladora de *V. cholerae*; las mutantes se ven afectadas en su capacidad para producir salmonelosis entérica pero no salmonelosis sistémica (Wood, *et. al.*, 1998).

La proteína PipA (pathogenicity island encoded protein) contribuye a la secreción fluida y reacción inflamatoria en la mucosa intestinal (Cotter y DiRita, 2000), su mutación muestra marcada atenuación de la respuesta inflamatoria en el modelo de asa ligada de

bovino. PipA es secretada y translocada vía el SSTIII de SPI-2. *pipB* codifica para una proteína asociada a membrana. El gen *pipD* es monocistrónico. *sopB*, *pipC*, *pipB* y *pipA*, están contenidos dentro de la misma unidad transcripcional cuya expresión es regulada por SsrAB (Knodler, *et. al.*, 2002).

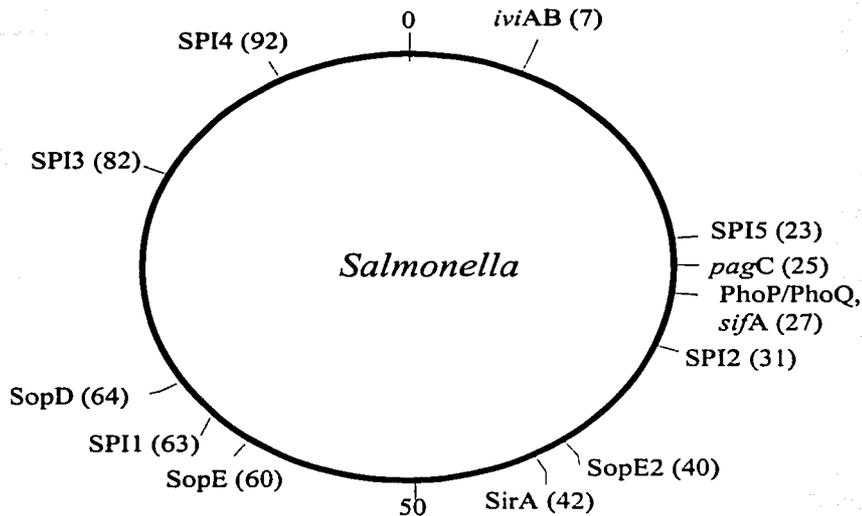


Figura 3. Localización de los genes de virulencia en el cromosoma de *Salmonella*. Los números entre paréntesis indican el centisoma.

Ninguna de las mutantes en la SPI-5 se alteró en su crecimiento *in vitro* o en su capacidad de invadir células HeLa comparada con la cepa WT. Sin embargo, la magnitud de la respuesta secretora e inflamatoria evocados por las mutantes en *S. dubin* se redujo significativamente en asas ligadas de bovino. Esto se relaciona con el decremento en la severidad de la diarrea en becerros infectados con cepas mutadas, sin verse afectada la capacidad de dichas mutantes para producir salmonelosis sistémica (Wood, *et. al.*, 1998).

Las islas de patogenicidad contribuyen a la macroevolución, al desarrollar variantes patogénicas, mientras que el proceso de rearreglo, delección y transferencia de islas de patogenicidad tiene fuerte impacto en microevolución y adaptación de los microorganismos patógenos durante el proceso de infección (Hacker y Kaper, 2000).

formado por componentes del sistema de secreción. Este tipo de secreción, está ejemplificado por la secreción de la pululanasa de *Klebsiella oxytoca*; la cual requiere 14 proteínas, la mayoría localizadas en la MI; la proteína PulD, homóloga a la familia de proteínas YscC, forma un poro en la membrana externa. Este sistema de secreción, está generalmente involucrado en la secreción extracelular de enzimas degradativas como la elastasa, fosfolipasa C y toxina A de *P. aeruginosa* así como la quitinasa, proteasa y toxina colérica de *V. cholerae* (Thanassi y Hultgren, 2000).

El SSTIV tiene la capacidad de exportar DNA y proteínas, la secreción ocurre en un solo paso y requiere de por lo menos 11 proteínas, se encuentra presente en *Helicobacter pylori*, *B. pertussis*, *Bruceella suis* y *Agrobacterium tumefaciens* (Thanassi y Hultgren, 2000).

El SSTV abarca un grupo de proteínas, conocidas como auto transportadores, en donde la proteína secretada y el aparato de secreción son producidos en un marco abierto de lectura sencillo, el autotransportador es exportado de manera *sec* dependiente, con escisión del péptido señal amino-terminal, la porción carboxi-terminal se inserta en la ME y sirve como poro. Algunos ejemplos de autotransportadores incluyen la pertactina de *B. pertussis*, la citotoxina vacuolizante de *H. pylori* y EspC de EPEC (Thanassi y Hultgren, 2000).

Sistema de secreción tipo III (SSTIII)

El sistema de secreción tipo III de *Salmonella* presenta las siguientes características: la proteína secretada no presenta secuencia señal amino-terminal, que tenga que ser liberada; varias de las proteínas efectoras requieren de chaperonas específicas para su secreción; para la activación completa del sistema, se requiere de una señal inductora, que generalmente es el contacto con la célula del huésped lo cual permite la translocación de las proteínas efectoras dentro del citoplasma de la célula huésped. Se han encontrado sistemas homólogos en otras bacterias patógenas: *Yersinia*, *Erwinia*, *Pseudomonas* y EPEC entre otras (Tabla 2 y 3). Varios componentes del SSTIII son similares a las proteínas Fli/Flh involucradas en la biosíntesis del flagelo (Lee, 1997) (Figura 5).

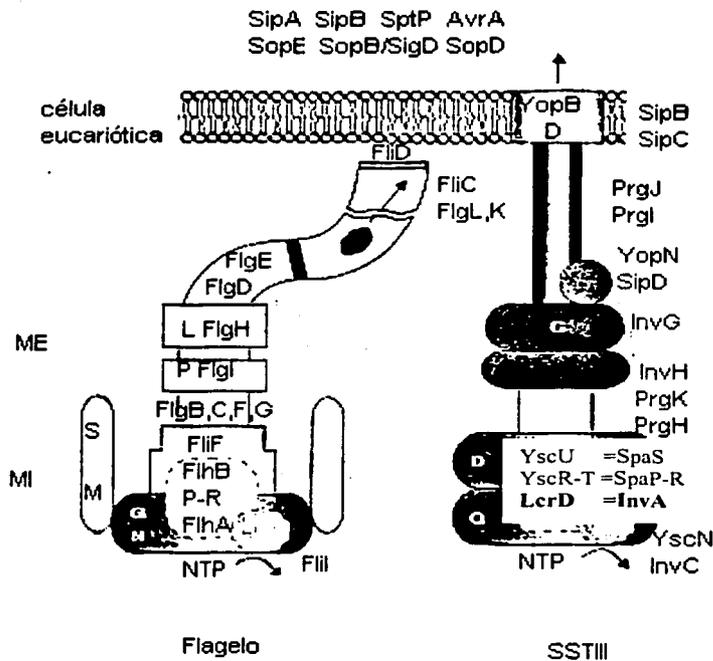


Figura 5. Relación de los genes involucrados en la biogénesis del flagelo y los genes del SSTIII.
Adaptado de Thanassi y Hultgren, 2000.

Los componentes estructurales, del SSTIII, pueden ser divididos en categorías que incluyen: ATPasa de membrana interna, como *InvC*, que posee secuencias similares a la subunidad β de F_0F_1 (Eichelberg, *et. al.*, 1994); PMI, ejemplificadas por *InvA* y *SpaP/InvL*, *SpaQ/InvM*, *SpaR/InvN*; PME, donde se incluye *InvG* (Kubori, *et. al.*, 1998); proteína con secuencia similar a la familia de secretinas formadoras de poro y lipoproteínas como *PrgK* y *PrgH*. La mutación del gen *prgH* afecta la expresión de *prgI*, *prgJ*, *prgK*, *orgA* y *orgB* (Oxygen regulated genes) (Klein, 2000). *InvG*, *PrgH* y *PrgJ* forman una estructura supramolecular llamada complejo aguja, consiste en 4 anillos conectados por un bastón, los anillos inferiores interactúan con la MI, tienen un diámetro de 40 nm y un ancho de 20 nm; los anillos superiores interactúan con la ME y el peptidoglicano, tienen un diámetro de 20

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

nm y un ancho de 18 nm; se extiende a la superficie formando una estructura que se asemeja a una aguja de 80 nm de largo y 13 nm de ancho (Sukhan, 2000; Galán, 2001, Kimbrough y Miller, 2002). **InvE** permite el correcto ensamblaje del complejo aguja e interviene en la regulación del proceso de secreción, disparando los eventos intracelulares que permiten la invasión (Ginocchio, 1992; Kaniga, *et. al.*, 1994). **InvH** se requiere para la correcta localización de InvG (Sukhan, 2000).

Al ser mutado el gen **invB**, no se afecta el proceso de invasión, sugiriendo que no se requiere para la entrada de la bacteria a la célula del huésped. **InvJ/SpaN** (Collazo, *et.al.*, 1995; Zierler y Galán, 1995) y **SpaO/InvK** son de las primeras proteínas efectoras en secretarse y se cree que permiten la activación del proceso de secreción (Galán, 1996).

Es importante recordar que ciertas proteínas efectoras como SopE (Galán y Collmer, 1999; Goosney, *et. al.*, 1999) SopE2, SopB/SigD (De Vinney, *et. al.*, 2000) SopD no son codificadas en la SPI-1 pero si son secretadas por el SSTIII de la SPI-1 (Hong y Miller 1998).

InvA es una proteína de membrana interna, involucrada en la formación de un canal, su porción amino-terminal es hidrofóbica, con ocho dominios transmembranales, de por lo menos 20 aminoácidos, mientras que su porción carboxi-terminal hidrofílica, localizada en el citoplasma puede interactuar con otros componentes del sistema.

La proteína **InvA** es necesaria para el ensamblaje del SSTIII y exportación de proteínas efectoras. La porción C-terminal de Mxi A, pero no la de LcrD pueden complementar los defectos de invasión de mutantes de **invA** indicando que esta porción de MxiA es funcional y estructuralmente homóloga a InvA (Clark, *et. al.*, 1996a; Ginocchio y Galán, 1995) (Figura 6) (Tabla 2 y 3).

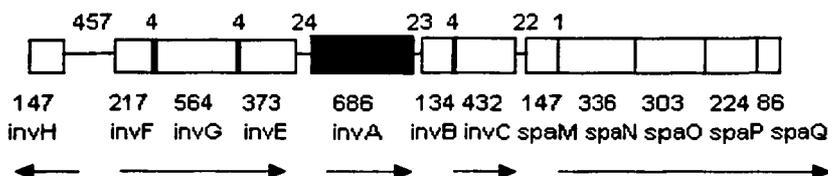


Figura 6. Organización de los genes de *S. enterica*. Las flechas indican la dirección de la transcripción. Los números superiores indican las regiones intergénicas y los inferiores el número de aminoácidos.

Adaptado de Boyd, 1997.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El gen *invA* en *S. typhimurium* se encuentra unido a *mutS*, *recA* y *srlC*, es el primer gen de un operón que contiene otros dos genes de invasión *invB* e *invC*, se trata de una región de 3.5 kb aproximadamente localizada entre los sitios *Sall* y *EcoRI* (pYA 2220) (Galán y Curtiss, 1989) la transcripción del operón es en dirección *invA-invC*.

La secuencia nucleotídica de *invA* mostró un ORF capaz de codificar un polipéptido de 686 aminoácidos con un peso molecular de 75.9 kDa (Galán, *et. al.*, 1992). Siete nucleótidos corriente arriba del codón GTG se localiza un sitio de unión a ribosomas (AGGAT), no se encontró secuencia de Shine-Dalgarno cerca de los siguientes dos codones ATG del mismo ORF. El tamaño del polipéptido *InvA* y la actividad de *tnphoA* sugieren que el codón GTG es el sitio de origen de la transcripción (Galán, *et. al.*, 1992).

InvA es semejante a SsaV, LcrD de *Yersinia* (regulador de Ca) (Lee, 1997). La mutación polar de *invA* con *inv A61::TnphoA* evita la expresión de los genes corriente abajo (Galán y Curtiss, 1989). La expresión del gen *invA* está positivamente regulado, *in vitro*, por alta osmolaridad, incremento de la temperatura, decremento de los niveles de oxígeno y disminución en los niveles de nutrientes similar a las condiciones que aumentan la invasión de *Salmonella* en cultivo de células. La fase de crecimiento también está implicada en la invasividad de *Salmonella* (Tartera y Metcalf, 1993).

Las bacterias inoculadas en LB inducen pérdida de epitelio asociado a folículos (FAE) e invaden eficientemente células M, comparado con las bacterias inoculadas en PBS (Clark, *et. al.*, 1998).

Clark, *et. al.*, en 1996a, determinaron que los niveles de *InvA* fueron similares en cultivos en agitación (aireados) y estáticos, durante el crecimiento exponencial; pero observaron un incremento sorprendente, de nueve órdenes, en los cultivos en agitación a las 6 horas, cuando el cultivo entra en fase estacionaria, lo que no correlaciona con los niveles de invasión.

Las secuencias de *invA* de *S. gallinarum*, *S. choleraesuis* y *S. typhi* son idénticas, en *S. enterica* es débilmente pleomórfica, y tiene más del 60% de identidad con sus homólogos en otras bacterias entéricas (Boyd, *et. al.*, 1997).

Las cepas con mutación en *invA*, *spa*, *prg* y *orgA* son incapaces de invadir cultivo de células epiteliales. Las mutantes en *invA*, de *S. typhimurium*, son atenuadas solamente cuando la bacteria es inoculada oralmente, pero continúan siendo patógenas cuando la cepa es inoculada intraperitonealmente (Galán y Curtiss III, 1991; Galán, *et. al.*, 1992b; Clark, *et. al.*, 1996b; Penheiter, *et. al.*, 1997, Galán y Curtiss, 1989; Jones, *et. al.*, 1994; Ohl y Miller, 2001). Estos datos demuestran claramente que la SPI-1 juega un papel importante durante la invasión de la mucosa intestinal y no se requiere durante la infección sistémica (Groisman y Ochman, 2000).

En trabajos previos se ha descrito el efecto de la mutación en genes de invasión en *S. typhimurium* (Galán y Curtiss III, 1991; Galán, *et. al.*, 1992b; Clark, *et. al.*, 1996b;

Penheiter, *et. al.*, 1997, Galán y Curtiss, 1989) sin embargo, no se conoce el efecto que ocasiona la **mutación de *invA*** en *S. gallinarum* y de las implicaciones de la misma en cultivos de tejidos, sobrevivencia en macrófagos y en modelos animales aviares, por lo que se sugiere la construcción y caracterización de dicha mutante.

Cepas con mutación en los genes *inv* de la SPI-1 son severamente atenuados para la invasión de cultivos celulares, pero retienen la capacidad de invadir células M en ratón; por lo que Bäumlér, *et. al.*, en 1997 y Clark, *et. al.* en 1998, al trabajar con mutantes en *invA*, sugieren que *S. typhimurium* tiene la capacidad de invadir células M, tanto por un mecanismo *inv*-dependiente como por un mecanismo *inv*-independiente.

Tabla 2. Homología en los componentes de varios sistemas de secreción y el flagelo.

SPI-1	SPI-2	<i>Yersinia</i>	<i>Shigella</i>	<i>E. coli</i>	Flagelo
InvA	SsaV	LcrD	MxiA	EscV	FliA
InvB			Spa 15		FliH
InvC	SsaN	YscN	Spa47/MxiB	EscN	FliI
InvE		LcrE/YopN	MxiC		
InvG	SpiA	YscC	MxiD	EscC	
InvH		VirG	MxiM		
SpaN		YscP	Spa 32	EspA	
SpaO	SsaO	YscQ	Spa 33/SpaO		FliN
SpaP	SsaR	YscR	Spa 24/SpaP	EscR	FliP
SpaQ	SsaS	YscS	Spa 9/SpaQ	EscS	FliQ
SpaR	SsaT	YscT	Spa 29/SpaR	EscT	FliR
SpaS	SsaU	YscU	Spa 40/SpaS	EscU	FliB
PrgH			MxiG		
PrgI	SsaH	YscF	MxiH	EscF	
PrgJ			MxiI		
PrgK	SsaJ	YscJ	MxiJ	EscJ	FliF
OrgA			MxiK		
	SsaD	YscD		EscD	

Tabla 3. Homología en las proteínas efectoras.

SPI-1	SPI-2	<i>Yersinia</i>	<i>Shigella</i>	<i>E. coli</i>
SipA			IpaA	
SipB	SseC	YopB	IpaB	EspD
SipC			IpaC	EspB
SipD		YopN/LcrE	IpaD	
SipE			IpgC	
SptP		YopE y YopH		
AvrA		YopP/YopJ		
SopE			IpgD	
	SseB			EspA

	SseD			EspB
InvJ			VirA	
SpaO			IpgF	

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES CONTENIDOS EN LAS ISLAS DE PATOGENICIDAD

Las bacterias se tienen que adaptar a cambios ambientales drásticos cuando entran al huésped, viajan a lo largo del aparato digestivo y al pasar de un medio extracelular a uno intracelular, lo logran debido a una regulación coordinada y precisa de los genes de virulencia; lo cual permite modular su metabolismo. Para lograr este control, *Salmonella* utiliza sistemas reguladores de dos componentes que incluyen un sensor histidina cinasa (proteína transmembranal) y un regulador de respuesta que se activa por fosforilación y activa o reprime a nivel transcripcional la expresión de un grupo de genes. Así, PhoQ/PhoP, PmrB/PmrA, SsrA/SsrB, EnvZ/OmpR y BarA/SirA regulan la invasión bacteriana y la supervivencia intracelular.

Proteínas pertenecientes a la familia de reguladores transcripcionales AraC tales como la proteína InvF controla la expresión de las proteínas efectoras (Cotter y DiRita, 2000) y activa la transcripción de *sipC* (Kaniga, *et. al.*, 1994).

La metilación del DNA juega también un papel importante en la regulación de los genes de virulencia de *S. typhimurium* ya que mutaciones en *dam* tiene efectos pleiotrópicos en la expresión de varios genes de virulencia (Lucas y Lee, 2000). Otra clase de reguladores incluyen factores σ alternos como factor sigma FliA(σ^{28}) asociado al flagelo y proteínas histidina-like.

La regulación específica de los genes de la SPI-1 está mediada por **HilA**, un regulador transcripcional de la familia de activadores transcripcionales OmpR/ToxR (Bajaj, *et.al.*,1995); el gen responsable de su síntesis está codificado dentro de la SPI-1. La expresión de *hilA* está controlada transcripcionalmente por los sistemas reguladores de dos componentes, **PhoP/PhoQ** y **SirA** (*Salmonella* invasion regulator). PhoP reprime a *hilA*, mientras que SirA activa su transcripción.

Las señales que activan a SirA son, bajas concentraciones de oxígeno, alta osmolaridad (300 mM), pH ligeramente alcalino; PhoP se activa con condiciones limitadas de Mg^{2+} ; condiciones que se ven reflejadas en el lumen intestinal y en el medio intracelular, respectivamente.

Así, el crecimiento bajo condiciones de alta osmolaridad y disminución en las concentraciones de oxígeno estimulan la secreción de proteínas asociadas al SSTIII, resultando en el aumento de los niveles de internación de la bacteria (Eichelberg y Galán, 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El sistema PhoP/PhoQ, controla la expresión de más de 40 genes de virulencia; algunos de los cuales están involucrados en la supervivencia dentro de los macrófagos, al activar a *pags* (PhoP-activated genes) y reprimir a *prgs* (PhoP-repressed genes), ejemplificados por los genes *inv/spa*. Los *pags* incluyen el operón *mgtCB* y los genes de SPI-2. PhoP/PhoQ también está involucrado en la regulación de la respuesta a la tolerancia ácida y en la regulación de la capacidad de resistir a los péptidos catiónicos, modulando al regulador de dos componentes, **PmrA/PmrB**. PmrA activa promotores de ciertos *pags*, incluyendo aquellos cuyos productos alteran el LPS y median resistencia a péptidos catiónicos, como las polimixinas, *in vitro*. Los péptidos catiónicos antibacterianos se unen iónicamente al grupo fosforil (cargado negativamente) del lípido A, desestabilizando las membranas bacterianas y causando muerte celular. Los genes *pmrE*, *F*, *G* y *pagP* modifican al lípido A, lo que trae como consecuencia que no se permita la inserción de péptidos catiónicos; estos cambios en el lípido A, también producen un lipopolisacárido con menor potencial proinflamatorio (menor inducción de FNT) (Ohl and Miller, 2001).

Evidencias recientes indican que el sistema PhoR/PhoB, el cual regula genes en respuesta a niveles de fósforo, puede reprimir genes de invasión de la SPI-1 (Lucas, *et. al.*, 2000). Un sistema de dos componentes que modula la expresión de genes en respuesta a condiciones osmóticas, EnvZ/OmpR probablemente también regula genes de virulencia ya que su disrupción disminuye la expresión de genes SPI-1. Mutantes en *phoQ* incrementan la dosis letal (DL) en un 50% (Sirard, 1999).

HilA controla la expresión de los genes que codifican las proteínas del SSTIII, es activador transcripcional del promotor de *invF*, *sipC*, *sipA*, y *prgH*; el promotor de *prgH* controla la expresión de *orgA* y *orgB*, *prgK* (Klein, *et. al.*, 2000). *SipC* tiene dos promotores, uno HilA-dependiente, corriente arriba de *spaS* y otro InvF-dependiente corriente abajo de *spaS* (Lucas y Lee, 2000; Eichelberg y Galán, 1999). SptP también está controlado por HilA e InvF (Eichelberg y Galán, 1999). La proteína efectora, hipervariable **AvrA** (avirulence factor R), semejante a **AvrRxv** de *Xanthomonas campestris pv vesicatoria*, agente etiológico de la enfermedad de la hoja manchada del tomate y de la pimienta (Mirrold, 2001), no es controlada por HilA ni InvF, probablemente porque fue recientemente adquirida (Eichelberg y Galán, 1999).

La expresión de *hilA* está constitutivamente reprimida por una proteína H-NS-like que se une al DNA y modifica el grado de súperenrollamiento, lo cual ocasiona que la RNA polimerasa no pueda iniciar eficientemente la transcripción del promotor de *hilA*. SPI1 contiene el gen que codifica para **HilD** (regulador central de los genes de virulencia) y *hilC/sprA/sirC* (miembros de la familia AraC/XylS) que en respuesta a bajas concentraciones de oxígeno, alta osmolaridad, o ambas activa la transcripción de *hilA* al unirse directamente con H-NS o competir con H-NS por secuencias de DNA (Cotter y Di Rita, 2000). La sobreexpresión de *hilC* puede inducir la transcripción de genes dependientes de *invF* independientemente de *hilA* (Eichelberg y Galán, 1999 y Rakeman, *et. al.*, 1999). HilD también se puede unir directamente al promotor de *invF* (Cotter y Di Rita 2000).

Lundberg, en 1999, demostró que *HilA* se requiere solamente para la expresión de *prgH* mientras que *sipB*, *invA* e *invF* pueden ser expresados de manera *HilA*-independiente. *HilC* es capaz de activar directamente la expresión *invF* e *invA* en ausencia de *HilA* (Lucas, *et. al.*, 2000). Mutantes en *invF* y *hilA* son deficientes para entrar en células Henle 407 siendo más perjudicada la mutación en *invF* para la infección sistémica.

SUPERVIVENCIA DENTRO DE LOS MACRÓFAGOS

En células no fagocíticas, después de un periodo de adaptación de cuatro horas, *Salmonella* tiene la capacidad de replicarse dentro de las vacuolas (SCV) que se caracterizan por tener concentraciones limitadas de Mg^{2+} y Fe^{2+} y un pH ácido, ya que la acidificación dentro del fagosoma es necesaria para la supervivencia y replicación intracelular; Steele-Mortimer demuestran lo contrario en líneas celulares de macrófagos RAW 264.7 (Steele-Mortimer, *et. al.*, 2000). Las SCV son espaciosas lo cual permite que los productos antibacterianos se diluyan, se expresen genes que aumentan la supervivencia intracelular y sus productos neutralicen péptidos catiónicos. Una proporción significativa de macrófagos sufre apoptosis después de la invasión, situación contraria se observa en células epiteliales (Sirard, 1999; Finlay y Falkow, 1997).

La biogénesis de las SCV se caracteriza por una pérdida rápida de marcadores endocíticos tempranos EEAI y receptor de la transferrina (TfR), enriquecimiento progresivo de ATPasa vacuolar, involucrada en la acidificación del fagosoma y de algunas glicoproteínas lisosomales (Lgps) de manera Rab7-dependiente, sin interactuar directamente con lisosomas. Las SCV adquieren marcadores lisosomales LAMP1 y LAMP2 (proteínas membranales asociadas a lisosomas) y fosfatasa ácida lisosomal (LAP), aunque carecen de marcadores lisosomales cuyo blanco depende de señales de manosa 6-fosfato (la mayoría de las enzimas lisosomales), así como del propio receptor M6PR, lo cual sugiere indicar que no existe relación entre las SCV y los compartimentos endosomales tardíos.

Además, para excluir enzimas lisosomales solubles, las SVC muestran una accesibilidad limitada a endocitosis de fase fluida (García-del Portillo, *et. al.*, 1993 y 1995). Las SVC tienen la capacidad de fusionarse selectivamente, con vesículas que acarrean diferentes marcadores, con la finalidad de establecer un microambiente fagosomal que permita su supervivencia. La fusión del fagosoma con endosomas tempranos es estimulada por Rab5 al unirse a SopE. Rab5 activa SNARE que recluta α -SNAP (soluble NSF attachment protein) y NSF (N-ethylmaleimida-sensitive fusion protein) homohexámero de 76 kDa que se une e hidroliza ATP y por lo tanto promueve la fusión con compartimentos endosomales tempranos (Mukherjee, *et. al.*, 2000).

Los marcadores lisosomales se localizan en extensiones filamentosas, microtúbulo-dependiente, que se conectan a las SCV; una función potencial de estas estructuras es proveer de nutrimentos a la bacteria intracelular. En el centisoma 27 del cromosoma de *S.typhimurium*, entre los genes *potB* y *potC*, se localiza un segmento de 1.6 kb que alberga

al gen *sifA*, requerido para la formación de dichos filamentos; *sifA* (*Salmonella* induced filaments) tiene un porcentaje de G-C del 41% y fragmentos flanqueados de 14pb en repetición directa, lo cual sugiere que su incorporación ocurrió por un mecanismo de recombinación sitio-específico (Groisman y Ochman, 2000), la mutación de *sifA* produce atenuación de la bacteria (Groisman y Ochman, 1997). Méresse, *et.al.*, (1999), detectaron la acumulación de vesículas conteniendo rab7/lamp1 que rodean a las SVC y sugieren que esto trae como consecuencia la selectividad de *Salmonella* a los marcadores lisosomales.

Un plásmido de 85 kDa contribuye a la supervivencia de *S. gallinarum* dentro de los macrófagos (Barrow, *et. al.*, 1987). El locus *spv* (*Salmonella* plasmid virulence), de dicho plásmido, contiene cinco genes: *spvRABCD*; *spvR* codifica para un activador transcripcional, de la familia LysR-MetR, que regula su propia síntesis y es requerido para la expresión del operón *spvABCD*. El factor σ^S (RpoS) induce *spvR*, durante la fase estacionaria, y ambos actúan en el promotor *spvA*, induciendo la expresión de los genes *spvABCD*, lo cual permite la síntesis de las proteínas Spv (Salyers y Whitt, 1994; Guiney, 1997). Al no ser degradada *Salmonella* en los macrófagos se inhibe el procesamiento y presentación de sus antígenos.

Salmonella expresa enzimas que inactivan directamente radicales reactivos de oxígeno y nitrógeno; como la homocisteína (gen *metL*), que antagoniza al óxido nítrico; y superóxido dismutasa (sodCII), su producción está inducida por el factor σ^S , el cual también es necesario para la transcripción de genes involucrados en la adaptación a ambientes estresantes, como choque ácido, limitación de nutrientes, estrés oxidativo, así como producción de Agf. La disrupción del gen *rpoS* atenúa significativamente la virulencia de *Salmonella* (Ohl y Miller, 2001).

Dentro de los mecanismos que permiten el efecto bactericida de los macrófagos se encuentra la producción de superóxido, por la NADPH-oxidasa. Para neutralizar al superóxido *Salmonella* produce superóxido dismutasas (SODs) como Fe-SOD, Mn-SOD, Cu, Zn-SODs. Otra proteína que es necesaria para sobrevivir bajo estrés oxidativo es una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, codificada por *zwf*. En el año 2001, Straaten, *et.al.*, reportan al gen *sspJ* (superoxide susceptibility protein) localizado entre el centisoma 54.4 y 64 del cromosoma de *Salmonella* que codifica una proteína de 392 aminoácidos lo cual contribuye a la protección del estrés oxidativo.

ISLOTES DE PATOGENICIDAD

Salmonella requiere de otros genes para su virulencia, algunos autores las han llamado 'islotos de patogenicidad'. Entre ellos *pagC* y *msgA*, se localizan en el centisoma 25 del cromosoma de *S. typhimurium*; el gen *pagC*, PhoP dependiente, codifica para la síntesis de una proteína de membrana externa, las mutantes son invasivas pero no logran multiplicarse dentro de los macrófagos ni causan infección letal en el ratón, cuando se administran intraperitonealmente; sugiriendo que la proteína PagC participa de manera importante en la enfermedad sistémica. El gen *msgA*, PhoP independiente, es necesario para la sobrevivencia

dentro del macrófago y virulencia en el ratón. El operon *iviVI-AB* (in vivo induced) que se localiza en el centisoma 7, es otra región del cromosoma de *Salmonella* que se caracteriza por contenidos bajos de G-C, está regulada por PhoP y se considera que está involucrada en la adhesión e invasión a las células del huésped (Groisman y Ochman, 1997).

La presencia de Sistemas de Secreción Tipo III exclusivamente en bacterias patógenas proveen un blanco para el desarrollo de agentes terapéuticos que excluyan a la microbiota normal. Además proteínas del sistema de secreción tipo III así como cepas mutadas en genes de virulencia son excelentes candidatos para el desarrollo de nuevas vacunas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad de invasión celular y toxicidad en macrófagos murinos de *Salmonella gallinarum* cepa FVA1.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la presencia de *invA* en *Salmonella gallinarum* cepa FVA1.

Realizar mutagénesis dirigida con casete de kanamicina en *invA* de *Salmonella gallinarum* cepa FVA1.

Determinar el porcentaje de invasividad de *Salmonella gallinarum* cepa FVA1, en cultivo de células epiteliales.

Determinar la citotoxicidad y porcentaje de fagocitosis en macrófagos de *Salmonella gallinarum* cepa FVA1.

HIPÓTESIS

Existen diferencias en el porcentaje de invasión, en cultivos celulares, así como en la citotoxicidad para macrófagos, dependiendo de la cepa de *Salmonella* spp utilizada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

Con la finalidad de seleccionar la cepa de *S. gallinarum* en la que se llevaría a cabo la mutación en el gen *invA*, se realizó caracterización bioquímica y caracterización parcial de la patogenicidad de las cepas aisladas de brotes de campo y de colección, con las que cuenta el Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM.

Se utilizaron las siguientes cepas de *S. gallinarum*:

Cepas mexicanas aisladas de brotes de campo:

FVA1

U2

FVB323

FVB383

FVB285

FVB591.

347

415

cepa vacunal 9R

cepa de referencia de la *American Type Culture Collection* (ATCC) 9184

cepa de *S. typhimurium* 938.

Las bacterias se conservaron en caldo A con glicerol (Sigma, USA) al 15% y están almacenadas en congelación a -70°C (Harris, USA).

Medios de cultivo y soluciones

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

Caldo A, caldo LB, caldo LB 0.3 M, agar LB, agar LB 0.3 M, PBS. Los medios se prepararon de acuerdo con las formulas establecidas (ver Apéndice A) y se esterilizaron en autoclave a 121°C, 15 lb de presión durante 15 min (Yamato Autoclave SM32, Scientific Co. LTD, Orangeburg, NY, USA). Cuando fue necesario se les adicionó 150 µg/ml de ampicilina (Roche, Alemania), 150 µg/ml kanamicina (USB, USA) o ambos.

Extracción del ADN de *S. gallinarum*

En 100 ml de caldo LB 0.3M se incubaron 3 colonias bacterianas 18 h en agitación a 200 rpm. El cultivo se centrifugo (Internation Equipment Company, Needham Heights, Mass., USA) 10 min a 3 000 x g en tubo Falcon (Becton Dickinson, NJ, USA). El protocolo utilizado fue el descrito en Current Protocols in Molecular Biology editado por Ausubel, *et. al.* La pastilla se resuspendió en 5670 µl de buffer TE [tris (Gibco, USA) HCl (Baker, México) y EDTA (Gibco) 10:1 mM] pipeteando continuamente. Se adicionaron 300 µl de SDS (duodecil sulfato sódico) (Sigma) al 10%, 30µl de proteinasa K (Sigma) 20mg/ml y RNAsa a una concentración final de 30 ul/ml (Sigma). Se mezcló e incubó 1 h a 37°C en baño María (Fisher Scientific Isotemp Waterbath, Pittsburgh, PA, USA). Se adicionaron 100 µl de NaCl 5M. Se agregaron 800 µl de hexadecyl trimethyl-ammonium bromide (CTAB) (Sigma) /NaCl precalentado y se incubó 10 min a 65°C en baño María (Precision Scientific Reciprocal Shaking Bath Model 25, Chicago, Illinois, USA). Se

añadieron 8 ml de cloroformo (Merck, Alemania) alcohol isoamílico (Merck) 24:1, se centrifugó (Model J2-21, Beckman, Palo Alto, Ca. USA) 5 min a 16 000 x g. El sobrenadante se decantó, y se depositó en tubo de teflón (Nalgen, USA) de 50 ml y se añadió un volumen igual de fenol (Gibco) cloroformo (Merck) y alcohol isoamílico 25:24:1. Se mezcló y centrifugó 5 min a 16 000 x g (repetir las veces que sea necesario). El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se adicionando 0.6 vol de isopropanol (Sigma), se dejó en hielo 15 min y se centrifugó 10 min a 16 000 x g. Se eliminó el isopropanol. Se agregó etanol al 70% (Merck) y se centrifugó 20 min a 3 000 x g. Se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70%. Se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 300 µl de buffer TE o agua.

Electroforesis

La cámara de electroforesis (Horizon 58 Life Technologies Gibco) se ensambló. Se preparó un gel de agarosa (Gibco) al 1% y se añadieron 3 µl de bromuro de etidio (1 mg/ml) (Sigma). Se agregó solución amortiguadora TAE [(trizma (USB)-base acetato de sodio (Baker), EDTA (Gibco)], ácido acético (Baker) (ver apéndice A). La muestra de ADN se mezcló con 1µl de buffer de carga (ver apéndice A) y se depositó en los pozos. Se añadieron 2 µl del marcador de peso molecular (Gibco) en el primer pozo. El ADN se separó a 85 volts (fuente de poder 1000/500 Bio-Rad). Las imágenes se captaron con el programa Flour S de Diversity Database 2.2.0 o Quantity One 4.2.1 Bio-Rad.

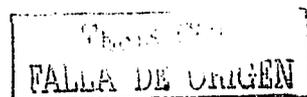
Detección del gen *invA* en cepas de *S. gallinarum*

Para comprobar la presencia del gen *invA* en cepas de *S. gallinarum*, aisladas de la República Mexicana, se realizó la PCR (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400, Norwalk CT; USA) utilizando los iniciadores EAB (Gibco) 5'AAG CGT TTA ATG CGG AGG AGT3' (*forward*) 5'GCG CCC AGA TCC ATA CAT CA3' (*reverse*) (Figura 8) durante 30 ciclos.

Amplificación de la secuencia aledaña a *invA*

Para asegurar la integración del plásmido, conteniendo el gen *invA* interrumpido por el casete de Km; por recombinación homóloga en la cepa silvestre (WT), se amplificaron las zonas aledañas a *invA* utilizando los iniciadores EAB2 (Gibco) 5'GTG GAG ATT TAC TCT GAT TGG ATA G3' (*forward*) 5'GTG GGA TAG AGC TCG ACA TCG C3' (*reverse*) por 30 ciclos, con lo que se ampliaron las regiones homólogas de 723-439 pb a 943-906 pb (Figura 8).

Se intentó una segunda estrategia para amplificar el fragmento de interés de 3261 pb, que incluye *invEABC*, utilizando dos nuevos juegos de iniciadores que crean el sitio de corte para *EcoRI* y dividen al fragmento *invEABC* en dos segmentos que serán llamados A y B (Figura 8). Iniciadores fragmento A 5'GTG GAG ATT TAC TCT GAT TGG ATA G3' (*forward*) 5'CTT CAC GGA ATT CAA AAT AGA AGA G3' (*reverse*), iniciadores fragmento B 5'CTA TTT TGA ATT CCG TGA AGC AAA AC3' (*forward*) 5'GTG GGA TAG AGC TCG ACA TCG C3' (*reverse*) (Figura 8).



Las condiciones utilizadas para realizar la PCR, de cada uno de los fragmentos de interés se muestran en la **tabla 4**.

Tabla 4. Condiciones de amplificación de la PCR de los genes de invasión y kanamicina.

Gen	Nombre	iniciadores	tamaño pb	Desnaturalización Alineamiento Extensión					
				°C	T min	°C	T min	°C	T min
<i>invEAB</i>	EAB	5'AAGCGTTTAATGCGGAGGAGT3' 5'GCGCCCAGATCCATACATCA3'	2573	94	1:15	47	1:30	72	1:45
<i>invEABC</i>	EAB2	5'GTGGAGATTACTCTGATTGGATAG3' 5'GTGGGATAGAGCTCGACATCGC3'	3261	94	1:00	50	1:30	72	2:50
<i>invEA</i>	fragmento A	5'GTGGAGATTACTCTGATTGGATAG3' 5'CTTCACGGAATTCAAAATAGAAGAG3'	1501	94	1:00	52	1:30	72	2:50
<i>invABC</i>	fragmento B	5'CTATTTTGAATTCGGTGAAGCAAAAC3' 5'GTGGGATAGAGCTCGACATCGC3'	1780	94	1:15	54	1:30	72	2:00
Km ^R	Casete Km	5'GCTTCACGCGTCCGCAAGCACTC3' 5'CCCAGGATCCCGCTCAGAAGAAC3'	1163	94	1:15	56	1:30	72	1:45

T = tiempo

Construcción de mutantes *invA* no polares

Se obtuvo el gen *invA* de *S. gallinarum*, flanqueado por secuencias de *invE*, *invB* e *invC* utilizando los iniciadores EAB2, los cuales se construyeron tomando como patrón las secuencias de los genes *invA* de *S. gallinarum* (GenBank U43273) *invA* e *invB* de *S. typhimurium* (GenBank M90846, U08279) *invC* de *S. typhimurium* (GenBank U08279) e *invE* de *S. enterica* (GenBank U43270) creando el sitio de corte de las enzimas de restricción *SstI* (**Figura 8**). El producto de la PCR se clonó en el vector pCRT7 NT-TOPO obteniendo el plásmido MFO1 con un peso de 6133 pb. El plásmido MFO1 se digirió con *SaII* (Gibco) y *SstI* (Gibco) el segmento *invEABC* se clonó en pBluescriptKS Ap^r digerido con *SaII* y *SstI* generando el plásmido MFO2 con un peso molecular de 6092 pb. Se amplificó el gen de resistencia a la kanamicina (Km^r) del plásmido pBSL46 con los iniciadores Km (Gibco) 5'GCT TCA CGC GTC CGC AAG CAC TC3' (*forward*) 5'CCC AGG ATC CCG CTC AGA AGA AC3' (*reverse*) creando los sitios de corte de las enzimas de restricción *MluI* y *BamHI* (**Figura 9**).

En la **figura 7** se esquematiza la construcción de las mutantes en *invA* no polares.

TEJIN
FALLA DE ORIGEN

// invF invG invE invA invB invC invI invJ spa //

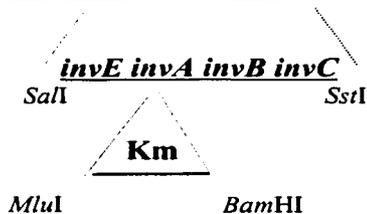


Figura 7. Mutagénesis con casete de *Km*. Se obtuvo el gen *invA* de *S. gallinarum*, flanqueada por secuencias de *invE*, *invB* e *invC* utilizando los iniciadores EAB2, creando el sitio de corte de la enzima de restricción *SstI*, se amplificó el gen de resistencia a la kanamicina del plásmido pBSL46, creando los sitios de corte de las enzimas de restricción *MluI* y *BamHI*. Después de digerir el gen *invA* con las enzimas *MluI* y *BamHI* se clonó el gen de la *Km* para interrumpir al gen *invA*.

El plásmido pMFO2 se digirió con *MluI* y *BamHI* (Gibco) y se ligó con el producto de la PCR del gen de *Km^r*, cortado también con *MluI* y *BamHI*; generando el plásmido MFO3 con un peso molecular de 5 830 pb. Se digirió pMFO3 con *SalI* y *SstI*, para purificar el fragmento *invEABC* interrumpido con el casete de *Km^r*. Una vez que tenga liberado el fragmento *invEABC* interrumpido por el casete de *Km^r* del pMFO3, ligarlo en pRE107 *SacB*, *Ap^r* digerido con *SalI* y *SstI*, con lo que se obtendrá el plásmido MFO4. Transformar el plásmido pMFO4 en *E. coli* SY327 λ pir y conjugar con las cepas silvestres de *S.gallinarum* para llevar a cabo recombinación homóloga y por lo tanto realizar la mutación no polar. Seleccionar cepas mutantes, plaqueando en medios selectivos adicionados con kanamicina, ampicilina y sacarosa (Bioxon) al 15% según se requiera.

COPIA
FANNA DE ORIGEN

GTGGAGATT **ACTCTGATG** GATAGCCAGT TATGGCTACC AACGTCGACT GGTGGTGTCTG *SalI*
GATTTTATTG ACGGTTCCGCT ATTAACCGAT ATTGACGCCGA ATGACGCCAG TTGTTCGCCG
CTGGAGTTTG GCGAGCTTTT ACGAGCCGCT ACACAACCTA AAATGTTGCC CTCCGCTGAC *S. enterica*
CTACTGTTTG TGAGTACATT GTTGTCCGAT TCGTTTACCA **AAGCOTTTAA** **TGCCGAGGAG**
TCGTCTGGGT TACTCCTGAT GCTTTCGGTA TTGCAACAGC CACATGAACT GGATTCGCGT
TTAGCCGATA TTATAGGTTT GAATGCGTTA TTGCTTAGTC ATAAAGAACA TGCAATCCTT
TTGCAGATAT TTTATCAAGT ATGTAAGGCC ATACCTTCTT CACTCTTTTA TGAAGAATAT
TGGCAGGAAG AATTTGTTAA GGCGTTACGT AGTATGACTG **ATATTGCCTA** **CAAGCATGAA** *S. typhimurium*
ATGGCAGAAC **AGCGTCGTAC** **TATTGAAAAG** **CTGTCCTAAT** **TTAATATTAA** C CCT
ATAGTCTGTC **TTCTCTACT** TAACASTGCT GSTTTACGAC CTGAATTACT GATTCGTGTA
CTATGCTGA TGATCATTTT TATGTTCCGTC ATTCCATTAC CTACCTTACT GTTGTATTTC
AGAACTCTCA GTTTTCAAG GTTTCCTGGG STACTGTAA TTACCAGCT CTTTCGCTG
GCATTATCGA TCAATACCAG TCGTCTTATC TTGATGGAAG CCGATGCCGG TGAATATTATC
CCCACGTTCC GGCAATTCGT TATTGGGGAT AGCCTGCCGG TGGGTTTTGT TGCTTCTTC
ATTGTACCGG TGGTCCAGTT TATCGTTATT ACCAAAGGTT CAGA**ACCGGT** CCGCGAAGCT
CGCGCCCGAT TTTCTCTGGA TGGTATGCC GGTAAACAGA TGAATTGA TGCCGATTG
AAGCCCGGTA TTATTGATGC GGATGCCCGG CCGCAACCGC GAAGCGTACT GGAAAGGAA
AGCCAGCTTT AGGTTCCCT TGACCGTGGG ATGAAGTTTA TCAAAGGTGA CCGATTGCT
GGCATGATTA TTACTTTTGT GAACTTTATT GCGGGTATTT CCGTGGGGAT GACTCGCCAT
GGTATGGATT TGCTCTCCGC CCTGCTFACT TATACCATGC TGACCATTTG TGATGGTCTT
GTCCGCCAGA TCCCGCATT GTTGATTGCG ATTAGTGGCG GTTTTATCGT GACCCGCGTA
AATGGCGATA CCGATAATAT GGGCGGAAT ATCATGACCG AGGTGTGAA CAACCCATT
GTATTGGTTG TTACCGCTAT TTTGAGGATT TCAATGGGA CTTGCCGGG ATTCCGACTG

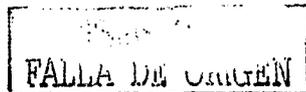
G

CCGGTTTTG TATTTTATC GGTGGTTTTA AGCCTACTCT **TATTTTAA** **ATTCCGTGAA** *EcoRI*
GCAAAACGTA GCGCCGCCAA ACCATAAAGC AGCAGCCSCT CAGTATTGAG
GAAAAAGAA GGTCTGCTGT AGGACTGATT GCGGATCTCG ATAAAGTCTC TACAGAGACC
GTACCCGTTC TATTACTTGT GCGCAAGAGC CCGCGTGAAG ATCTGGAAAA AGCTCAACTT
GCGGAGCGTC TACGTAGTCA GTTCTTTATT GATTATGGCG TGCCGCTGCC GGAAGTATTG
TTACGAGATG GCGAGGCGCT GGACGATAAC AGCATCGTAT TGTTGATTAA TGAGATCCGT
GTTGAACAAT TTACGGCTCA TTTTGATTG ATCCGAGTGG TAAATTTATC CGATGAACT
GTGTCCCTTT GTATTAAATC AACAAATCCAT CACCAAGGTA GCAGTCAAT TTTCTGGGTA
ACCATGAAG AGGGGGGAAA ACTCCGGGAG CTTGGCTATG TGTTCGGGAA CCGCTGTAT
GAGCTTACC ACTGTCTGGC GGTGACCGTG GCGGSCAACG TCAATGAATA TTTCCGATTA
CAGGAAACAA ACATATGCT GGACCAACTG GAAGCGAAAT TTCTGATTT ACTTAAGAA
GTGCTCAGC ATGCCACGCT ACAACGTATA TCTGAAGTTT TGACGCGTTT GTTAAAGCAA
CGTGTTCGG TCGGTAATAT GAAGTTAATT ATGGAAGCCG TCGCATTTGT GCGCCCAAGA
GAAAAAGAT TCAATTAAGT TGTGGAGCAT ATTGCTGGAG CAATGCGCGG TTATATTGT
CATAAATTCG CCAATGGCGG CBAATTACGA GCAGTAATGG TATCTGCTGA AGTTAGGAT
GTTATTCCCA AAGGGATCCG TCGAGCTCTT GCGAGTACT TCTCAGCTT TGACCCGAA *BamHI*
GCCCTCCGTA ATTTGATGGA TCTCATTACA CTTAAGTTG ATGATTTATT GATTGCACAT
AAAGATCTTG TCTCTTAC GTCTGTGAT GTCCGTCGAT TTATTAAGAA **AATGATTGAA**
GGTCGTTTTC **CGGATCTGGA** **GGTTTTATCT** **TTCCGGTGA** **TAGCAGATAG** **CAAGTCAGT**
AATGTTATAA **AAACAATATA** **AGGGCTTAAT** **T AAAG** **ATCTATGCAA** **CAATTGGATA**
TCGCTGAATT AGTTCGTTCC GCACCTGGAAG TAAGTGGTTG CGATCCCTCA TTAATTTGAG
GAATAGATAG CCAATCAACA ATTGTTCTGG ATTTATTTCG ATTGCCAAGT ATCTGTATCA
GCCATCAAGG CAGTATGTA TGGATCTGGG CCGCAATGGG TGCTGACAGC ATGGTGGTAT
TACAACAGCG ACTGTTATGAA ATCTTAATGA CCATAATGGA AGGATGCCAT TTGCCCCGG
GGCAATTAAT ACTGGGGGAG CAGAAATGGG AGCTAACGCT TAAAGCCTTA GTGCTCCGG
ATTTTTATC TGACGGTGA AAGTCTCTA CTGCCCTGAA TGGGTTTTAC AACTACTGG
AAGTTTTATC **TGGGTCGTA** **ATGAGATGAA** **AACACCTCGT** **TTACTGCAAT** **ATCTGGCCTA**
CCCAAAAAA **ATAACCGGCC** **CAATTATGA** **GGCGGAATG** **CAGGATGTTG** **CCATGGCGA**
ACTGTGTGAA ATCACGCCGT GGCTGGACC AAAACAGGT TGTTCACCT CCGCAGSTG
TTGGCTTACA CCGGGAACCG ACCGTGCTGA CGTTATCCG **AAGTCCAGG** **GGCTGACCG**

A
C

CGATGCTG'G CTTATCCCA CTGGACGTG GTTATCGGG TGGGTTGGAT ACTCGGTATT *SstI*
AGGCGCGGTG TTGGATCCGA CAGGAAAAT CGTTAGCGT TTTACCCCTG AAGT

Figura 8. Fragmento *invEABC*. Se muestra la secuencia de ADN que incluye los genes *invEABC*. En el GenBank no se encuentra registrada la secuencia completa de *S.gallinarum* (letra gris) por lo que se hizo uso de las secuencia de *S. typhimurium* (letra negra) y *S. enterica* (letra normal) para poder completar el gen *invE* y el operón *invABC*. En color azul se muestran la secuencia de los iniciadores, en morado los sitios de corte de las enzimas de

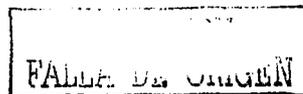


restricción, se indica si se creó el sitio de corte; en verde codones de inicio, en rojo codones de término y en amarillo sitio de unión a ribosomas.

G T

CGATAAGCTA	GCTTCACGCT	GCCGCAAGCA	CTCAGGGCGC	AAGGGCTGCT	AAAGGAAGCG	MluI
GAACACGTA	AAAGCCAGTC	CGCAGAAACG	GTGCTGACCC	CGGATGAATG	TCAGCTACTG	
GGCTATCTGG	ACAAGGGAAA	ACGCAAGCGC	AAAGAGAAAG	CAGGTAGCTT	GCAGTGGGCT	
TACATGGCCA	TAGCTAGACT	GGCGGT'TTT	ATGGACAGCA	AGCGAACCGG	AATTGCCAGC	
TGGGGCGCCC	TCTGGTAAGG	TTGGGAAGCC	CTGCAAAGTA	AACTGGATGG	CTTTCTTGCC	
GCCAAGGATC	TGATGGCGCA	GGGGATCAAG	ATCT	A	GAGACAGGAT	GAGGATCGTT
TCGCATGATT	GAACAAGATG	GATTGCACCC	AGGTTCTCCG	GCCGCTTGGG	TGGAGAGGCT	BglIII-Bcl
ATTCCGGCTAT	GACTGGGCAC	AACAGACAAT	CGGCTGCTCT	GATGCCGGCT	TGTTCCGGCT	
CTCAGCGCAG	GGCGCCCGG	TTCTTTTGT	CAAGACCGAC	CTGTCCGGTG	CCCTGAATGA	
ACTCCAAGAC	GAGGCAGCGC	GGCTATCGTG	GCTGGCCACG	ACGGGGCGTT	CTTGCCGAGC	
TGTGCTCGAC	CTTGTCACTG	AAGCGGGAAG	GGACTGGCTG	CTATTTGGCG	AAGTGCCTGG	
CGAGATCTC	GTTGCTCTCC	ACCTTGCTCC	TGCCGAGAAA	GTATCCATCA	TGGCTGATCC	
AATCGGGCGG	CTGCATCGTA	TTGATCCGGC	TACCTGCCCA	TTCGACCACC	AAGCGAACA	
TCCGATCGAG	CGAGCACGTC	CTCGGATGGA	AGCCGGTCTT	GTCCGATGCC	ATGATCTGGA	
CGAAGAGCAT	CAGGGGCTCG	CGCCAGCCGA	ACTGTTCGCC	AGGC1CAAGG	CGCGGATGCC	
CGACGGCGAG	GATCTCGTCC	TGACCCATGG	CGATGCCTGC	TTGCCGAATA	TCATGTTGGA	
AAATGGCCCG	TTTTCTGGAT	TCATCGACTG	TGGCCGGCTG	GGTGTGGGGG	ACCGCTATCA	
GGACATAGCG	TTGGCTACCC	GTGATAATGC	TGAAGAGCTT	GGCGGCCGAT	GGGCTGACCG	
CTTCCTCGTG	CTTTACGGTA	TCGCCGCTCC	CGATTCCGAG	CGCATCGCCT	TCTATCGCCT	
TC						
TCTTAGCGAG	TTCTTCTGAG	CGGGACTCTG	GGGTTCGAAA	TGACCGACCA	AGCGACGCCC	BamHI
AACCTGCCAT	ACCGGATTTT	CGATTCCACC	GCCGCCCTTC	ATGAAAGTTA	GGGCTTCGGA	AsuII
ATCGTTTTCC	GGGACGCCGG	CTGGATGATC	CTCCAGCGCG	GGGATCTCAT	GGTGGAGTTC	
TTCGCCACC	CCAAAAGAT	CTAGGTGAAG	ATCCTTTTTC	ATAATCTCAT	GACAAAATC	
CCTTAACGTG	AGTTTTCGTT	CCACTGAGCG	TCAGACCCCG	TAGAAAAGAT	CAAAAGATCT	
TCTTGAAGAT	CTTTTTTTCT	GCGCGTAATC	TGCTGCTTGC	AAACAAAATA	ACCACCGCTA	
CCAGCGGTGG	TTTGTTTGCC	GGATCAAGAG	CTACCAACTC	TTTTTCCGAA	GGTAACTGGC	
TTCAGCAGAG	CGCAGATACC	AAATACTGTC	CTTCTAGTGT	AGCCGTAGTT	AGGCCACCAC	
TTCAGAACT	CTGTAGCACC	GCCTACATAC	CTCGCTCTGC	TAATCTGTT	ACCAGTGGCT	
GCTGCCAGTG	GGGATAAGTC	GTGCTTACC	GGGTTGGACT	CAAGACGATA	GTTACC GGAT	
AAGCGCCAGC	GGTCCGGGCTG	AACGGGGGGT	TCGTGCACAC	AGCCCAGCTT	GGAGCGAAGC	
ACCTACACCG	AACTGAGATA	CCTACAGCGT	GAGCATTGAG	AAAGCCGCCAC	GGTTCGGGAA	
GGGAGAAGG	CGGACAGGTA	TCCGGTAAGC	GGCAGGGTCC	GAACAGGGA	CGCCACGAGG	
GAGCTTCCAG	GGGAAACGC	CTGGTATCTT	TATAGTCTCTG	TCGGGTTTCG	CCACCTCTGA	
CTTGAGCGTC	GATTTTTGTG	ATGCTCGTCA	GGGGGGCGGA	GCCTATGGAA	AAACGCCAGC	
AACCGGGCCT	TTTTTACGTT	CCTGGCCTTT	TGCTGGCCCT	TTGCTCAGAT	GTTCCTTCTC	
GCCTTATCCC	CTGATTCTGT	GGATAACCGT	ATTACCGCCT	TTGAGTGAGC	TGATACCGCT	
CGCCGCAGCC	GAACGACCGA	GCGCAGCGAG	TCAGTGAGCG	AGGAAGCCGA	AGAGCCGCCA	
ATACGCAAC	CGCCTCTCCC	CGCGCGTTGG	CCGATTCATT	AATGCAGCTG	GCACGACAGG	
TTTCCCGACT	GGAAAGCGGG	CAGTGAGCGC	AACGCAATTA	ATGTGAGTTA	GCTCACTCAT	
TAGGCACCCC	AGCCTTTTACA	CTTTATGCTT	CCGGCTCGTA	TGTTGTGTGG	AATTTGTGAGC	
GGATAACAAT	TTTACACAGG	AAACAGCTAT	GACCATGATT	ACGAATTCGA	GCTCCGTACC	
CGGGGATCCT	CTAGAGTCTGA	CCTGCAGGCA	TGCAAGCTTG	GCCTGGCCG	TCGTTTTTACA	
ACGTGCTGAC	TGGGAAAACC	CTGGCGTTAC	CCAACTTAAT	CGCCTTGCCG	CACATCCCCC	
TTTCCCGAGC	TGGCGTAATA	GCGAAGAGGC	CCGCACCGAT	CGCCTTCCC	AACAGTTCCG	
CAGCCTGAAT	GCGGAATGGC	G				

Figura 9. Casete de Km. Se muestra la secuencia de ADN que incluye el gen de resistencia a Km, localizado en el pBSL46. En color azul se muestran la secuencia de los iniciadores utilizados para realizar la PCR, en morado los sitios de corte de las enzimas de restricción, indicando si se creó el sitio de corte (superíndice); en verde codón de inicio y en rojo codón de término.



Preparación del inóculo para la cinética de crecimiento

Se utilizó caldo LB y LB 0.3M NaCl para determinar diferencias en la cinética de crecimiento y unidades formadoras de colonias (UFC) debidas a la osmolaridad del medio.

Los eventos siguientes se realizaron por duplicado:

El cultivo primario se obtuvo al inocular cinco colonias bacterianas en 10 ml de caldo LB 0.3 M o LB. Se incubaron a 37°C en agitación a 220 rpm (Lab-line Incubator-shaker Orbit, Melrose Park, USA) durante 16 h. Se cultivó en agar Mac Conkey (Merck) para confirmar la pureza de la cepa. 1 ml del cultivo primario se sembró en 9 ml de caldo LB 0.3 M o LB, obteniendo el cultivo secundario. Se incubó, durante tres horas, a 37°C con agitación 220 rpm. 100 µl del cultivo secundario se sembraron en 50 ml de caldo LB 0.3 M o LB.

Cinéticas de crecimiento

Las lecturas del inóculo se llevaron a cabo cada hora, obteniendo la densidad óptica (DO) en una filtro longitud de onda de 600 nm (A_{600}) en espectrofotómetro (Ultrospec 3000 Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra), se colocaron 2 ml de muestra y 2 ml de caldo LB 0.3 M o LB como blanco. Se graficó para obtener las curvas de crecimiento. Los pasos realizados se muestran en la **figura 10**.

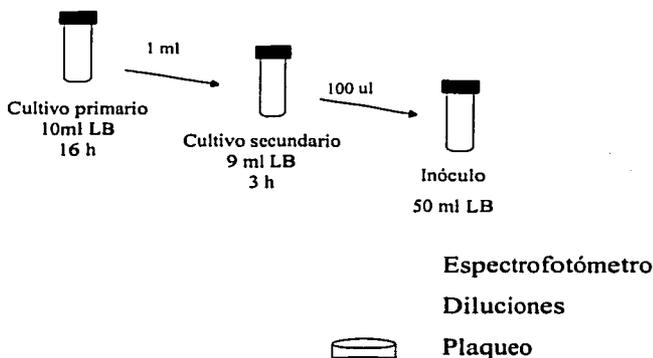


Figura 10. Estandarización del inóculo.

El inóculo se tituló al diluir 100 µl del cultivo en 900 µl de caldo LB 0.3 M o LB realizándose diluciones 1:100:

hora 0, 1, 2 y 3 : 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}
hora 4 : 10^{-1} - 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}
hora 5 : 10^{-1} - 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7}
hora 6, 7 y 8 : 10^{-1} - 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8}

hora 9 a la hora 12 : 10^{-1} - 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8}

Se inocularon 100 μ l de las diluciones indicadas, en **negritas**, en cajas de agar LB.

Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 horas (New Brunswick Scientific Edison N.J., USA G24), para hacer el conteo de las UFC por ml.

Caracterización parcial de la patogenicidad de cepas de *S. gallinarum* en embrión de pollo

Se inocularon embriones de pollo ALPES-II (libres de síndrome de baja postura, leucosis linfoide, bronquitis infecciosa, Newcastle, influenza aviar, *Mycoplasma synoviae*, *M. gallisepticum*, *S. gallinarum*, *S. pullorum*) de 8 días de edad, vía saco vitelino, con una dosis de 0.1 ml de 1×10^5 UFC/ml del cultivo bacteriano de 6 horas, de cada una de las cepas de *S. gallinarum*. Los embriones se sacrificaron 40 h postinoculación, se abrieron en condiciones estériles por cámara de aire. Se sembraron 20 μ l de vitelio en agar sangre (Merck) y verde brillante (Merck). Con las cepas aisladas se realizaron pruebas bioquímicas (MicroScan Dade Behring, Sacramento CA, USA; BBL Crystal Identification Systems Enteric/Nonfermenter ID Kit Becton Dickinson, Maryland, USA), antibiograma (sensidiscos Becton Dickinson; Oxoid, Hampshire, Inglaterra; BBL y MicroScan Dade Behring); así como prueba de aglutinación en placa, con suero poli A-I-Vi (Difco). Estos pasos se realizaron por triplicado. Las cepas recuperadas se conservaron a -70°C.

Preparación del inóculo para infectar las líneas celulares

Se crecieron cinco colonias bacterianas en 2.5 ml de caldo LB 0.3M NaCl durante 16 h en agitación, alcanzando $A_{600} = 1.660$. 150 μ l del cultivo primario se diluyeron en 2.5 ml de LB 0.3M NaCl, $A_{600} = 0.180$. El cultivo bacteriano diluido se incubó a 37°C 3 h en agitación. La concentración aproximada en este punto fue de 1.6×10^9 UFC/ml. Se prepararon diluciones del cultivo bacteriano y se plaquearon en agar LB para hacer el conteo de las UFC.

Ensayo de invasión en células BAT

El ensayo se realizó en placas para cultivo celular de 24 pozos (Costar, NY, USA) depositando 2×10^5 (Hemocitómetro Neubauer Boeco, Alemania) células BAT (células abdominales tumorales de periquito australiano, donadas por el Dr. Phil Lukert, Universidad de Georgia, Athens) por pozo. Se aforó a 1 ml con EMEM (Gibco, NY, USA) complementado con 5% de suero fetal bovino (FCS) (Gibco), 5% de suero fetal de pollo (KS) (Gibco), 2mM L-glutamina 100X (Gibco) y 0.1 mM de aminoácidos (aa) (Gibco). Se incubó a 37°C en 5% de CO₂ (incubadora nuairUS auto flow CO₂ water-jacketed, Plymouth, MN, USA) a las 16 h se obtuvo una confluencia del 90%. El cultivo celular se infectó con una MOI 80:1 y se incubó 2 h a 37°C. Se lavó tres veces con PBS y se incubó 1 h con 1 ml de EMEM complementado conteniendo 200 μ g/ml de Gm (Gentayet 100, Brovel, México). Se lavó con PBS, las células se lisaron con 500 μ l de deoxicolato sódico (Sigma) al 0.1% en PBS y se resuspendieron pipeteando. Se realizaron diluciones 1:100 y se plaquearon 100 μ l en agar LB para cuantificar UFC/ml. Los pasos realizados se resumen en la figura 11.

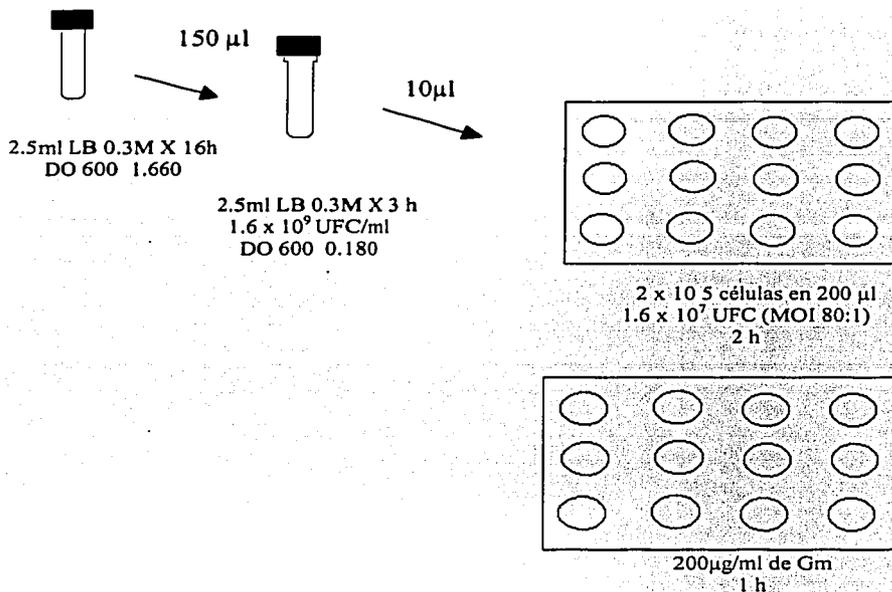


Figura 11. Ensayo de invasión en cultivo celulares.

Ensayo de invasión en células HeLa

Se depositaron 2×10^5 células HeLa en placas para cultivo celular de 24 pozos. Se aforó a 1 ml con EMEM complementado con 10% FCS, 2mM L-glutamina y 0.1 mM aa y se incubó a 37°C en 5% de CO₂, obteniendo una confluencia del 90% a las 16 h. El cultivo celular se infectó una MOI 80:1. Se incubó 2 h a 37°C y se lavó. Se incubó con 1 ml de EMEM complementado conteniendo 200 µg/ml de Gm 1 h, se lisó con 500 µl de tritón X-100 (USB) al 1%. Se plaqueron diluciones (Figura 11).

Ensayo de fagocitosis en macrófagos J774

Se depositaron 2×10^5 macrófagos J774 en placas para cultivo celular de 24 pozos. Se aforó a 1 ml con RPMI (Gibco) complementado con 10% FCS, 2mM L-glutamina, 0.1 mM de aa, piruvato de sodio 1mM y bicarbonato de sodio (Sigma) 1.8 g/lt. Se incubó a 37°C en 5% de CO₂, a las 16 h se obtuvo una confluencia del 80%. El cultivo celular se infectó con una MOI 80:1 y se incubó 2h a 37°C después de lavar se incubó 1 h con 1 ml de RPMI complementado conteniendo 200 µg/ml de Gm, se lisó con 500 µl de tritón X-100 al 1% y se plaqueron diluciones (Figura 11).

Tinción con azul de tripano

Se colocó un cubreobjetos redondo (12 mm) (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA, USA) en cada pozo de la placa para cultivo celular. Se depositaron 2×10^5 macrófagos J774 por pozo, se aforó a 1 ml con RPMI complementado, se incubó, infectó y lavó con las constantes mencionadas en el ensayo de fagocitosis. Se colocaron 250 μ l de azul de tripano (Sigma) al 0.4% más 250 μ l de PBS, se dejó reposar 5 min y se retiró perfectamente el colorante. Se adicionaron 500 μ l de metanol (Merck) al 100% a -20°C se dejó reposar 3 min y se determinó el porcentaje de células no viables (azules). Se contaron 100 células en total, el experimento se realizó por duplicado.

Tinción de cromatina con yoduro de propidio

Se colocó un cubreobjetos redondo (12 mm) en cada pozo de la placa para cultivo celular. Se depositaron 2×10^5 macrófagos J774 por pozo, se aforó a 1 ml con RPMI complementado, se incubó, infectó y lavó con las constantes mencionadas en el ensayo de fagocitosis. Las células se fijaron con paraformaldehído (Electron Microscopy Sciences) al 4% en PBS durante un mínimo de 40 min a 4°C y se lavaron tres veces con PBS. Las células se permeabilizaron con tritón al 1% en PBS durante 5 min y se hicieron tres lavados. Para visualizar la condensación de la cromatina, se agregó 0.5 ml de yoduro de propidio (Sigma) (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en PBS pH 7.4 adicionado con 100-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNasa (Sigma) y se mantuvo a temperatura ambiente y en la oscuridad por 45 min, se lavó. La preparación se montó y observó en el microscopio de fluorescencia (Microstar IV Leika, Alemania) para hacer el conteo de núcleos que presentaban condensación de la cromatina. Se contaron 20 células de cinco campos, para hacer el conteo total de cien células. El experimento se realizó por duplicado.

RESULTADOS

Detección del gen *invA* en cepas de *S. gallinarum*.

Se comprobó la presencia del gen *invA* en *S. gallinarum* cepa FVA1 aislada de brote de campo en la República Mexicana, utilizando los iniciadores EAB, el fragmento amplificado de 2573 pb abarca parte del gen *invE*, al gen *invA* e *invB* (Figura 12).

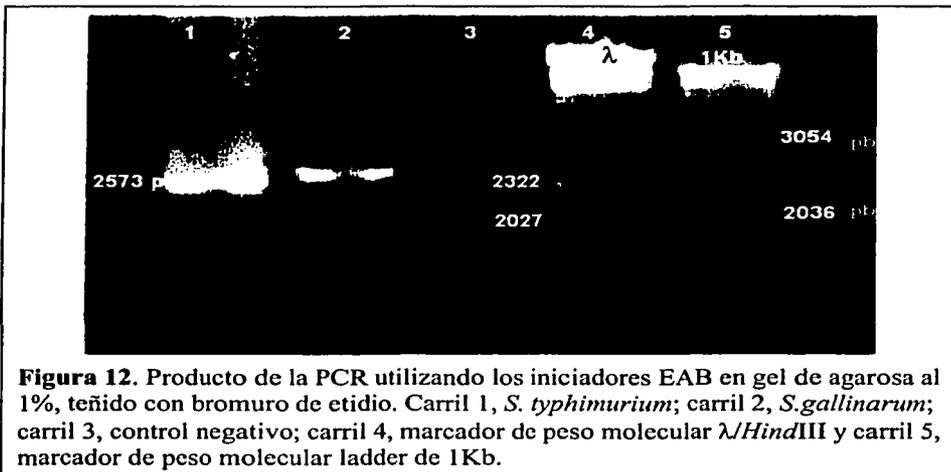


Figura 12. Producto de la PCR utilizando los iniciadores EAB en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Carril 1, *S. typhimurium*; carril 2, *S. gallinarum*; carril 3, control negativo; carril 4, marcador de peso molecular λ /*Hind*III y carril 5, marcador de peso molecular ladder de 1Kb.

El segmento obtenido por PCR de 2573 bp, el cual contiene los genes *invEAB*, presenta dos sitios de restricción para *Bam*HI, los cuales se utilizaron para verificar que el fragmento amplificado fuera el esperado (Figura 13). Después del corte se obtiene una banda de 2139 pb y otra de 439 pb.

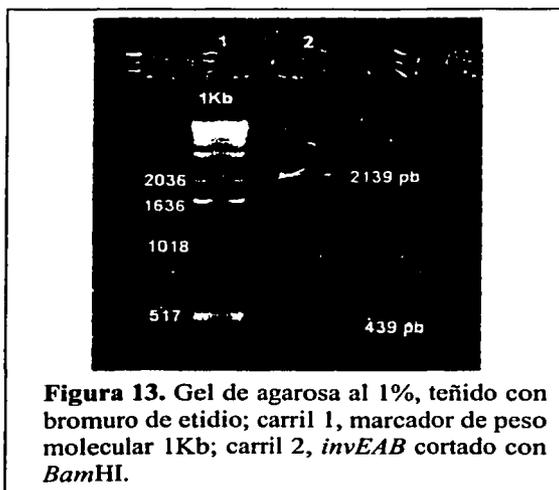


Figura 13. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio; carril 1, marcador de peso molecular 1Kb; carril 2, *invEAB* cortado con *Bam*HI.

Amplificación de la secuencia aledaña a *invA*

Con el propósito de generar una mutante de *S. gallinarum* cepa FVA1 en el gen *invA* por recombinación homóloga, el gen se amplificó junto con 543 y 659 pb de secuencia flanqueante a la izquierda y derecha, respectivamente, utilizando los iniciadores EAB2 que además producen el sitio de restricción para *SstI* requerido para la clonación en pBKS y pRE107. Este fragmento abarca parte del gen *invE*, *invA*, *invB* completos y parte de *invC*. Como se puede observar en la **figura 14**, el cambio de iniciadores resultó en una marcada inespecificidad de amplificación. En la parte superior se observa la banda deseada de 3261 pb.

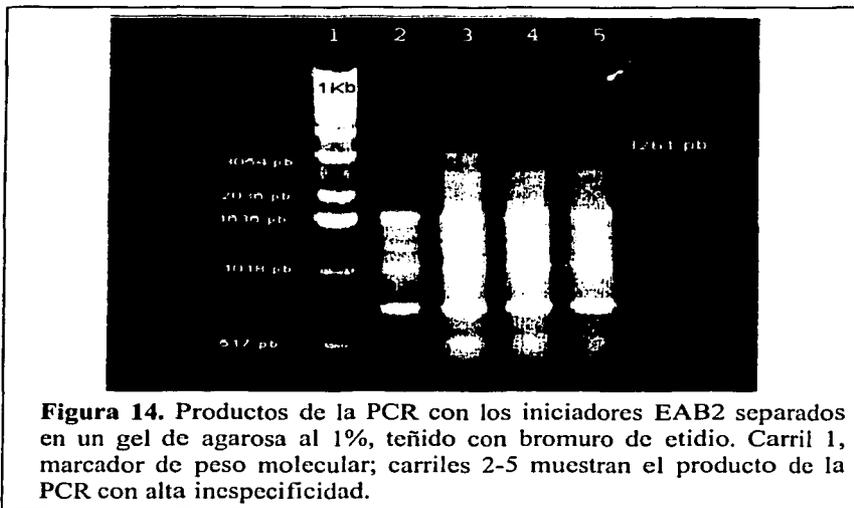


Figura 14. Productos de la PCR con los iniciadores EAB2 separados en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de peso molecular; carriles 2-5 muestran el producto de la PCR con alta inespecificidad.

Construcción de mutantes *invA* no polares.

La banda deseada de 3261 pb se cortó del gel y se purificó, con Qiaquick (Figura 15) y se clonó en el vector pCRT7 NT-TOPO (Figura 16) obteniendo el plásmido MFO1 con un peso de 6133 pb (Figura 19).

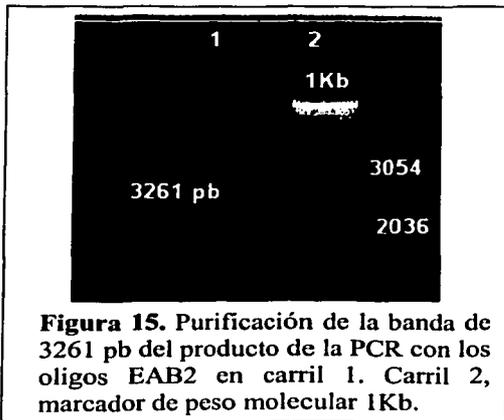


Figura 15. Purificación de la banda de 3261 pb del producto de la PCR con los oligos EAB2 en carril 1. Carril 2, marcador de peso molecular 1Kb.

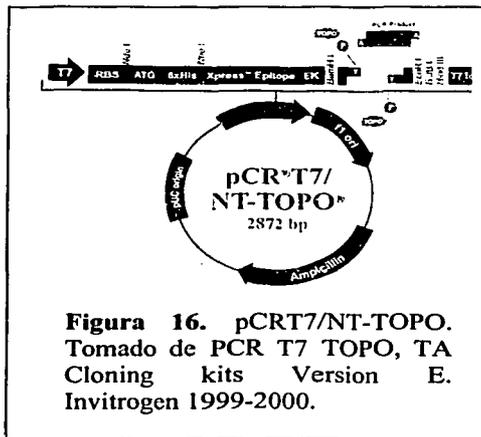


Figura 16. pCRT7/NT-TOPO. Tomado de PCR T7 TOPO, TA Cloning kits Version E. Invitrogen 1999-2000.

Se realizó análisis de restricción del pMFO1, digiriendo con *EcoRI*, *HindIII*, y *SstI* obteniendo un fragmento de 6133 pb que corresponde al plásmido linearizado (2872 pb del vector + 3261 pb del inserto) y con *BamHI* se obtuvieron fragmentos de 3012 pb, 2162 pb y 959 pb que corresponden a los pesos esperados como resultado de la clonación de *invE*, *invA*, *invB* y parte de *invC* en pCRT7/ NT-TOPO.

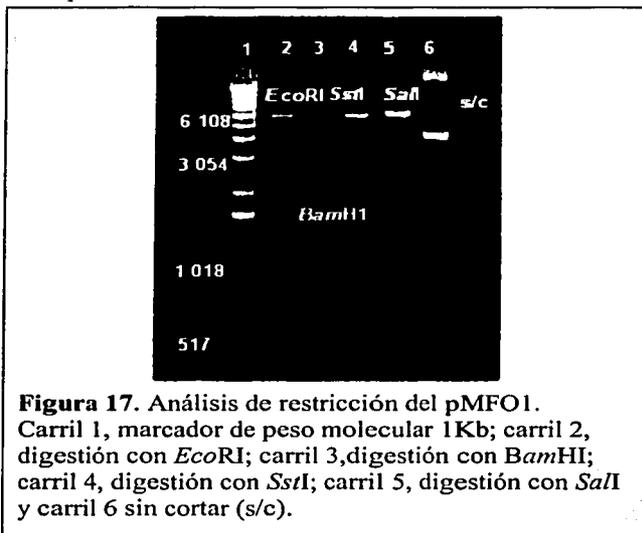


Figura 17. Análisis de restricción del pMFO1. Carril 1, marcador de peso molecular 1Kb; carril 2, digestión con *EcoRI*; carril 3, digestión con *BamHI*; carril 4, digestión con *SstI*; carril 5, digestión con *SalI* y carril 6 sin cortar (s/c).

Se liberó el fragmento *invEABC* del pMFO1 con las enzimas de restricción *SalI-SstI* corte utilizado a su vez para clonar en pBluescriptKS.

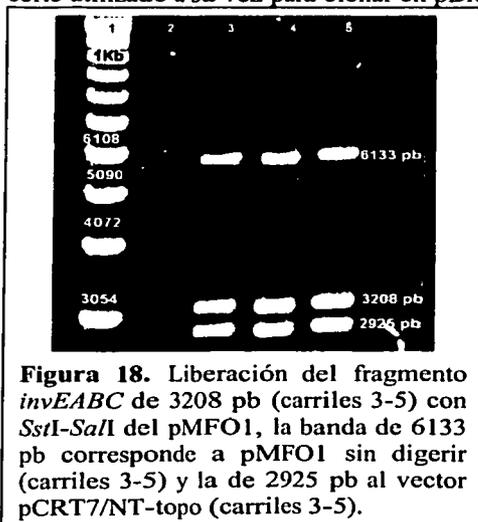


Figura 18. Liberación del fragmento *invEABC* de 3208 pb (carriles 3-5) con *SstI-SalI* del pMFO1, la banda de 6133 pb corresponde a pMFO1 sin digerir (carriles 3-5) y la de 2925 pb al vector pCRT7/NT-topo (carriles 3-5).

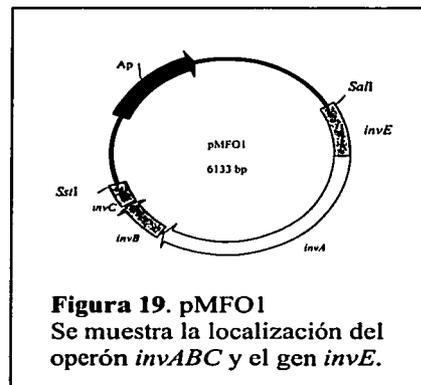


Figura 19. pMFO1 Se muestra la localización del operón *invABC* y el gen *invE*.



Se efectuó la digestión de pBKS con *Sall* y *SstI* para la clonación del segmento *invEABC* liberado de pMFO1.

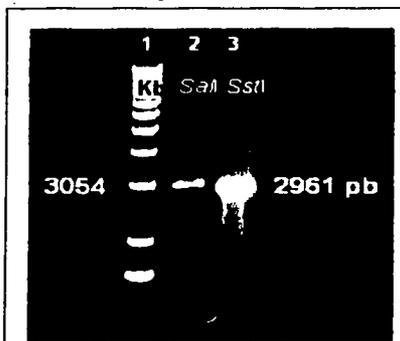


Figura 20. pBKS cortado con *Sall* (carril 2) y *SstI* (carril 3).

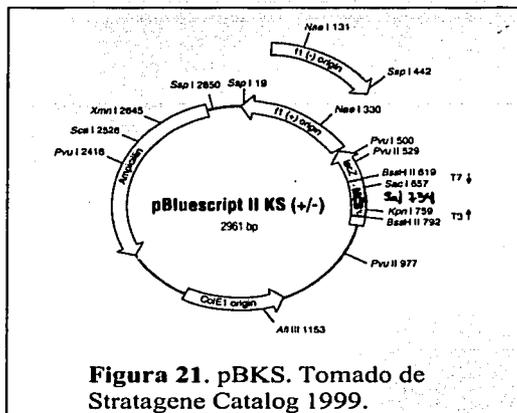


Figura 21. pBKS. Tomado de Stratagene Catalog 1999.

El segmento *invEABC*, cortado con *SstI-Sall*, del plásmido MFO1 se clonó en pBKS cortado con *SstI-Sall* obteniendo el plásmido MFO2. Para comprobar que se trataba del plásmido deseado se realizó análisis de restricción utilizando las enzimas *SstI*, *Sall*, *BamHI* y *MluI*. Se obtuvo en todos los casos el tamaño esperado de 6092 pb y al cortar con *SstI-Sall* un fragmento de 2884 pb y otro de 3208 pb, que corresponden al pBKS cortado con *SstI-Sall* y al segmento *invEABC* cortado con *SstI-Sall*.

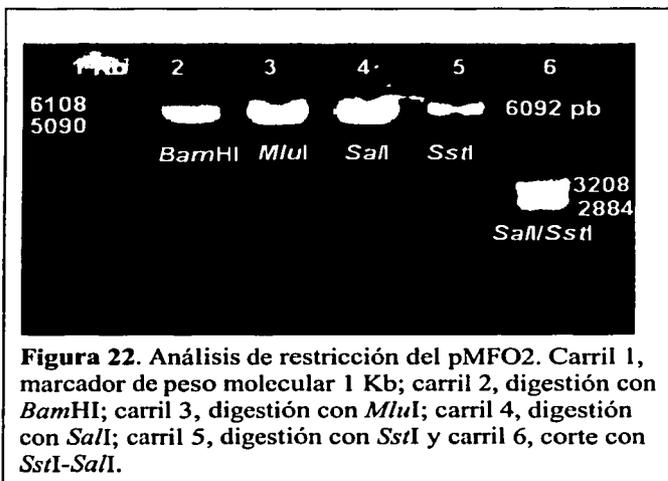


Figura 22. Análisis de restricción del pMFO2. Carril 1, marcador de peso molecular 1 Kb; carril 2, digestión con *BamHI*; carril 3, digestión con *MluI*; carril 4, digestión con *Sall*; carril 5, digestión con *SstI* y carril 6, corte con *SstI-Sall*.

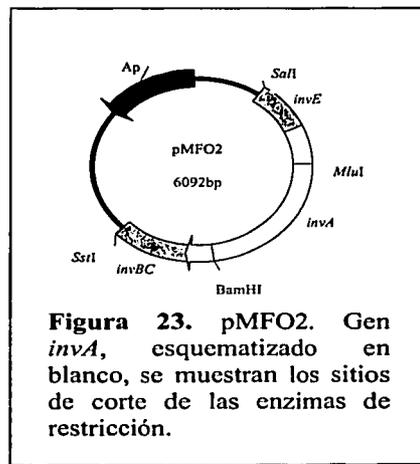


Figura 23. pMFO2. Gen *invA*, esquematizado en blanco, se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción.

Se amplificó al casete de kanamicina del plásmido pBSL46 con los iniciadores Km obteniendo un fragmento de 1163 pb.

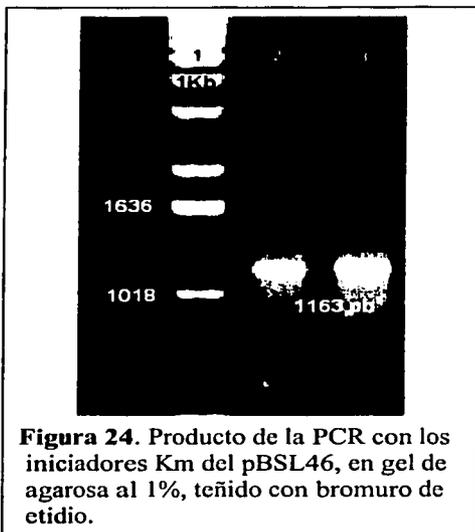


Figura 24. Producto de la PCR con los iniciadores Km del pBSL46, en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

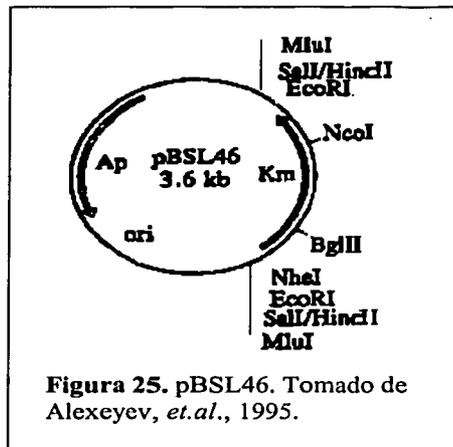


Figura 25. pBSL46. Tomado de Alexeyev, et al., 1995.

El pMFO2 se cortó con *MluI* y *BamHI* obteniendo un fragmento de 4683 pb, el producto de la PCR del casete de Km se cortó con las mismas enzimas y ambos cortes se ligaron, obteniendo el plásmido pMFO3 con un peso molecular de 5830 pb.

El pMFO3 se cortó con las enzimas de restricción *SstI-SalI* para liberar el fragmento *invEABC* y posteriormente clonarlo en pRE107 cortado con *SalI* y *SstI*. Los fragmentos obtenidos del corte de MFO3 con *SstI-SalI* son de 2884 pb y 2946 pb que corresponden a pBKS y al fragmento *inv EABC* interrumpido por el casete de Km.

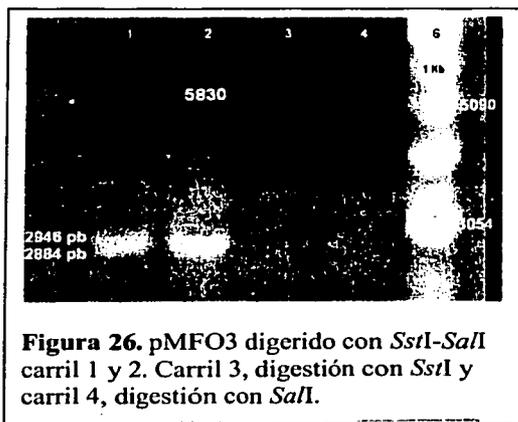


Figura 26. pMFO3 digerido con *SstI-SalI* carril 1 y 2. Carril 3, digestión con *SstI* y carril 4, digestión con *SalI*.

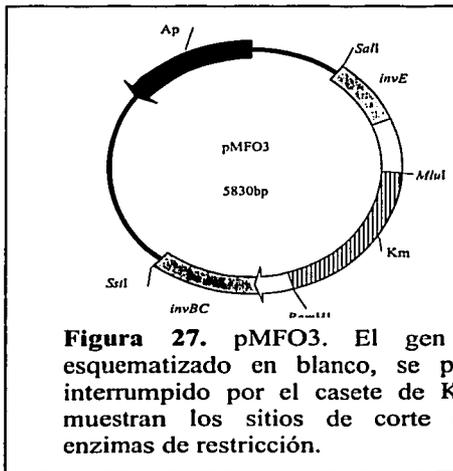
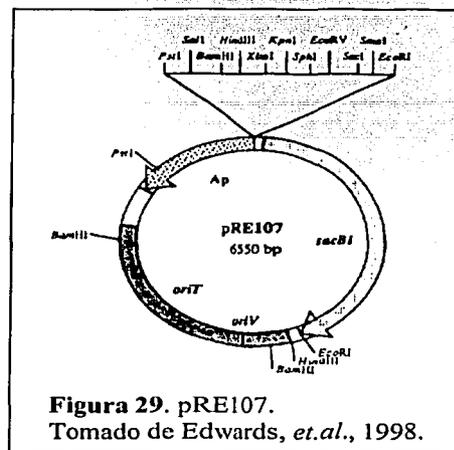
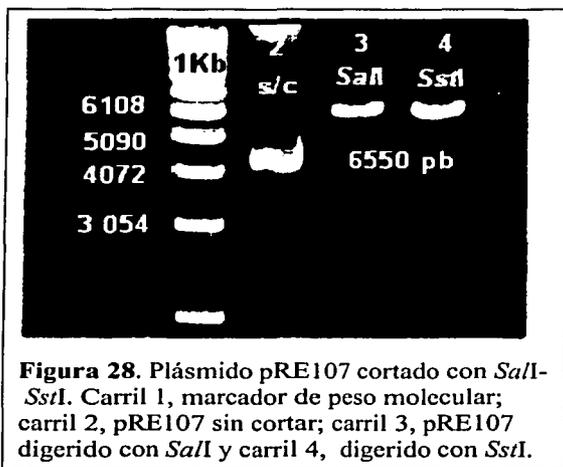


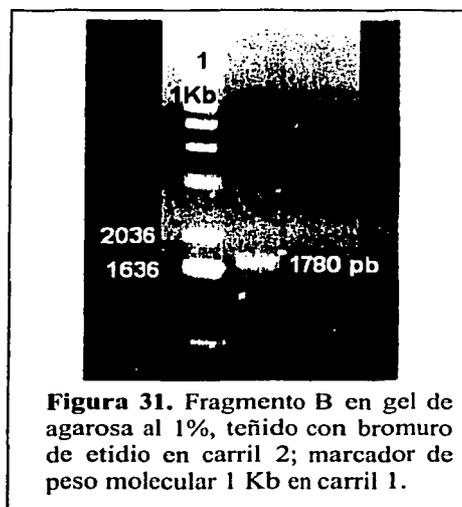
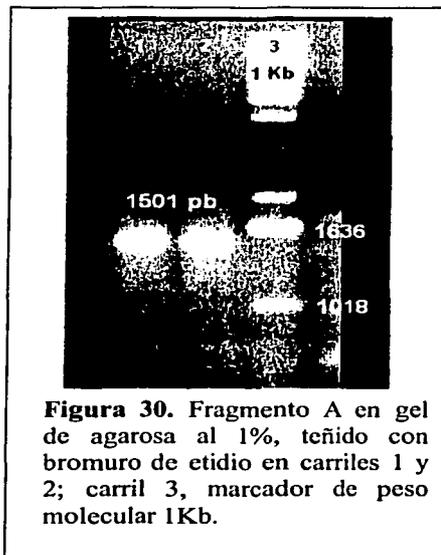
Figura 27. pMFO3. El gen *invA*, esquematizado en blanco, se presenta interrumpido por el casete de Km. Se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción.

RECIBO CON
FECHA DE ORIGEN

El plásmido pRE107 se cortó con *SalI* y *SstI* para comprobar los sitios de corte y confirmar su peso.



Se amplificó el fragmento *invEABC* utilizando los iniciadores EAB2 (*forward*)-fragmento A (*reverse*) y fragmento B (*forward*)-EAB2 (*reverse*) obteniendo los fragmentos que fueron llamados A y B respectivamente.



Con la finalidad de localizar el problema que se presentaba de bandas inespecíficas, se realizaron PCR combinando los iniciadores de la siguiente manera: EAB2 *forward*- EAB *reverse* y fragmento B *forward*-EAB *reverse* de esta manera no se presentaba inespecificidad en la PCR con lo que se concluye que el iniciador EAB2 *reverse* es el responsable de tal inespecificidad.

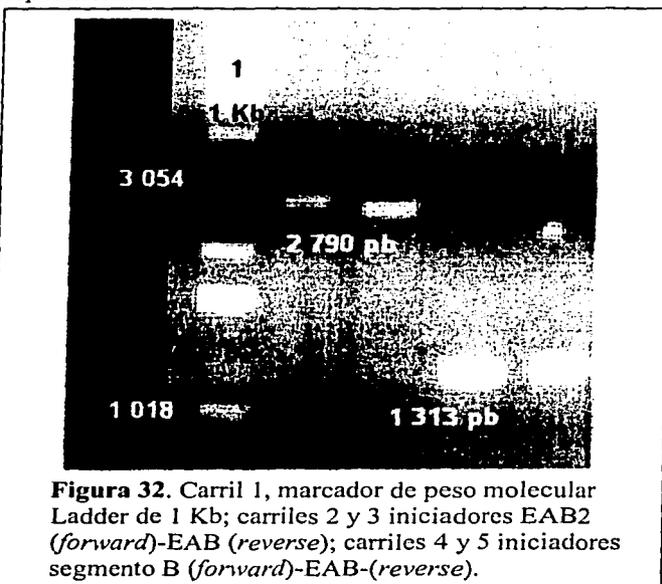


Figura 32. Carril 1, marcador de peso molecular Ladder de 1 Kb; carriles 2 y 3 iniciadores EAB2 (*forward*)-EAB (*reverse*); carriles 4 y 5 iniciadores segmento B (*forward*)-EAB-(*reverse*).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cinéticas de crecimiento

Para determinar el comportamiento en la fase de crecimiento de *S. gallinarum*, se realizaron cinéticas de crecimiento con las cepas U2, 415, 383 y 323, las dos primeras se probaron en LB y LB 0.3M NaCl, para determinar si el medio de cultivo influía en la misma, la cepa 323 se probó solo en LB 0.3M NaCl y la 383 en LB y a diferencia de las demás las siembras de cada hora se hicieron a partir del cultivo primario y no del inóculo. En la **tabla 5** se muestra la cuantificación de la UFC/ml a las 3, 5 y 8 h.

Los resultados obtenidos indican que el crecimiento es similar para todas las cepas independientemente de la molaridad del medio (**Figura 33**) a pesar de que la cepa U2 muestra una cinética retardada, comparada con las demás, lo que se manifiesta en mayor grado cuando se utiliza LB 0.3 M NaCl, en la **figura 34** se puede apreciar que la cinética de la cepa U2 cultivada en LB 0.3M alcanzó la fase de crecimiento logarítmico hasta las 8 h.

Tabla 5. Cuantificación de las UFC/ml durante la cinética de crecimiento de las cepas de *S. gallinarum* en medio LB o LB 0.3 M NaCl.

Cepa medio de cultivo	3 h	5 h	8 h
415 LB	200×10^5	18.8×10^7	10.2×10^8
415 LB 0.3 M NaCl	75×10^5	10×10^7	23×10^8
323 LB 0.3 M NaCl	25×10^5	3.15×10^7	27.6×10^8
383 LB	180×10^5	4.10×10^7	26×10^8
U2 LB 0.3 M	38×10^5	2.80×10^7	7.5×10^8
U2 LB	27×10^5	1.40×10^7	7.9×10^8

TEMA 001
FALLA DE ORIGEN

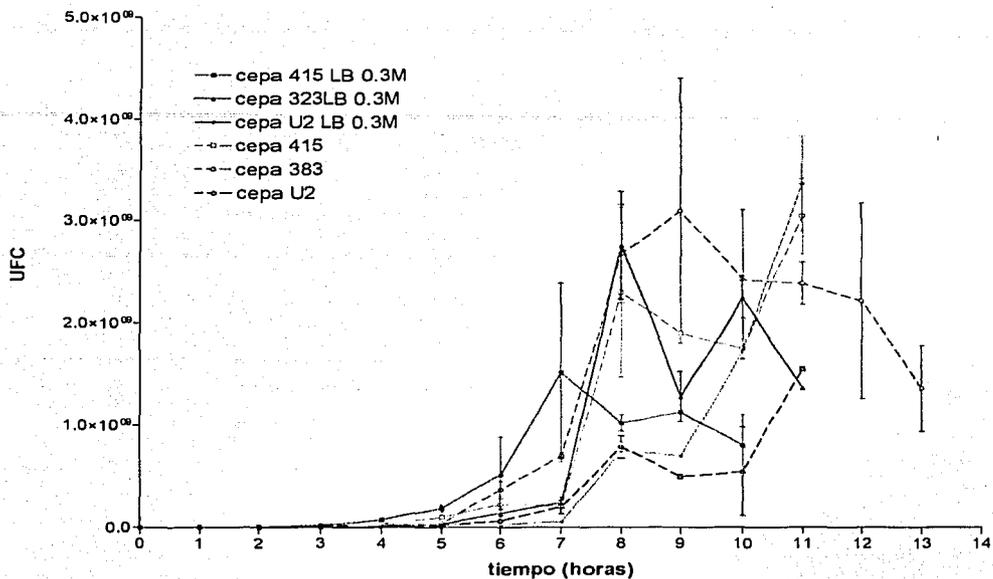


Figura 33. Curva de crecimiento de cepas de *S. gallinarum*. Como medio de cultivo, para el conteo de UFC, se utilizó LB y LB 0.3M NaCl. Los datos muestran la media y el error estándar, el experimento se realizó por duplicado.

Con los datos obtenidos en curva de crecimiento se realizó ecuación no lineal y los datos se analizaron por ANDEVA ($p < 0.05$) y prueba de Tukey (**Figura 34**) (Apéndice B.1), esta última revela que la cinética de crecimiento de la cepa 383 cultivada en LB es diferente a las demás ($p < 0.05$) (ver Apéndice B.1).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

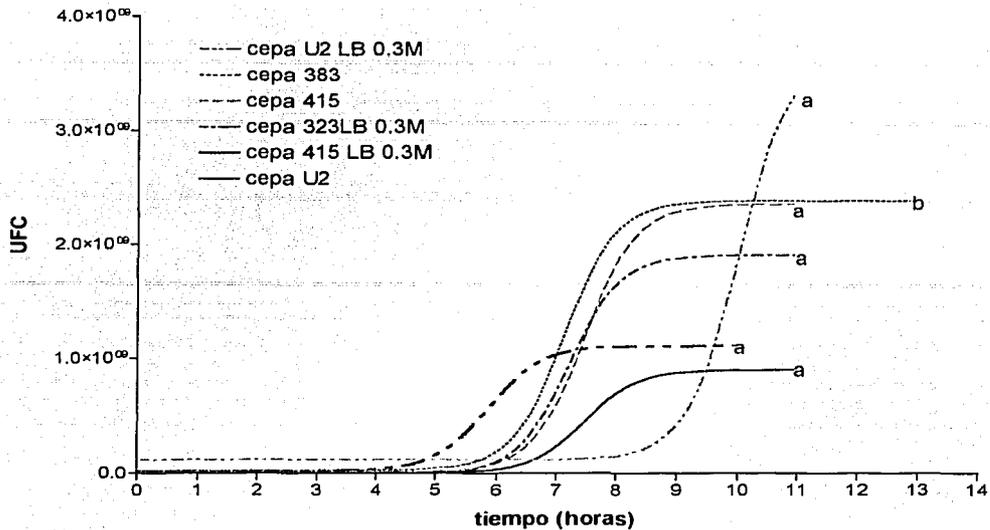


Figura 34. Curva de ecuación no-lineal de crecimiento exponencial de cepas de *S.gallinarum*. El comportamiento de la curva nos ayuda a determinar en que momento se incrementa logarítmicamente la población bacteriana. Curvas con diferente literal son significativamente diferentes.

Después de analizar estadísticamente los resultados se puede concluir que las cepas de *S.gallinarum* estudiadas, disparan su crecimiento logarítmico temprano a las 4-6 h, alcanzan su fase logarítmica tardía a las 6-8 h y a las 8 h se encuentra en fase estacionaria. Por otra parte, un medio de cultivo con mayor osmolaridad no afecta la cinética de crecimiento bacteriana pero si el hecho de subcultivar en medio de cultivo fresco, como lo indica la prueba de Tukey al determinar que la cinética de crecimiento de la cepa 383 de *S.gallinarum* es significativamente diferente (**Figura 34**) (Apéndice B.1). A una DO600 de 500 (aproximadamente 6 h) se tiene en promedio 2.5×10^8 UFC/ml.

Caracterización parcial de la patogenicidad de cepas de *S. gallinarum* en embrión de pollo

Con la finalidad de recuperar la patogenicidad de la cepas de *Salmonella*, se inocularon embriones de pollo ALPES-II de 8 días de edad, vía saco vitelino, con una dosis de 0.1 ml de 1×10^5 UFC/ml del cultivo bacteriano de cada una de las cepas, en la **figura 35** se muestra un embrión de pollo sin inocular y en la **figura 36** el embrión 40 h postinoculación.

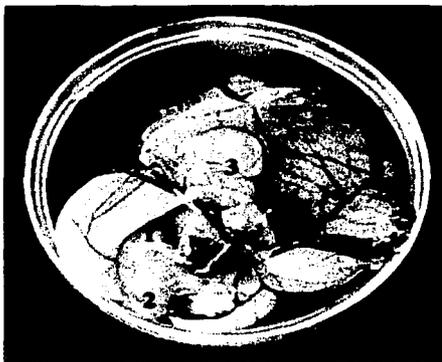


FIGURA 35
Embrión de pollo ALPES II de 8 días de edad sin inocular. Embrión (1), líquido amniótico (2) y saco vitelino (3).

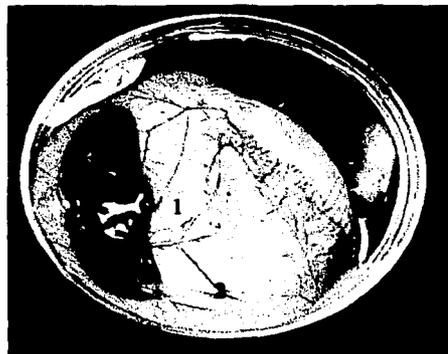


Figura 36
Embrión de pollo ALPES II de 10 días de edad inoculado con *S. gallinarum* FVA1. Embrión hemorrágico y congestionado (1); líquido amniótico turbio (2) y saco vitelino (3).

Los embriones inoculados presentaban congestión, hemorragias, líquido amniótico turbio, licuefacción de la yema, enanismo y olor putrefacto lo que se traduce como daño ocasionado por la infección de *Salmonella*. En todos los casos se logró recuperar a la cepa inoculada en aislamiento en cultivo puro. Por otra parte el daño visible era mayor en los embriones inoculados con las cepas FVA1 y U2, reportadas en trabajos anteriores como las más patógenas (Vázquez, 1995; Urquiza 1995), lo que influyó en la elección de la cepa FVA1 para los estudios de invasión, fagocitosis y biología molecular.

Con las cepas de *S. gallinarum* FVA1, U2, 323, 591, 415, 383, 347, 285, 9R y 9184 ATCC aisladas, después de inocular los embriones de pollo, se realizaron pruebas bioquímicas utilizando tanto sistemas de identificación comerciales como pruebas bioquímicas elaboradas en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM. Todas las cepas de *S. gallinarum* fueron oxidasas, indol, motilidad, urea, rafinosa, sacarosa, ONPG (orto-nitrofenil-D-galactopiranosido) y descarboxilación de la ornitina

(ODC) negativas; producción de ácido sulfhídrico, maltosa, ramnosa, descarboxilación de la lisina (LDC) positivas. *Salmonella typhimurium* presenta el mismo comportamiento que *S. gallinarum* en las pruebas de oxidasa, producción de ácido sulfhídrico, indol, urea, ramnosa, rafinosa, sacarosa, ONPG y LDC. En la **tabla 6** se muestra el comportamiento metabólico de *S. typhimurium* así como las variantes de *S. gallinarum*.

Tabla 6. Pruebas bioquímicas de las cepas de *Salmonella*.

cepa	TSI	motilidad	citrato	maltosa	dulcitol	melobiosa	arabinosa	sorbitol	inositol	ODC
<i>S. typhimurium</i>	4,2,4,2	+	+	-	-	+	+	+	+	+
FVA1	2,2,4,2	-	V	+	+	-	+	+	-	-
U2	3,3,4,2	-	-	+	+	-	-	-	-	-
323	3,3,4,2	-	-	+	+	-	+	-	-	-
383	3,4,4,4	-	-	+	+	+	+	-	-	-
347	2,4,4,4	-	+	+	V	+	+	+	+	-
415	4,2,4,2	-	V	+	-	+	+	+	-	-
285	4,4,2,2	-	V	+	V	+	+	+	-	-
591	3,4,2,2	-	V	+	V	+	+	+	-	-
9R	2,4,4,4	-	-	+	+	-	-	+	-	-
9184	3,4,4,4	-	-	+	V	+	-	+	-	-

+ = positivo; - = negativo; V = variable, 2-3-4 = reacciones de TSI (triple azúcar hierro)

Analizando el comportamiento metabólico de las diez cepas *S. gallinarum* aisladas de brotes campo se puede observar que el uso de citrato como fuente de carbono es variable en 4 de 10 cepas (4/10), positivo solamente en 2/10 y negativo en 4/10; 6/10 utilizan a la arabinosa y al sorbitol mientras que 4/10 no utilizan dichos carbohidratos, el 50% de las cepas utilizan la melobiosa y solamente una de las cepas utiliza al sorbitol.

Quinn, *et. al.*, (1994) y Cowan (1995) identifican a *S. gallinarum* y *S. pullorum* con las siguientes pruebas bioquímicas:

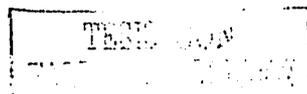
Tabla 7. Identificación de *S. gallinarum* y *S. pullorum* por pruebas bioquímicas.

	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. pullorum</i>
ODC	- ¹ / ₋ ²	+ ¹ / ₊ ²
Dulcitol	+ ¹ / ₊ ²	- ¹ / ₋ ²
Maltosa	+ ¹ / _d ²	- ¹ / ₋ ²
Ramnosa	- ¹ / _d ²	+ ¹ / _d ²

+ = positivo - = negativo d = diferentes tipos

¹Quinn/²Cowan

En el presente trabajo, *S. gallinarum* no descarboxila a la ornitina (10/10), la utilización dulcitol es variable 4/10, positivo 5/10 y negativo 1/10; el 100% de las cepas utilizan a la maltosa y a la ramnosa.



Con las cepas aisladas también se realizó prueba de susceptibilidad antimicrobiana por el método de Kirby-Bauer así como por métodos comerciales (MicroScan Dade y BBL), encontrando que todas las cepas de *S. gallinarum* incluyendo también a *S. typhimurium* son sensibles a gentamicina, polimixina B, cloramfenicol, ampicilina, neomicina y kanamicina. El comportamiento de las cepas a la estreptomycinina y al ácido nalidíxico se presenta en la **tabla 8**.

Tabla 8. Susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *Salmonella*.

antibiótico	FVA1	U2	323	591	415	383	347	285	9R	9184	<i>S.typhimurium</i>
estreptomycinina	I	R	R	R	R	R	S	R	S	R	I
ac. nalidíxico	I	R	R	S	S	I	I	S	I	S	S

S = susceptible; R = resistente; I = intermedia

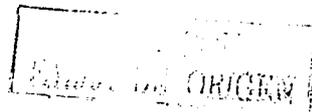
La estreptomycinina es un antibiótico que pertenece al grupo de los aminoglucósidos y actúa inhibiendo síntesis de proteínas, mientras que el ácido nalidíxico es un quimioterapéutico que pertenece al grupo de las quinolonas y al actuar sobre las girasas inhibe el crecimiento bacteriano. Dos de las diez cepas (2/10) presentaron resistencia al ácido nalidíxico, mientras que 7/10 la presentaron a la estreptomycinina.

Cultivos celulares

Un modelo conveniente para el estudio cuantitativo de la interacción entre *Salmonella* y células eucarióticas emplea cultivos celulares. Para conocer el porcentaje de invasión de la cepa silvestre FVA1 de *S. gallinarum* se utilizaron células BAT y células HeLa (**Figuras 37 y 38**); macrófagos J774 para conocer el porcentaje de fagocitosis (**Figuras 39**), muerte celular (**Figuras 48 y 49**) y detección de la condensación de la cromatina postinfección (**Figuras 50 y 51**).

En la **figura 37** se muestra el porcentaje de invasión de *S. gallinarum* cepa FVA1 y *S.typhimurium* cepa 938, en células BAT, el cual corresponde al $0.07\% \pm 0.03$ y 1.02 ± 0.10 , respectivamente. Por otra parte, se determinó el porcentaje de invasión de las cepas en células HeLa, observándose un porcentaje de invasión del $0.89\% \pm 0.32$ en el caso *S.gallinarum* FVA1 y del $5.69\% \pm 0.89$ si la infección se realizaba con *S. typhimurium* 938 (**Figura 38**). En todos los ensayos de invasión se utilizó *E. coli* DH5 α como control negativo. Los cambios morfológicos en el monoestrato de los cultivos celulares ocasionados por la infección de las cepas de *Salmonella*, analizados en un microscopio invertido, se presentan en las **figuras 43 a la 46**.

Con la finalidad de determinar si el número de bacterias que invaden las células epiteliales se incrementan con el tiempo, se ensayaron tiempos de invasión de 2, 4 y 6 horas. En células BAT, infectadas con *S. gallinarum* se alcanzaron porcentajes de invasión de 0.029, 0.06 y 0.14 a las 2, 4 y 6 horas, respectivamente (**Figura 40**).



En células HeLa el ensayo se realizó tanto con *S. gallinarum* FVA1 como con *S. typhimurium* 938 obteniendo porcentajes de invasión del 1.35, 2.58, 0.33 y del 5.87, 11.37, 1.46 en *S. typhimurium* a las 2, 4 y 6 horas, respectivamente (Figuras 41). La caída en el porcentaje de invasión que se presenta en las células HeLa a las 6 h, es debida a que el daño celular llega a ser tan severo que produce el desprendimiento del monoestrato y al realizar el lavado del cultivo celular se pierden las bacterias junto con las células. En la tabla 9 se comparan porcentajes de invasión reportados en trabajos previos con los alcanzados en el presente trabajo.

Tabla 9. Porcentaje de invasión reportado con infección de *S. gallinarum* y *S. typhimurium* en diferentes cultivos celulares.

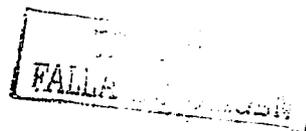
	<i>S. gallinarum</i> %	<i>S. typhimurium</i> %	
BAT	0.07 +/- 0.03	1.02 +/- 0.10	Figuroa 2002
	0.03 +/- 0.003	2.65 +/- 0.44	Henderson 1999
HeLa	0.89 +/- 0.32	5.69 +/- 0.89	Figuroa 2002
VERO	0.02	0.42	Barrow 1989
Hep-2		1.59 +/- 0.113	Penheiter 1997
MDCK		4.05 +/- 0.59	Galán 1990
		4.20 +/- 0.15	Galán 1990
		2.14 +/- 0.58	Clark 1998

Se probaron dos diferentes molaridades de NaCl en LB para determinar si se presentaban diferencias en el porcentaje de invasión debidas a la infección durante dos horas de *S. gallinarum* cepa FVA1 y *S. typhimurium* cepa 938 en células HeLa, los resultados se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Porcentaje de invasión, en células HeLa, de *Salmonella* crecida en diferentes condiciones de osmolaridad.

osmolaridad	<i>S. gallinarum</i> %	<i>S. typhimurium</i> %
LB 0.1 M	0.34	3.06
LB 0.3M	0.89	5.69

Se realizaron ensayos de fagocitosis en macrófagos murinos J774 infectándolos con las cepas de *Salmonella* y utilizando las mismas constantes que en los ensayos de invasión, con la finalidad de comparar los porcentajes. Se obtuvo un porcentaje de fagocitosis del 2.47 ± 0.87 con la infección *S. gallinarum* FVA1 y del 16.48 ± 3.49 con *S. typhimurium* 938 (Figura 39). También se ensayaron tiempos de infección de una y dos horas para determinar si el porcentaje de fagocitosis se incrementa conforme avanza el tipo de infección. Para *S. gallinarum* FVA1, los porcentajes de fagocitosis observados fueron del



3.63 a la hora y del 5.33 a las dos horas, mientras que para *S. typhimurium* 938 fueron del 17.5 %y del 39%, respectivamente. Los resultados se presentan en la **figura 42** y el daño ocasionado por la infección a los macrófagos murinos se muestra en la **figura 47**.

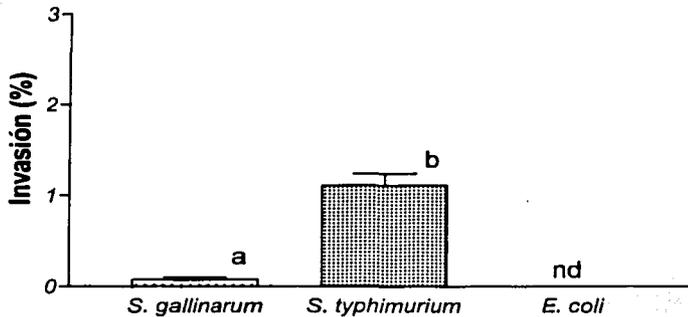


Figura 37. Porcentaje de invasión de *Salmonella* en células BAT. Las células se infectaron por dos horas con una MOI aproximada de 80:1 con las cepas de *S. gallinarum* FVA1, *S. typhimurium* 938 y como control negativo *E. coli* DH5 α , en donde no se obtuvieron datos cuantificables (nd). Los resultados indican la media y error estándar, expresados en porcentaje, de un experimento representativo de tres independientes. Datos con diferente literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

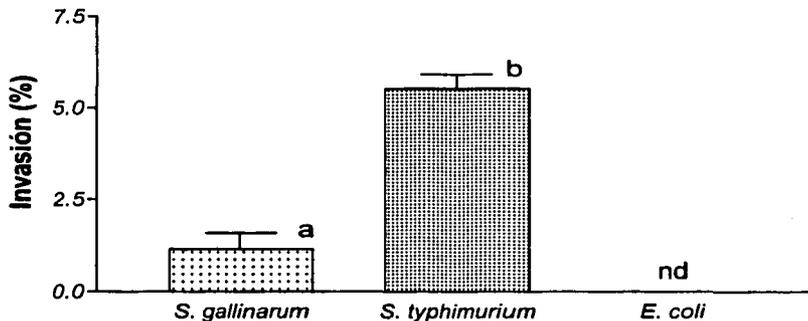


Figura 38. Porcentaje de invasión de *Salmonella* en células HeLa. Las células se infectaron por dos horas con una MOI aproximada de 80:1 con las cepas de *S. gallinarum* FVA1, *S. typhimurium* 938 y como control negativo *E. coli* DH5 α , en donde no se obtuvieron datos cuantificables (nd). Los resultados indican la media y error estándar, expresados en

porcentaje, de un experimento representativo de tres independientes. Datos con diferente literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

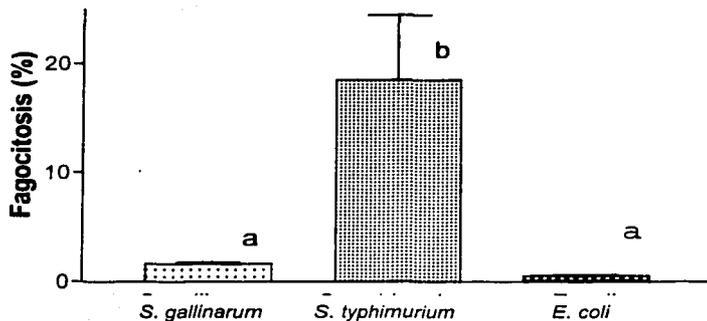


Figura 39. Porcentaje de fagocitosis de *Salmonella* en macrófagos J774. Las células se infectaron por dos horas con una MOI aproximada de 80:1 con las cepas de *S. gallinarum* FVA1, *S. typhimurium* 938 y como control negativo *E. coli* DH5 α . Los resultados indican la media y error estándar, expresados en porcentaje, de un experimento representativo de tres independientes. Datos con diferente literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

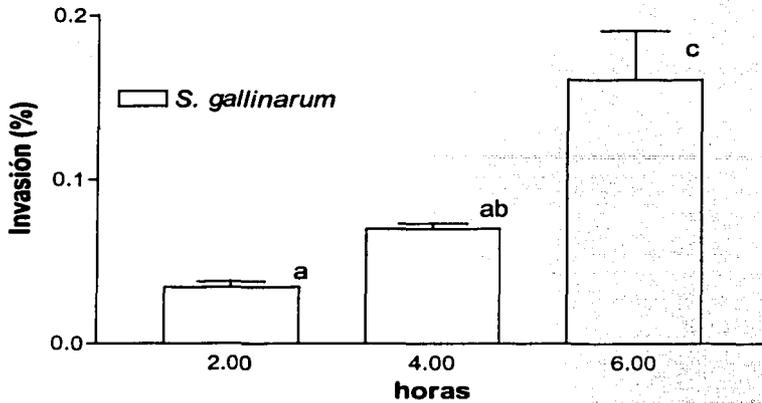
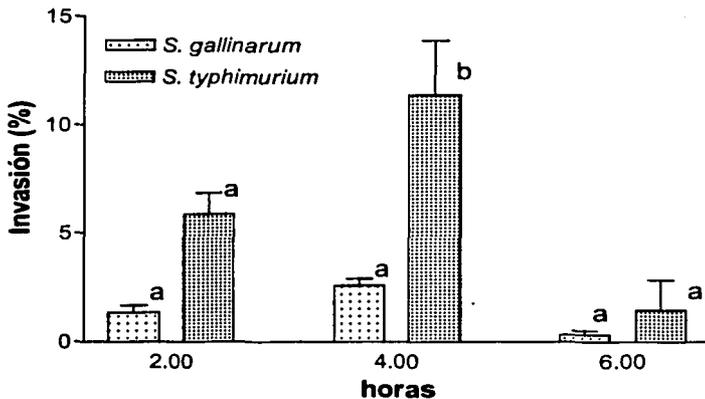


Figura 40. Porcentaje de invasión de *S. gallinarum* cepa FVA1 a las 2, 4 y 6 horas (MOI 80:1) en células BAT. Datos con diferente literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 41. Porcentaje de invasión de *S. gallinarum* cepa FVA1 y *S. typhimurium* cepa 938 a las 2, 4 y 6 horas (MOI 80:1) en células HeLa. A las 6 horas el daño celular, debido a la infección, provoca desprendimiento del monoestrato lo que produce una severa caída en el porcentaje de invasión. Datos con diferente literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

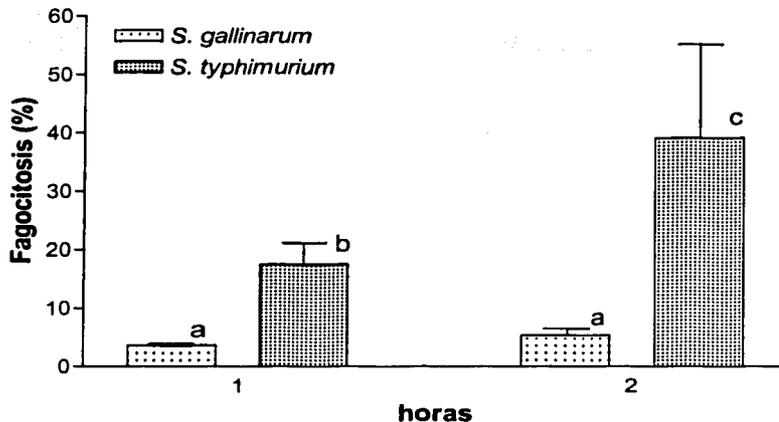


Figura 42. Porcentaje de fagocitosis de *S. gallinarum* cepa FVA1 y *S. typhimurium* cepa 938 a la hora y 2 horas (MOI 80:1) en macrófagos J774. Datos con diferente literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Después de realizar ensayos de invasión y de fagocitosis en diferentes cultivos celulares se concluye que *S. gallinarum* invade diez veces menos que *S. typhimurium*. Los resultados se presentan en la **tabla 11**.

Tabla 11. Relación aproximada de bacterias internadas o fagocitadas dependiendo del cultivo celular, después de 2 h de infección.

Cultivo celular	<i>S. gallinarum</i> /célula	<i>S. typhimurium</i> /célula
HeLa	0.4	4
MoJ774	1.6	16
BAT	0.1	1

Tinción con azul de tripano

Se cuantificó la muerte celular en macrófagos J774 inducida por la infección de *S. gallinarum* FVA1 y *S. typhimurium* cepa 938. A la hora la muerte celular fue del 35% en los macrófagos infectados con *S. gallinarum* y del 45% en los infectados con *S. typhimurium*, a las 2 h del 45 % y 65%, respectivamente, mientras que a las 3 h el porcentaje de mortalidad alcanzó el 100% en los macrófagos infectados con *S. typhimurium* y solo del 65% cuando la infección se realizó con *S. gallinarum*. Los resultados se observan en la **figura 48 y 49**.

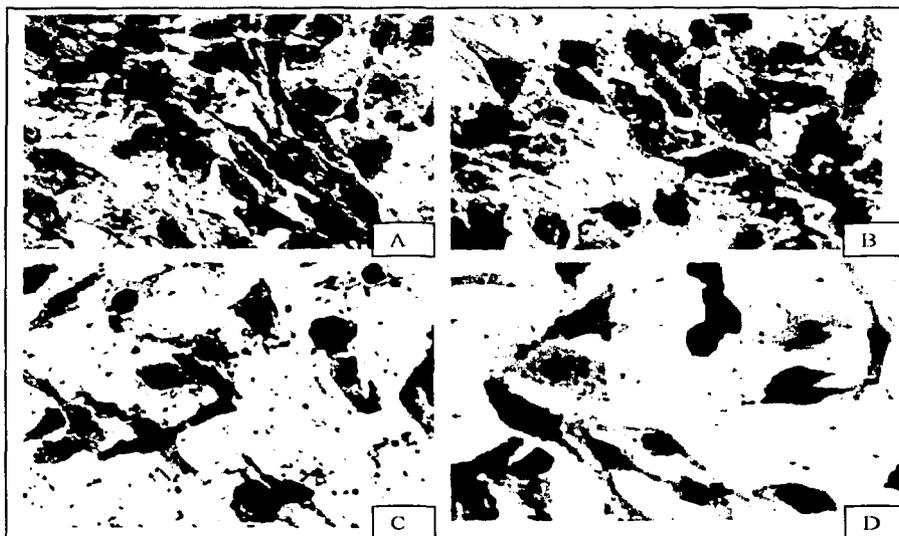


Figura 43. Células BAT infectadas con *S. gallinarum* cepa FVA1 (MOI 80:1) analizadas en un microscopio invertido A) células sin infectar, nótese la integridad del monoestrato B) 2 h de infección C) 4 h después de la infección comienza a notarse el daño celular que consiste en redondeamiento y desprendimiento celular. D) a las 6 h de infección se continua observando parte del monoestrato. Para dar contraste a las células se utilizó colorante de Sellers. 400 aumentos.

FALLA DE VIRGEN

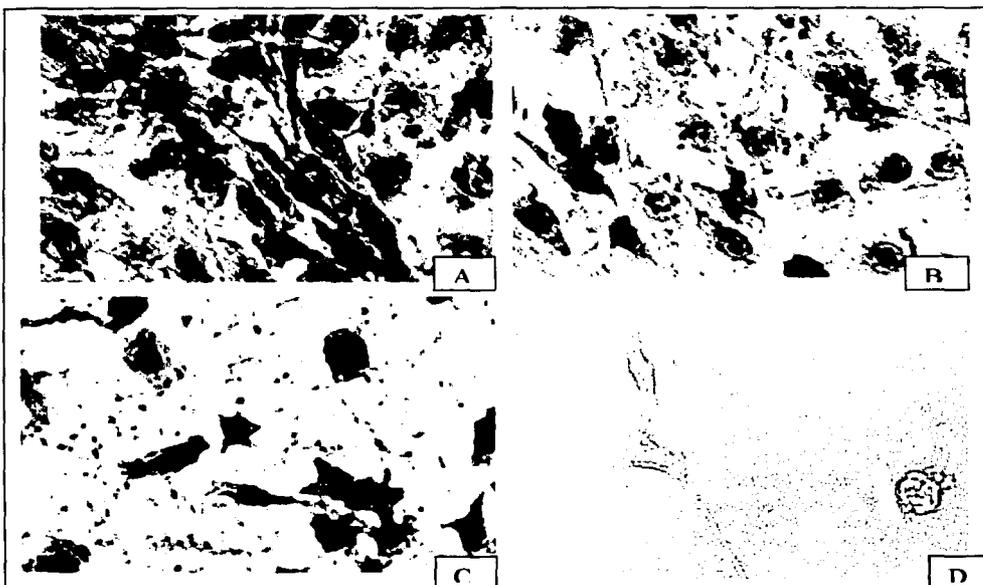


Figura 44. Células BAT infectadas con *S. typhimurium* cepa 938 (MOI 80:1) analizadas en un microscopio invertido A) células sin infectar, nótese la integridad del monoestrato B) después de 2 h de infección comienza a notarse el daño celular C) 4 h de infección se observa desprendimiento y redondeamiento celular D) a las 6 h de infección no se observan células, el desprendimiento es del 100%. Para dar contraste a las células se utilizó colorante de Sellers. Nótese que el daño ocasionado por *S. typhimurium* es mayor comparado con el provocado por *S. gallinarum* (figura 43). 400 aumentos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 45. Células HeLa infectadas con *S. gallinarum* cepa FVA1 (MOI 80:1) analizadas en un microscopio invertido A) células sin infectar, nótese la integridad del monoestrato B) 2 h de infección C) después de 4 h de infección, comienza a notarse el daño celular. D) A las 6 h de infección se observa desprendimiento y redondeamiento celular. Para dar contraste a las células se utilizó colorante de Sellers. 400 aumentos.

TEMA 001
FALLA DE ORIGEN

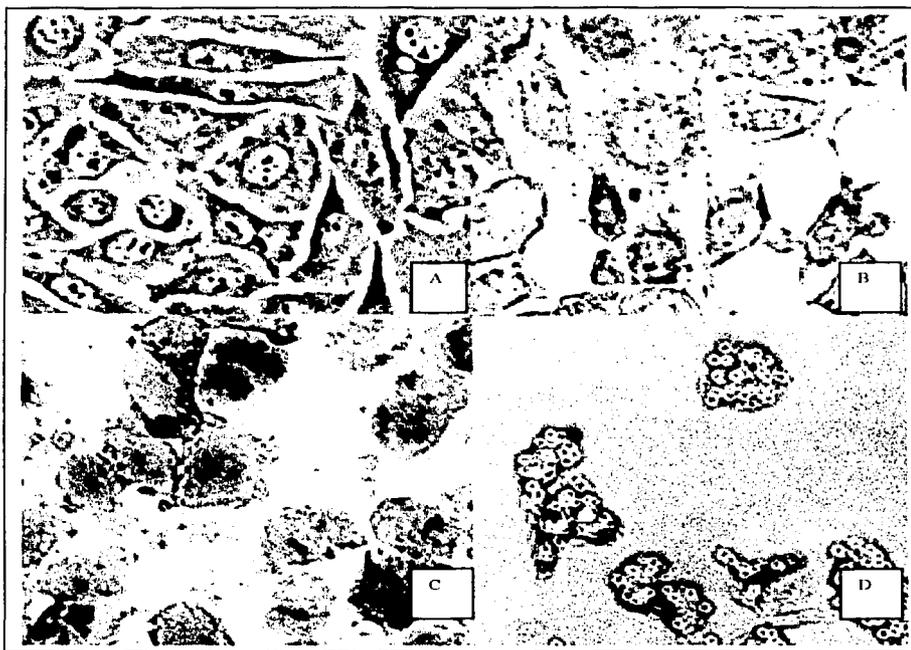


Figura 46. Células HeLa infectadas con *S. typhimurium* cepa 938 (MOI 80:1) analizadas en un microscopio invertido A) células sin infectar, nótese la integridad del monoestrato B) después 2 h de infección comienza a notarse el daño celular C) 4 h de infección se observa desprendimiento y redondeamiento celular. D) A las 6 h de infección las células están totalmente desprendidas. Para dar contraste a las células se utilizó colorante de Sellers. Nótese que el daño ocasionado por *S. typhimurium* es mayor comparado con el provocado por *S. gallinarum*. 400 aumentos.

VALLE DEL CAROLINO

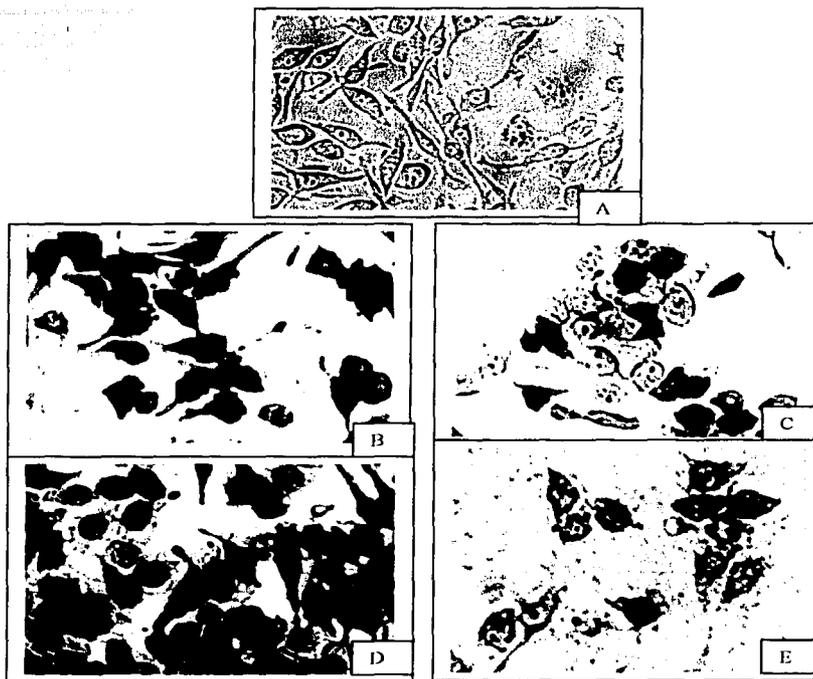


Figura 47. Citotoxicidad inducida por la infección de *S. gallinarum* cepa FVA1 y *S. typhimurium* cepa 938 en macrófagos de ratón J774 (MOI 1:80) analizadas en un microscopio invertido. Para dar contraste a las células se utilizó colorante de Sellers. Células sin infectar, adviértase la integridad del monoestrato (A) después de 1 h de infección con *S. gallinarum* comienza a detectarse redondeamiento celular (B) el cual se aprecia más marcado, cuando la infección se hace con *S. typhimurium* (C) a las 2 h postinfección con *S. gallinarum* el redondeamiento celular es evidente (D), se observa aumento de vacuolas citoplasmáticas. Nótese el franco desprendimiento celular después de 2 h de infección con *S. typhimurium* (E). 400 aumentos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

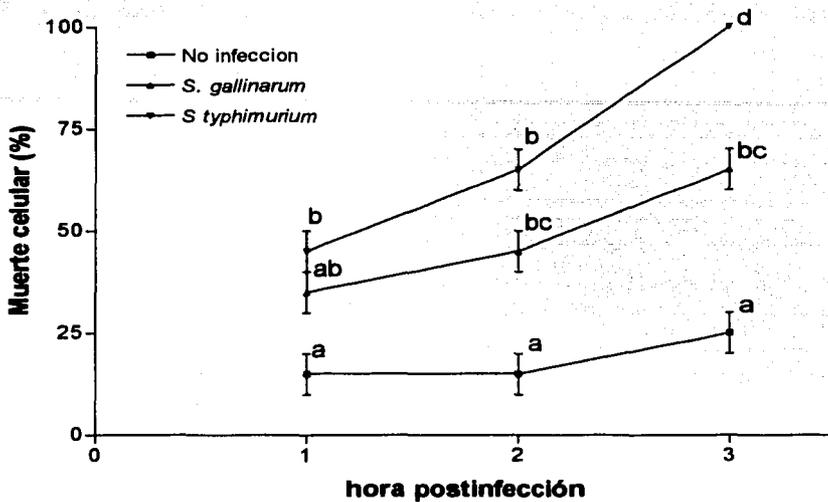


Figura 48. Muerte celular en porcentaje inducida por la infección de *S. gallinarum* cepa FVA1 y *S. typhimurium* cepa 938 en macrófagos de ratón J774 (MOI 1:80). Se analizaron las células por la exclusión de azul de tripano en un microscopio invertido contando 100 células por duplicado en cada tiempo postinfección. Los resultados que se muestran son la media y error estándar expresados en porcentaje de un experimento representativo de dos independientes. Datos con diferente literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

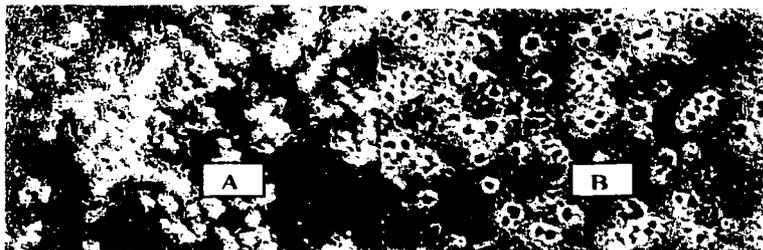


Figura 49. Macrófagos J774 después de tres horas de infección (MOI 80:1) con *S. gallinarum* FVA1 (panel A) y con *S. typhimurium* (panel B). Tinción de azul de tripano. Las células no viables se observan de color azul. 100 aumentos.

FALLA DE ORIGEN

Tinción de cromatina con ioduro de propidio

Después de cuantificar la muerte celular, en macrófagos J774, inducida por la infección de cepas de *Salmonella* se realizó tinción de la cromatina con ioduro de propidio para visualizar condensación de la misma (Figura 50). Se observó que después de 2 h el 16% de los núcleos presentaban condensación de cromatina cuando la infección se realizaba con *S.gallinarum* FVA1; cuando la infección se llevó a cabo con *S. typhimurium* 938, el porcentaje fue del 18%, mientras que en el control negativo se presentó condensación de la cromatina en un 9% de los núcleos de los macrófagos murinos.

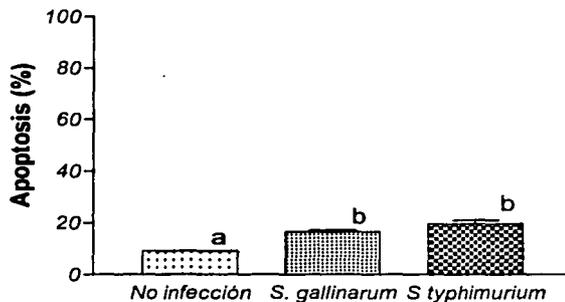


Figura 50. Porcentaje de núcleos que presentan condensación de cromatina postinfección (2h) con *Salmonella gallinarum* cepa FVA1 y *S. typhimurium* cepa 938 en macrófagos J774 (MOI 1:80). Se analizaron las células después de la tinción con ioduro de propidio en un microscopio de fluorescencia. Se contaron, de 100 células, las que presentaban condensación de núcleo. El experimento se realizó por duplicado. Los resultados que se muestran son la media y el error estándar expresados en porcentaje. Datos con diferente literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

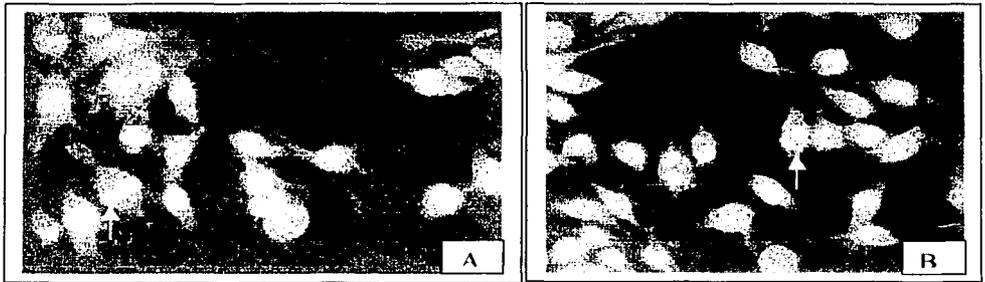


Figura 51. Macrófagos J774 después de dos horas de infección (MOI 80:1) con *S. gallinarum* cepa FVA1 (panel A) y con *S. typhimurium* (panel B). Tinción con yoduro de propidio. La flecha indica condensación de la cromatina. 1000 aumentos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

Es posible lograr explotaciones avícolas libres de *Salmonella*, poniendo en práctica medidas adecuadas de higiene y manejo, dietas balanceadas y con productos de buena calidad, práctica rutinaria de pruebas serológicas y cultivos bacteriológicos así como uso adecuado de antibióticos, vacunas y probióticos.

Salmonella puede sobrevivir y multiplicarse dentro de los macrófagos de varios huéspedes incluyendo a las aves, lo que permite su diseminación a órganos del sistema mononuclear fagocítico como nódulos linfáticos, hígado y bazo también se puede infectar el ovario, lo cual ocasiona la contaminación del huevo. Barrow, *et. al.*, 1994, demostraron que los serotipos de *Salmonella* con especificidad de huésped para pollo y aves, es debida a la habilidad de sobrevivir dentro de los órganos del sistema retículo endotelial más que a la habilidad de penetrar el epitelio intestinal. Schwan, *et. al.*, 2000, ensayaron la sobrevivencia de *S. typhimurium* y *S. typhi* en macrófagos murinos y humanos, observando que *S. typhi* sobrevive 100 veces más en macrófagos humanos que en murinos, en contraste con *S. typhimurium* que sobrevive 100 veces más en macrófagos murinos; esta persistencia bacteriana contribuye al tipo y severidad de enfermedad causada por las diferentes cepas de *Salmonella*, dependiendo del huésped, ésto podría explicar el mayor porcentaje de fagocitosis observado con la infección de *S. typhimurium* en macrófagos murinos J774 al compararlo con el alcanzado por *S. gallinarum* (Figura 39) ($p < 0.05$) (Apéndice B.4), lo que se está evaluando realmente es porcentaje de sobrevivencia. La escasa sobrevivencia de *S. typhi* dentro de los macrófagos murinos explica porque la infección en ratones, por esta cepa, no causa enfermedad; por el contrario la sobrevivencia de *S. typhimurium* dentro de los macrófagos permite su diseminación pasando a ser de una infección localizada en el intestino a una septicemia.

Los genes de la isla de patogenicidad I de *Salmonella*, codifican para un sistema de secreción tipo III que media la translocación de proteínas efectoras dentro de las células del huésped, la acción en conjunto de estas proteínas resulta en rearrreglos del citoesqueleto y respuestas nucleares que finalmente permiten la internación de *Salmonella* y la producción de citocinas proinflamatorias. Las proteínas efectoras pueden ser consideradas como toxinas debido a que de alguna manera afectan a la célula eucariótica, sin embargo, a diferencia de éstas, carecen de receptores de unión por lo que son incapaces de tener acceso directo a su sitio de acción sino es por la contribución del SSTIII. Por lo descrito anteriormente, todo parece indicar que la penetración de *Salmonella* a la mucosa intestinal es esencial para causar infección letal, el hecho de bloquear la penetración a la mucosa intestinal al mutar genes, involucrados en invasión, permite obtener cepas atenuadas que pudieran ser utilizados como posibles inmunógenos (Bäumler, *et. al.*, 1997). Por lo anterior, en el presente trabajo se inició la construcción de mutantes de *S. gallinarum* en el gen *invA*.

Con el uso del microscopio electrónico se ha logrado demostrar, en el intestino de aves experimentalmente infectadas con *Salmonella*, la migración de heterófilos y macrófagos en la superficie del lumen intestinal (Powell, 1987). La capacidad de los heterófilos y macrófagos aviares de destruir a *Salmonella* ha sido demostrado a través de ensayos

bactericidas *in vitro* (Henderson, *et. al.*, 1999). Además se ha demostrado la presencia de *Salmonella* en el intestino, hígado y bazo en aves infectadas experimentalmente (Barrow, *et. al.*, 1994; Wigley *et. al.*, 2001). Esto indica que en la patogénesis de la salmonelosis aviar se presenta diseminación del microorganismo de manera similar al establecido al utilizar modelos de mamíferos. Lo anterior se explica por el hecho de que de *S. gallinarum* presenta islas de patogenicidad similares a las de *S. typhimurium*, en el presente trabajo se demostró la presencia de *invA* en cepas de *S. gallinarum* aisladas de la República Mexicana.

Cepas de *S. typhimurium* con mutación en genes *inv*, *spa*, *org* o *prg* son incapaces de penetrar cultivos celulares en la misma proporción que la cepa silvestre (Eichelberg y Galán, 1999; Clark, *et.al.*,1996). Mutantes de *S. typhimurium* en *invA* presentan una habilidad reducida para colonizar placas de Peyer después de la inoculación oral en ratones y la inoculación de asas ligadas de ileon. Además, mutaciones en *invA* y *orgA* resultan en un incremento de la dosis letal 50%. Dentro de las proteínas que se encuentran formando parte del SSTIII, como lo demuestran trabajos anteriores con *S. typhimurium* (Galán y Curtiss III, 1991; Galán, *et. al.*, 1992b; Clark, *et. al.*, 1996b, 1998; Penheiter, *et. al.*, 1997; Galán y Curtiss, 1989; Jones, *et. al.*, 1994; Ohl y Miller, 2001), la proteína InvA involucrada en la formación de canal, juega un papel de suma importancia durante la invasión celular, por lo que al elegir el gen a mutar se seleccionó a *invA*. Las mutantes en *invA* de *S. typhimurium*, son atenuadas solamente cuando la bacteria es inoculada oralmente, pero continúan siendo patógenas cuando la cepa es inoculada intraperitonealmente, estos datos demuestran claramente que la SPI-1 juega un papel de vital importancia durante la invasión de la mucosa intestinal y no se requiere durante la infección sistémica.

La mutagénesis *in vitro* de genes clonados ha pasado a ser una técnica ampliamente utilizada en el análisis funcional de ácidos nucleicos y proteínas. El procedimiento sigue un esquema básico: un plásmido conteniendo el gen de interés es tratado *in vitro* por algún procedimiento mutagénico que altera al gen química o enzimáticamente. El plásmido mutado es introducido en *E. coli* por transformación y las colonias conteniendo al plásmido son seleccionadas por resistencia a antibióticos. Los caminos para llevar a cabo la mutagénesis pueden ser agrupados escuetamente en mutagénesis al azar y mutagénesis sitio dirigida. La mutagénesis al azar se puede lograr por diferentes métodos: manipulando sitios de restricción, insertando oligonucleótidos enlazadores que contienen sitios de restricción, uso de agentes mutágenos químicos o incorporación incorrecta de nucleótidos durante la síntesis del ADN. La mutagénesis sitio dirigida puede hacerse mediante delección en el gen de interés, utilizando enzimas de restricción; extensión de oligonucleótidos modificados o por inserción de transposones o cassetes que codifiquen resistencia para algún antibiótico. Cuando se elaboró el diseño experimental del presente trabajo se optó por el uso del casete de *km* contenido en el pBSL46 (Figura 25) (Alexeyev, *et.al.*, 1995). Al construir los iniciadores (EAB) para determinar la presencia de *invA* en *S. gallinarum* no se tomaron en cuenta futuros cortes dentro de la estrategia elegida, por lo que se tuvo que mandar sintetizar nuevos iniciadores (EAB2) (Figura 8), lo que trajo como consecuencia una elevada inespecificidad de la PCR (Figura 14), el problema se solucionó cortando la banda deseada (*invEABC* de 3.2 Kb) (Figura 15) y clonándola en el vector pCRT7 NT TOPO (Figura 16), obteniendo el plásmido pMFO1 (Figura 19). El inconveniente de ésta

clonación fue que se crearon dos sitios de corte para *MluI*, y se requería solamente de un sitio de corte, para introducir el casete de Km; el problema se corrigió subclonando el fragmento *invEABC* de 3.2 Kb en el vector pBKS (Figura 21) obteniendo el pMFO2 (Figura 23) en el que posteriormente se clonó el producto de la PCR del pBSL46 (Figura 24) construyendo el pMFO3 (Figura 27) con lo que se logró el gen *invA* de *S. gallinarum* interrumpido por el casete de Km. En el intento de conocer el porque de la inespecificidad de la PCR con los iniciadores EAB2 se diseñaron iniciadores intermedios dentro del gen *invA* (iniciadores A y B) (Figura 8). Si se utilizaban los iniciadores *invEAB2* (*forward*)-EAB (*reverse*) o los iniciadores B (*forward*)-EAB (*reverse*) no se presenta inespecificidad de la PCR (Figura 32), situación contraria sucedía si se utilizaban los iniciadores segmento B (*forward*)-EAB2 (*reverse*) por lo que se consideró que el iniciador EAB2 reverso es sumamente inespecífico.

Se tiene ligado el gen *invA* en un vector pCRT7-TOPO (pMFO1) por lo que en trabajos futuros se puede expresar la proteína InvA, también puede tener utilidad para trabajos de complementación de mutantes.

Siguiendo con la estrategia establecida se debe de cortar el segmento *invEABC* de pMFO3, flanqueado por las enzimas de restricción *SalI-SstI* para clonarlo en el vector suicida pRE107 (Edwards, *et. al.*, 1998) (Figura 29) cortado con las mismas enzimas de restricción, los fragmentos obtenidos del corte de pMFO3 son de 2884 pb y 2946 pb, que corresponden a pBKS y al fragmento *invEABC*, respectivamente, interrumpido por el casete de Km (Figura 26), por lo que la siguiente estrategia consiste en separar dichas bandas.

Finalmente, para seleccionar las clonas en las cuales se llevó a cabo el reemplazamiento por recombinación homóloga se usan marcadores genéticos como resistencia a antibióticos y el gen *SacB* (Kaniga, *et. al.*, 1991), responsable de sintetizar levanosacarosa que permite una selección positiva de las cepas que integraron la mutación en su cromosoma.

Mientras que la patogénesis de la salmonelosis en ratones, conejos y bovinos ha sido ampliamente estudiada, existen limitaciones en la literatura que describe la patogénesis en aves utilizando modelos aviáres. El papel de los diferentes factores de virulencia con los que cuenta *Salmonella* pueden ser estudiados utilizando cepas con diferentes mutaciones. En parte, el interés del presente trabajo se enfocó en colaborar al conocimiento de la patogénesis de *S. gallinarum* empleando embriones de pollo, cultivo celular, incluyendo una línea de macrófagos utilizados para realizar la cuantificación de la muerte celular mediante la técnica de azul de tripano, así como tinción de cromatina con yoduro de propidio para detectar condensación de cromatina.

El uso de embrión de pollo en investigación biológica representa un instrumento valioso, el embrión es susceptible a la infección por una gran variedad de organismos y tiene la ventaja adicional de responder a muchos de ellos de una manera característica. La ruta de inoculación depende del microorganismo en estudio, en el caso de *Salmonella* se requiere que se realice a través del saco vitelino. Con cada una de las cepas del presente

estudio se inocularon embriones de pollo libres de patógenos específicos de 8 días de edad, vía saco vitelino con la finalidad de recuperar la patogenicidad de las cepas. Los embriones inoculados presentaban congestión, hemorragias, líquido amniótico turbio, licuefacción de la yema, enanismo y olor putrefacto lo que se traduce como daño ocasionado por la infección de *Salmonella* (Figura 36). En los embriones inoculados con las cepas FVA1 y U2, reportadas en trabajos anteriores como las más patógenas (Vázquez, 1995, Urquiza, 1995) el daño visible era mayor comparado con las cepas restantes. Se sugiere el uso de embriones de pollo para recuperar la patogenicidad de las cepas de *Salmonella* que han estado liofilizadas o congeladas por periodos mayores de dos años, inclusive se sugiere el uso del embrión de pollo, en trabajos futuros, para evaluar la cepa de *S. gallinarum* mutada.

Con las cepas aisladas de los embriones de pollo se realizaron pruebas bioquímicas (Tabla 6) encontrando ciertas discrepancias al comparar las tablas de identificación de ciertos autores. Old y Threlfal (1998) identifican a *S. gallinarum* y *S. pullorum* como H₂S negativo y Holt, et. al., (2000) como positivo, este último concuerda con los resultados obtenidos. Cowan y Steel's (1995) identifica a ambas como positivas al citrato de Simmons y negativas al citrato de Christensen's. En el presente trabajo, el citrato de Simmons fue sumamente variable. Quinn, et. al., (1994) y Cowan (1995) identifican a *S. gallinarum* y *S. pullorum* con ODC, dulcitol, maltosa y ramnosa (Tabla 7).

En el presente trabajo *S. gallinarum* se comporta como ODC negativo, dulcitol variable, maltosa positivo y ramnosa positivo. Previamente se había considerado a *S. pullorum* como biotipo de *S. gallinarum* (Barrow, et. al., 1994, Griffin y Barrow 1993); después de revisar la identificación basada en pruebas bioquímicas, se encuentran discrepancias con lo citado por diferentes autores (Old y Threlfal, 1998, Quinn, et. al., 1994; Cowan y Steel's, 1995), por lo anterior se sugiere el uso de técnicas moleculares para confirmar dicha propuesta.

Los modelos de cultivos celulares *in vitro* se han desarrollado para estudiar los eventos en la invasión, conocer cuantitativamente la interacción entre *Salmonella* y las células eucarióticas además de la identificación de los genes involucrados en el proceso de infección así como los factores que regulan estos genes. Se tienen reportes del empleo de células HeLa, Henle-407, CHO, Hep-2, VERO, BAT, MDCK; líneas celulares de adenocarcinoma humano: Caco-2, HT29 y T84 (Finlay, et. al., 1988; Giannella, et al., 1973) (Tabla 9) también se han utilizado líneas de macrófagos J774, RAW 264.7 (Chen, et. al., 1996, Monack, et. al., 1996).

Un estudio descriptivo de la penetración de *Salmonella* utilizando microscopía electrónica de transmisión, para la observación de epitelio intestinal de cobayos infectados oralmente con *S. typhimurium* fue publicado por Takeuchi en 1967. A partir de entonces un sinúmero de ensayos de invasión en cultivos celulares se han experimentado.

Los ensayos de invasión realizados *in vitro* demuestran que *S. typhimurium* fue capaz de invadir cultivos celulares de humano y aves mientras que *S. gallinarum* fue pobremente invasiva (Barrow y Lovell 1989; Henderson, et.al., 1999, Kaiser, et. al., 2000). En el presente trabajo se encontró un porcentaje de invasión en células BAT del 0.07±0.03 para

S. gallinarum y del 1.02 ± 0.10 para *S. typhimurium* (Figura 37) valores que después de ser analizados estadísticamente con la prueba ANDEVA son significativamente diferentes ($p < 0.05$) (Apéndice B.2), el reportado por Henderson es del 0.03 ± 0.003 y 2.65 ± 0.44 , respectivamente. Parte de las dificultades que se han encontrado durante el estudio es la falta de cultivos celulares aviares, en las células BAT el porcentaje de invasión de *S. gallinarum* es demasiado bajo como para considerar a estas células meritorias a ser utilizadas en experimentos futuro, no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) (Apéndice B.2) en el porcentaje de invasión de *S. gallinarum* y *E. coli* DH5a.

En la literatura consultada no se encontraron reportes de invasión en células HeLa los resultados del presente estudio reportan 0.89 ± 0.32 para *S. gallinarum* y 5.69 ± 0.89 para *S. typhimurium* (Figura 38), *E. coli* DH5a se utilizó como control negativo ($p < 0.05$) (Apéndice B.3). Por otra parte el daño celular observado siempre fue mayor por la infección de *S. typhimurium* comparado con el provocado por *S. gallinarum* (Figuras 44 y 46). Se puede entender el porque del menor porcentaje de invasión en *S. gallianrum*, al recordar que las células HeLa son de origen humano y *S. gallinarum* es un patógeno aviar específico de huésped. Por otra parte *S. gallinarum* a diferencia de *S. typhimurium*, es considerada inmóvil.

Liu, *et. al.*, en 1988 demostraron que *S. typhi* requiere motilidad intacta para entrar en células epiteliales, si presenta mutaciones que afecten el flagelo, motilidad o quimiotaxis es incapaz de entrar a estas células, aún si la bacteria es centrifugada para contactarla con las células; por el contrario Finlay y Falkow (1989) exponen que las mutaciones en genes necesarios para la biosíntesis del flagelo en *S. typhimurium* exhiben un decremento marcado en los niveles de invasión, pero si estas mutantes se centrifugan durante la infección en cultivos celulares, se observa incremento en los niveles de invasión. Estos datos sugieren que la motilidad aumenta la probabilidad de contacto con las células eucarióticas y en consecuencia la invasión (Barrow y Lovell, 1989). Además, el número de bacterias adheridas e internadas en las células epiteliales se incrementa con el tiempo (Finlay y Falkow, 1989).

En los resultados obtenidos se observa un incremento en el porcentaje de invasión en células HeLa y células BAT al ensayar tiempos de 2, 4 y 6 h (Figuras 40 y 41), a partir de las cuatro horas de infección se presenta diferencia significativa ($p < 0.05$) (Apéndice B.5 y B.6). En las células HeLa, a las seis horas, el daño ocasionado en el monoestrato produce el desprendimiento celular lo que se traduce en un decremento al momento de evaluar el porcentaje de invasión.

Los patógenos entéricos experimentan severos cambios ambientales cuando entran al huésped por vía oral como por ejemplo: pH ácido, aumento de temperatura, bajas tensiones de oxígeno, alta osmolaridad; la bacteria responde a estos cambios modulando la expresión de sus genes, lo anterior explica por qué la concentración de oxígeno del cultivo, osmolaridad del medio, disponibilidad de nutrimentos así como la fase de crecimiento bacteriana afectan la habilidad de *Salmonella* para invadir cultivos de células epiteliales

(Lee y Falkow, 1990; Tartera y Metcalf, 1993; Ernst, *et. al.*, 1990), así como la expresión de los genes de invasión (Bajaj, *et. al.*, 1996).

A pesar de que es bien sabido que la invasión bacteriana aumenta en bajas concentraciones de oxígeno (Ernst, *et. al.*, 1990, Schiemann y Shope, 1991), Clark, *et. al.*, en 1996, determinaron los niveles de InvA en cultivos en agitación (aireados) y estáticos, durante el crecimiento exponencial, encontrándolos similares; pero observaron un incremento sorprendente, de nueve veces, en los cultivos en agitación a las 6 horas. Por el contrario Lee y Falkow en 1990 demuestran que *S. choleraesuis* y *S. typhi* en cultivos estáticos, en fase logarítmica tardía de crecimiento son diez veces más invasivos que los cultivos de estas mismas cepas en fase logarítmica e incubados en agitación. Behlau y Miller (1993) reportan que la expresión *prgH* es inducida en condiciones aeróbicas. Pegues, *et. al.*, 1995 reportan la expresión de *prgHIJK* y *orgA* cuando la bacteria crece en condiciones aeróbicas. Como se puede observar existe discrepancia en cuanto a la concentración de oxígeno empleadas en los cultivos bacterianos utilizados para infectar los cultivos celulares; en el presente trabajo se utilizó agitación 220 rpm debido a que se empleó el protocolo descrito por Galán (1991) pero se sugiere realizar futuros ensayos donde el cultivo bacteriano se incuba en condiciones bajas de oxígeno.

Metcalf y Tartera, en 1993, demuestran que un medio de cultivo con mayor concentración molar (LB 0.3 M NaCl) aumenta la expresión de los genes de virulencia involucrados en adherencia e invasión. Galán y Curtiss III, en 1990, reportan que cuando *S. typhimurium* es crecida en medios con alta osmolaridad, por aumento en el súper enrollamiento del ADN, los niveles de transcripción de *invA* aumentan ocho veces mas que cuando es crecida en un medio con baja osmolaridad y concluyen que un incremento en la relajación del ADN causa un decremento en la expresión de *invA*. En el presente estudio se probaron dos diferentes molaridades con NaCl, para determinar el porcentaje de invasión de *S. gallinarum* y *S. typhimurium* (Tabla 10). Si se incrementa la osmolaridad del medio en el que se cultiva *S. gallinarum*, el porcentaje de invasión en células HeLa se duplica.

El efecto de la temperatura en la invasión de *S. choleraesuis* en células MDCK fue descrito por Finlay, *et. al.*, en 1988, quienes demostraron que el mayor porcentaje de invasión se consiguió a los 37°C, ésto se explica por el hecho de que temperaturas de 28°C reducen el *linking number* del ADN lo que permite relajación del mismo. Barrow y Lovell (1989) realizaron ensayos de invasión a 41°C y 37°C utilizando cepas de *S. gallinarum*, *S. typhimurium* y *E. coli* K12 no encontrando diferencia alguna.

Cuando se analizaron los diferentes protocolos, utilizados para realizar ensayos de invasión, reportados en la literatura, se observó que no existe homogeneidad en los mismos, lo cual explica las diferencias reportadas por los autores. Tomando en cuenta las experiencias previas la infección de los cultivos celulares se efectuó a 37°C por 2 h, MOI 80:1, las cepas bacterianas se crecieron en LB 0.3M NaCl con agitación utilizando un inóculo en fase de crecimiento logarítmico.

Utilizando asas ligadas de ratón, Clark, *et.al* en 1996 y 1998, demuestran que las células M juegan un papel importante en la patogénesis de la salmonelosis murina, ya que en etapas tempranas de la infección estas células son los sitios primarios de invasión bacteriana, sin embargo al utilizar mutantes en *inv* continúan observando rearrreglos de la membrana celular en la célula M indistinguibles de los producidos por la cepa silvestre, estos investigadores sugieren un mecanismo de invasión *inv*-independiente.

Salmonella es citotóxica para macrófagos *in vitro* y la SPI-1 codifica los genes involucrados en este proceso. Chen, *et.al.* (1996) determinaron viabilidad celular, postinfección con *S. typhimurium* (MOI 10:1) en macrófagos J774, utilizando el colorante de exclusión etidio homodímero-1, obteniendo a la hora un 20% de células teñidas, a las 2 h 63% y a las 6 h más del 78%. En el presente trabajo se utilizó azul de tripano, como colorante de exclusión, los macrófagos J774 se infectaron con una MOI 80:1 y como se observa en la **Figuras 48 y 49**, con *S. typhimurium* a las 3 h se alcanzó casi el 100% de muerte celular mientras que con *S. gallinarum* el 65%. La prueba de ANDEVA reveló que existe diferencia significativa ($p<0.05$) (Apéndice B.8) entre los macrófagos infectados por ambas cepas y el control negativo. Por otra parte, se observa diferencia significativa ($p<0.05$) (Apéndice B.8) en el porcentaje de muerte celular de los macrófagos infectados con las cepas de *S. gallinarum* y *S. typhimurium* hasta las tres horas de infección (**Figura 48**).

Los macrófagos infectados con *Salmonella* exhiben características como condensación y fragmentación de la cromatina, formación de vesículas en la membrana y la presencia de nucleosomas y cuerpos apoptóticos en el citoplasma. Varios grupos de investigadores han reportado que esto se debe a la inducción de apoptosis (Chen, *et. al.*, 1996; Monack, *et. al.*; 1996), por la activación de caspasa 1, mediada por SipB (Hersh, *et.al.*, 1999). Al estar en contacto la bacteria con los macrófagos, estos incrementan su actividad macropinocítica la cual persiste durante los primeros 30 minutos postinfección, a los 45 minutos comienzan a observarse signos claros de citotoxicidad como redondeamiento; a partir de las 4-8 h Chen, *et. al.*, detectan condensación y fragmentación de la cromatina utilizando tinción de DAPI y microscopio de luz, así como 65% de macrófagos positivos en el ensayo de TUNEL; el microscopio electrónico reveló vesículas en membrana y presencia de cuerpos apoptóticos así como presencia de macrófagos que habían sufrido necrosis, observando en el citoplasma signos de degeneración.

Chen, *et. al.*, 1996, postulan que mientras mayor sea la dosis de infección mayor será la muerte celular por necrosis, basándose en el hecho de que a mayor número de bacterias el daño a la membrana será mayor, lo que ocasiona disminución en el influjo de calcio, esencial para que se lleve a cabo la apoptosis. En el presente trabajo se detectó condensación de la cromatina utilizando yoduro de propidio, el porcentaje obtenido después del conteo de núcleos que presentaban condensación de la cromatina fue menor (18%) (**Figura 50**) comparados con los reportados por Chen (65%), pero cabe recordar que la infección se llevó a cabo solamente por 2 h, por otra parte la MOI fue ocho veces mayor por lo que se sospecha de muerte por necrosis ya que el conteo de células inviables a las 2 h es del 60-70% para *S. typhimurium* y del 40-50% para *S. gallinarum* (**Figura 48**); en los

porcentajes de condensación de la cromatina obtenidos por la infección de *S. gallinarum* y *S. typhimurium* no existe diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) (Apéndice B.9) pero si al hacer la comparación con el control negativo (no infección) ($p < 0.05$) (Apéndice B.9); Chen, *et. al.*, 1996, describen citotoxicidad con *S. typhimurium*, *S. gallinarum*, *S. typhi* y *S.dublin* no encontrando diferencias entre las distintas cepas.

Se realizaron ensayos de fagocitosis con la cepa de *S. gallinarum* y la de *S.typhimurium*, reportando porcentajes de 2.47 ± 0.87 y de 16.48 ± 3.49 , respectivamente, mostrando diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) (Apéndice B.4) entre las infecciones por las diferentes cepas de *Salmonella* pero no al comparar el porcentaje de fagocitosis entre *S.gallinarum* y *E. coli* ($p > 0.05$) (Apéndice B.4) lo que se puede explicar por el hecho de que los macrófagos son de origen murino y *S. typhimurium* se comporta como patógeno especie específica de ratón (Figura 39); Monack (1996) reporta porcentajes de fagocitosis del 21.5 ± 3.6 pero en macrófagos RAW264.7. Por otra parte, como se observa en la figura 42, conforme avanza el tiempo de infección, aumenta el porcentaje de fagocitosis y la citotoxicidad de los macrófagos (Figura 47) observando diferencia significativa ($p < 0.05$) (Apéndice B.7) únicamente cuando la infección se realiza con la cepa de *S. typhimurium*.

Los macrófagos infectados con cepas de *Salmonella* presentaron cambios morfológicos, tales como: redondeamiento celular, aumento de vacuolas citoplasmáticas y desprendimiento celular (Figura 47) así como condensación (Figura 51) y fragmentación del DNA, en una fracción del cultivo celular, que depende de la cepa utilizada y del tiempo de infección; reportes previos describen dicho daño (Chen, *et. al.*, 1996a, Monack, *et. al.*, 1996, Lindgen, *et al.*, 1996). La citotoxicidad de *Salmonella* también se ha cuantificado utilizando tinción de cristal violeta, DAPI, etidio homodímero, la técnica de TUNEL; así como métodos colorimétricos (LDH) (Chen, *et. al.*, 1996a, Monack, *et. al.*, 1996, Lindgen, *et al.*, 1996).

Watson, *et. al.*, en el 2000, publicaron que *Salmonella* puede inducir muerte de macrófagos por un mecanismo distinto al de apoptosis. Velden, *et.al.*, 2000 y Santos *et.al.*, 2001, encontraron que *S. typhimurium* puede producir apoptosis por una vía independiente de SPI 1 y dependiente de SPI 2 y *ompR*, en macrófagos infectados con cultivos en fase estacionaria de crecimiento.

Se sugiere la ejecución de ensayos de invasión en cultivos celulares modificando condiciones de cultivo del inóculo bacteriano, como por ejemplo: ensayar infecciones a tiempos diferentes en la fase logarítmica de crecimiento bacteriano, crecer a la bacteria sin agitación previo a la infección, centrifugar el cultivo celular postinfección para aumentar la interacción entre *S. gallinarum* y las células eucarióticas. Así como ensayos de citotoxicidad utilizando MOI 1:10 por 4 h y ensayos de apoptosis utilizando la técnica de TUNEL.

En el presente trabajo se logró la construcción de los plásmidos pMFO1, pMFO2 y pMFO3. Para realizar la mutación en el gen *invA* de *S. gallinarum*, es indispensable la fabricación del plásmido pMFO4, por lo que se sugiere su elaboración en trabajos futuros.

La conjugación del plásmido pMFO4 con la cepa silvestre de *S. gallinarum* FVA1, producirá por recombinación homóloga un intercambio del gen *invA* silvestre por el gen *invA* interrumpido por el casete de Km, logrando así una cepa *invA::Km*.

Actualmente se cuentan con técnicas más sencillas y que presentan una mayor eficiencia para inactivar genes usando producto de PCR (Datsenko y Wanner, 2000) por lo que se sugiere practicar en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ dicha estrategia para futuras investigaciones donde se desee realizar mutagénesis sitio dirigidas.

CONCLUSIONES

Los embriones inoculados con las cepas FVA1 y U2, reportadas en trabajos anteriores como las más patógenas (Vázquez 1995, Urquiza 1995) presentan un daño visible mayor comparado con las cepas restantes.

Después de realizar ensayos de invasión y de fagocitosis en diferentes cultivos celulares se concluye que *Salmonella gallinarum* cepa FVA1 invade diez veces menos que *Salmonella typhimurium* cepa 938.

Si se incrementa la osmolaridad del medio en el que se cultiva *Salmonella gallinarum*, el porcentaje de invasión en células HeLa se duplica.

La inmovilidad de *Salmonella gallinarum* probablemente disminuye la capacidad de invasión, lo que se observa en los hallazgos de la presente investigación, quizás una estrategia alternativa de contacto permitirá evaluar con mayor objetividad si esta baja invasividad es real.

REFERENCIAS

- 1.- **Rizo QN.** Como se integra la avicultura Nacional. Memorias del VII curso sobre el control y erradicación de la Tifoidea Aviar. Monterrey Nuevo León, México, 1987. 2-12, Comisión Permanente para el Control y Erradicación de la Pullorosis y Tifoidea Aviar. México, D F. 1987.
- 2.- **Gordon RF.** Enfermedades de las aves. El Manual Moderno. México, D.F 1980.
- 3.- **Vázquez NJ.** Preparaciones de Proteínas de la Membrana externa de *Salmonella gallinarum* para el diagnóstico de la Tifoidea Aviar. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, México, 1995.
- 4.- **Clarke RC and Gyles CL.** *Salmonella*. In Gyles, CL and Thoen CO, editores. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals 2nd ed. Iowa State University Press. AMES 1993: 133-153
- 5.- **Padrón MN.** Generalidades sobre Pullorosis y Tifoidea Aviar. Memorias del VII Curso sobre el Control y Erradicación de la Tifoidea Aviar. Comisión Permanente para el Control y Erradicación de la Pullorosis y Tifoidea Aviar. Monterrey, NL. México 1987.
- 6.- **Pomeroy BS and Nagaraja KV.** Fowl typhoid. In Calnek BW, Barnes HJ, Eard CW, Reid WM and Yoder HW eds. Diseases of Poultry 9th ed. Iowa State University Press, Amass, Iowa 1991.
- 7.- **Mosqueda TA y Lucio B.** Enfermedades comunes de las Aves Domésticas. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, México 1985.
- 8.- **Silva EN, Snoeyenbos GH, Weinack OM and Smyser CF.** Studies on the use of 9R strain of *Salmonella gallinarum* as vaccine in chickens. Avian Dis 1981a; 25:38-52.
- 9.- **Silva EN, Snoeyenbos GH, Weinack OM and Smyser CF.** The influence of native gut microflora on the colonization and infection of *Salmonella gallinarum* in chickens. Avian Dis. 1981b; 25: 68-73.
- 10.- **Urquiza, BO.** Paratifoidea Aviar. III Jornada Médico, Avícola . Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México, DF.1992; 235-239.
- 11.- **Prince WR and Garren HW.** An investigation of the resistance of White Leghorn chicks to *Salmonella gallinarum*. Poultry. Sci. 1966; 45: 1149-1153.
- 12.- **Padrón MN,** Control y Prevención de la Tifoidea Aviar en las Aves Reproductoras Pesadas. II Jornada Médico Avícola. Departamento de Aves. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. Editores: Quintana JA y López C. México 1991.
- 13.- **Quinn PJ, Carter ME, Marquee B and Carter GR.** Clinical Veterinary Microbiology. Wolf London 1994.
- 14.- **Koneman EW, Allen SD, Dowell VR and Sommers HM.** Diagnóstico Microbiológico. México. Médica Panamericana 1989.
- 15.- **Padrón MN.** Infecciones Paratifoideas en el Pollo de Engorda. Avic Prof 1989; 6:123-130.
- 16.- **Ashton WLG.** Fowl Typhoid. Poultry Diseases. Edited by Jordan FTW. 3rd ed. Boiler Tidal, London 1990.
- 17.- **Mosqueda TA.** Medidas Sanitarias para Prevenir la Tifoidea Aviar. Memorias del VII curso sobre el Control y Erradicación de la Pullorosis y Tifoidea Aviar. Comisión Permanente para el Control y Erradicación de la Pullorosis y Tifoidea Aviar. Monterrey, N.L. México 1987.

- 18.- Whiteman EC and Bicckford AA. Manual de Enfermedades de las Aves 2a. ed. Asociación Mexicana de Patólogos Aviáres, Kennett Square, Pennsylvania 1983.
- 19.- Cox NA, Baily JS, Blankenship LC, Meinersmann RJ, Stem RJ and McHan F. Fifty percent colonization dose for *Salmonella typhimurium* administered orally and intracloacally to young broiler chicks. Poultry Sci. 1990; 69: 1809-1812.
- 20.- Sorvari R, Naukkarinen A and Sorvari TE. Anal sucking-like movements in the chicken and chick embryo followed by the transportation of environmental material to the bursa of Fabricius, caeca and tonsils. Poultry SCI. 1977; 56: 1426-1429.
- 21.- Ohi ME and Miller SI. Salmonella: A model for bacterial pathogenesis. Annu. Rev. Med. 2001; 52: 259-74.
- 22.- Corrier DE, Nisbet JD, Hollister GA, Beier RC, Scalan MC *et al.* Resistance against *Salmonella enteritidis* cecal colonization in leghorn chicks by vent lip application of cecal bacteria culture. Poultry Sci. 1994; 73: 648-652.
- 23.- Barnes EM and Impery CS. Competitive exclusion of *Salmonella* from the newly hatched chick. Vet. Rec. 1980; 106: 61-62.
- 24.- Pjescak M. On biological effects of lactose in layers. Act. Zootech. 1970; 21:122-130.
- 25.- Padrón NM. Bacteriología y Serología Diagnóstica de Tifoidea Aviar. Curso sobre Diagnóstico de Laboratorio para la Campaña de Enfermedad de Newcastle y Salmonelosis Aviar. México, DF. 1993. ANECA, México, 1993.
- 26.- Gillingham S. Algunos aspectos del control de *Salmonella enteritidis*. Memorias XVII Convención Anual de Especialistas en Ciencias Avícolas. Puerto Vallarta, Jal. México, 83-94, 1992.
- 27.- Barrow PA, Huggins M and Lovell MA. Host specificity of *Salmonella* infection in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial system. Infect Immun. 1994; 62: 4602-4610.
- 28.- Vidal S, Tremblay ML, Govoni G, Gauthier S, Sebastiani G, Malo D, Skamene E, Olivier M, Jothy S and Gros P. The *Ity/Lsh/Bcg* locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. J. Exp. Med. 1995; 182: 655-666.
- 29.- Wigley P, Berchieri Jr. A, KL, Smith AL and Barrow PA. *Salmonella enterica* serovar pullorum persists in splenic macrophages and in the reproductive tract during persistent disease-free carriage in chickens. Infect Immun. 2001; 69: 7873-7879.
- 30.- Kaiser P, Rothwell L, Galyov EE, Barrow PA, Burnside J and Wigley P. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis* and *S. gallinarum*. Microbiology. 2000;146: 3217-3226.
- 31.- Minga UM. A disc ELISA for the detection of *Salmonella* group D antibodies in poultry. Res. Vet. Sci. 1992; 52: 384-386.
- 32.- Nicholas RAJ and Cuellan GA. Development and application of an ELISA for detecting antibodies to *Salmonella enteritidis* in chicken flocks. Vet. Rec. 1991; 128: 74-76.
- 33.- Vázquez NJ, Huerta L, Suárez GF, Quintana JA, Puente JL, Calva E y Verdugo-Rodríguez A. Utilización de proteínas de la membrana externa de *Salmonella gallinarum* en ELISA para el diagnóstico de Tifoidea Aviar. IV Jornada Médico Avícola. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, México DF. 1993.

- 34.- Verdugo-Rodríguez A and Calva E.** Denaturing treatment of *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations for improved immunodiagnosis of typhoid fever. *Asi. Pac. J Mol Biol Biotech.* 1993; 1: 113-116.
- 35.- Verdugo-Rodríguez A.** Respuesta inmune humoral específica contra preparaciones de proteínas de la membrana externa de *Salmonella typhi*. Tesis de Doctorado. Colegio de Ciencias y Humanidades, Instituto de Biotecnología. Cuernavaca, UNAM. Morelos 1993.
- 36.- Verdugo-Rodríguez A, Lay-Harn Gam, Devi S, Koh CL, Puthuchaery SD, Calva E and Pang.** Detection of antibodies against *Salmonella typhi* outer membrane protein (OMP) preparations in typhoid fever patients. *Asi. Pac. J. Aller. and Immu.* 1993a; 11: 45-52.
- 37.- Verdugo-Rodríguez A, López Y, Puente JL, Ruíz-Palacios GM and Calva E.** Early diagnosis of typhoid fever by an enzyme immunoassay using *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1993b; 12: 248-254.
- 38.- Rahn K, et al.** Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol Cell Prob.* 1992; 6: 217-179.
- 39.- Tuchili LM, Kodama H, Izumoto Y, Mukamoto M, Fukata and Baba T.** Detection of *Salmonella gallinarum* and *Salmonella typhimurium* DNA in experimentally infected chicks by PCR. *J. Vet. Med. Sci.* 1995; 57: 59-63.
- 40.- Smith HW.** The use of live vaccines in experimental *Salmonella gallinarum* infection in chickens whit observation on their interference effect. *J. Hyg.* 1956; 54: 419-432.
- 41.- Zhang-Barber L, Turner AK and Barrow PA.** Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. *Vaccine.* 1999; 17: 2538-2545.
- 42.- Bouzoubaa K, Nagaraja KV, Newman JA and Pomeroy BS.** Use of membrane proteins from *Salmonella gallinarum* for prevention of fowl typhoid infection in chickens. *Avian Dis.* 1987; 31: 699-704.
- 43.- Barrow PA.** Immunity to experimental fowl typhoid in chickens induced by a virulence plasmid-cured derivative of *Salmonella gallinarum*. *Infect. Immun.* 1990; 58: 2283-288.
- 44.- Griffin HG and Barrow PA.** Construction of an *aroA* mutant of *Salmonella* serotype *gallinarum*: its effectiveness in immunization against experimental fowl typhoid. *Vaccine* 1993; 11: 457-462. Sirard
- 45.- Zhang-Barber L, Turner AK, Dougan G and Barrow PA.** Protection of chickens against experimental fowl typhoid using a *nuoG* mutant of *Salmonella* seroytpe *gallinarum*. *Vaccine* 1998; 16: 899-903.
- 46.- Smith HW, Tucker JF and Lovell M.** Furazolidone resistance in *Salmonella gallinarum*. The relationship between *in vitro* determinations of resistance *J. Hyg. (Camb)* 1981; 87: 71-81.
- 47.- Mosqueda TA.,** Salmonelosis en pollo de engorda. I Jornada Médico Avícola. México, DF 1990. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, México 1990.
- 48.- Hultgren SJ, Jones CH and Normark S.** Bacterial adhesion and their assembly. In Neidhardt, FC *et al* eds. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. ASM Press 1996: 2730-2756.
- 49.- Low D, Braten B and Woude M.** Fimbriae. In Neidhardt, FC *et. al.*, editores. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. ASM Press 1996: 146-157.

- 50.- Altmeyer RM, McNerm JK, Bossio JC, Rosenshine I, Finlay BB and Galán JE.** Cloning and molecular characterization of a gene involved in *Salmonella* adherence and invasion of cultured epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 1993; 7: 89-98.
- 51.- Galán JE and Sansonetti PJ.** Molecular and cellular bases of *Salmonella* and *Shigella* interactions with host cells. In Neidhardt, FC *et al* eds. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. ASM Press 1996: 2757-2799.
- 52.- Porter SB and Curtiss III R.** Effect of *inv* mutation on *Salmonella* virulence and colonization in 1-day-old White Leghorn chicks. *Avian Dis.* 1997; 41: 45-57.
- 53.- Watson PR, Galyov EE, Paulin SM, Jones PW and Wallis TS.** Mutation of *invH*, but not *stn* reduces *Salmonella*-induced enteritis in cattle. *Infect Immun.* 1998; 66: 1432-1438.
- 54.- Balcázar QJ.** Determinación de la existencia de un gen para una enterotoxina LT-like en *Salmonella gallinarum*. Tesis de Licenciatura. México, DF.: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1993.
- 55.- Verdugo-Rodríguez A, Balcázar J, Urquiza BO, Suárez GF, Quintana LA, Calva E and López-Vidal Y.** Partial characterization of a *eltA*-like gene. Bangkok, Thailand 1994. 65th. Second Asia-Pacific Symposium on Typhoid Fever and other Salmonellosis. Bangkok, Thailand 1994.
- 56.- Vázquez NJ, López VY, Suárez GF y Verdugo-Rodríguez A.** Clonación y expresión de los genes que codifican para una enterotoxina similar a LT de *Salmonella gallinarum*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología.* 1999; 19: S63 Congreso Anual de la AMIMC 1999.
- 57.- Urquiza O.** Purificación y caracterización parcial de proteínas con actividad enterotóxica tipo CT de *Salmonella gallinarum*. Tesis de Maestría. México, DF.: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1995.
- 58.- Galyov EE, Wood MW, Rosqvist R, Mullan PB, Watson PR, Hedges S and Wallis TS.** A secreted effector protein of *Salmonella dublin* is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa. *Mol. Microbiol.* 1997; 25: 903-912.
- 59.- Hong KH and Miller VL.** Identification of a novel *Salmonella* invasion locus homologous to *Shigella ipgDE*. *J Bacteriol.* 1998; 180: 1793-1802.
- 60.- Jones MA, Wood MW, Mullan PB, Watson PR, Wallis TS and Galyov EE.** Secreted effector proteins *Salmonella dublin* act in concert to induce enteritis. *Infect. Immun.* 1998; 66: 5799-5804.
- 61.- Cotter PA and DiRita VJ.** Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000; 54: 519-65.
- 62.- Miroid, S et al.,** *Salmonella* host cell invasion emerged by acquisition of a mosaic of separate genetic elements, including *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1), SPI5 and *sopE2*. *J Bacteriol.* 2001;183: 2348-58.
- 63.- Eckmann L, Kagnoff MF and Fierer J.** Epithelial cells secrete the chemokine IL8 in response to bacterial entry. *Infect. Immun.* 1993; 61:4569-4574.
- 64.- McCormick BA, Parkos CA, Colgan SP, Carnes DK and Madara JL.** Apical secretion of a pathogen-elicited epithelial chemoattractant activity in response to surface colonization of intestinal epithelial by *Salmonella typhimurium*. *J. Immunol.* 1998; 160: 455-466.

- 65.- Gewirtz AT, Siber AM, Madara JL and McCormick BA:** Orchestration of neutrophil movement by intestinal epithelial cells in response to *Salmonella typhimurium* can be uncoupled from bacterial internalization. *Infect. Immun.* 1999; 67: 608-617.
- 66.- Jung HC, et al.** A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest.* 1995; 95:55-65.
- 67.- Hobbie, S, Chen LM, Davis RJ and Galán JE.** Involvement of the mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal cells. *J. Immunol.* 1997; 159: 5550-5559.
- 68.- Hardt WD, Chen LM, Schuebel KE, Bustelo XE and Galán JE.** *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* 1998a; 93: 815-826.
- 69.- Hardt WD, Henning U and Galán JE.** A substrate of the centisoma 63 type III protein secretion system of *Salmonella typhimurium* is encoded by cryptic bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998b; 95: 2574-79.
- 70.- Murray RA and Lee CA.** Invasion genes are not required for *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* to breach the intestinal epithelium: evidence that *Salmonella* pathogenicity island 1 has alternative functions during infection. *Infect. Immun.* 2000; 68: 5050-5055.
- 71.- Siebers A and Finlay BB.** M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. *Trend. Microbiol.* 1996; 4: 22-28.
- 72.- Kernéis S, Bogdanova A, Kraehenbuhl JP and Pringault E.** Conversion by Peyer's Patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science* 1997; 277: 949-952.
- 73.- Jepson MA and Clark MA.** Studying M cell and their role in infection. *Trend. Microbiol.* 1998; 6:359-365.
- 74.- Jensen VB, Harty JT and Jones, B.** Interactions of the invasive pathogens *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and *Shigella flexneri* with M cells and murine Peyer's patches. *Infect. Immun.* 1998; 66: 3758-3766.
- 75.- Ernst RK, Guina T and Miller SI.** How intracellular bacteria survive: surface modifications that promote resistance to host innate immune responses. *JID.* 1999;179: S326-30.
- 76.- Chen LM, Kaniga K and Galán JE.** *Salmonella* spp. are cytotoxic for cultured macrophages. *Mol Microbiol.* 1996a; 21: 1101-1115.
- 77.- Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S and Zychlinsky.** The *Salmonella* invasion SipB induces macrophages apoptosis by binding to caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 2396-2401.
- 78.- Monack DM, Raupach B, Hromockyj A and Falkow S.** *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 9833-9838.
- 79.- Lundberg U, Vinatzer U, Berdnik D, Gabain A and Baccarini M.** Growth phase-regulated induction of *Salmonella*-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes. *J Bacteriol.* 1999;181: 3433-37.
- 80.- Santos RL, Tsolis RM, Bäumlér AJ, Smith III R and Adams LG.** *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* induces cell death in bovine monocyte-derived macrophages by early

- sip-B* dependent and delayed *sip-B* independent mechanisms. Infect Immun. 2001; 69: 2293-2301.
- 81.- Vazquez-Torres A., Jones-Carson J, Bäumlner AJ, Falkow S, Valvidia R, Brown W, Le M, Berggren R, Parks WT and Fang FC.** Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. Nature. 1999; 401: 804-808.
- 82.- Galán JE.** Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. Mol. Microbiol. 1996; 20: 263-271.
- 83.- Finlay BB and Cossart P.** Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. Science 1997; 276: 718-725.
- 84.- Zhou D, Mooseker MS and Galán JE.** Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. Science 1999; 283: 2092-2095.
- 85.- Galán JE and Collmer A.** Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. Science 1999; 284: 1322-1328.
- 86.- Fu Y and Galán JE** A *Salmonella* protein antagonizes Rac-1 and CDC42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. Nature 1999; 401: 293-297.
- 87.- Wood MW, Rosqvist R, Mullan PB, Edwards MH and Galyov EE.** SopE, a secreted protein of *Salmonella dublin*, is translocated into the target eukaryotic cell via a *sip*-dependent mechanism and promotes bacterial entry. Mol. Microbiol. 1996; 22: 327-338.
- 88.- Stender S, Friebel A, Linder S, Rohde M, Miold S and Hard WD.** Identification of SopE2 from *S. typhimurium*, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell. Mol. Microbiol. 2000; 36: 1206-21.
- 89.- Bakshi CS, Singh VP, Wood MW, Jones Pw, Wallis TS and Galyov EE.** Identification of SopE2, a *Salmonella* secreted protein which is highly homologous to SopE and involved in bacterial invasion of epithelial cells. J Bacteriol. 2000; 182: 2341-2344.
- 90.- Fu Y and Galán JE.** The *Salmonella typhimurium* tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cell and disrupts the actin cytoskeleton. Mol. Microbiol. 1998; 27: 359-368.
- 91.- Kaniga K, Uralil J, Bliska JA and Galán JE.** Secreted protein tyrosine phosphates with modular effectors domains in the bacterial pathogen *Salmonella*. Mol Microbiol 1996; 21: 633-641.
- 92.- Eichelberg K and Galán J.** Differential regulation of *Salmonella typhimurium* type III secreted proteins by SPI-1 encoded transcriptional activators InvF and HilA. Infect Immun. 1999; 67: 4099-4105.
- 93.- Galán, JE:** *Salmonella* entry into mammalian cells: different yet converging signal transduction pathways. Trends. Cell. Biol. 1994; 4: 196-199.
- 94.- Elsinghorst EA, Baron LS and Kopecko DJ.** Penetration of human intestinal epithelial cells by *Salmonella* molecular cloning and expression of *Salmonella typhi* invasion determinants in *E. coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989; 86: 5173-5177.
- 95.- Chen LM, Hobbie S and Galán JE.** Requirement of CDC42 for *Salmonella*-induced cytoskeletal and nuclear responses. Science 1996b; 274: 2115-2118.
- 96.- Sirard JC, Niedergang F and Kraehenbuhl JP.** Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines. Immunol. Rev. 1999; 171: 5-26.
- 97.- Ginocchio CC, Olmsted SB, Wells CL and Galan JE.** Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on *Salmonella typhimurium*. Cell 1994; 76: 717-724.

- 98.- Collazo CM and Galán JE.** The invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium* directs the translocation of Sip proteins into the host cell. *Mol. Microbiol.* 1997; 24: 747-756.
- 99.- Eichelberg K, Ginocchio CC and Galán JE.** Molecular and functional characterization of the *S. typhimurium* invasion genes *invB* and *invC*: homology of InvC to the FoF1 ATPase family of proteins. *J. Bacteriol.* 1994; 176: 4501-4510.
- 100.- Lee CA.** Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eukaryotic cells? *Trend. Microbiol.* 1997; 5:148-155.
- 101.- Galán JE and Curtiss III R.** Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86: 6383-6387.
- 102.- Blanc-Potard AB, Solomon F, Kayser J and Groisman EA.** The SPI-3 pathogenicity of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol.* 1999; 181: 998-1004.
- 103.- Marcus SL, Brummell JH, Pfeifer CG and Finlay BB.** *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and infection.* 2000; 2: 145-156
- 104.- Groisman EA and Ochman H.** The path to *Salmonella*. *Features.* 2000; 66: 21-27.
- 105.- Groisman EA and Ochman H.** How *Salmonella* became a pathogen. *Trends. Microbiol.* 1997; 5: 343-348.
- 106.- Clark MA, Hirst BH and Jepson MA.** Inoculum composition and *Salmonella* pathogenicity island 1 regulate M-cell invasion and epithelial destruction by *S. typhimurium*. *Infect Immun.* 1998; 66: 724-731.
- 107.- Hensel M et al.** Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol. Microbiol.* 1998; 30: 163-174.
- 108.- Valvidia RH and Falkow S:** Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science* 1997; 277: 2007-2011.
- 109.- Ochman H and Groisman EA:** Distribution of Pathogenicity Island in *Salmonella* spp. *Infect. Immun.* 1996a 64: 5410-5412
- 110.- Shea JE, Hensel M, Gleeson C and Holden DW.** Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 2593-2597.
- 111.- Hensel M, et. al.** Functional analysis of *ssaJ* and the *ssaK/U* operon, 13 genes encoding components of the type III secretion apparatus of *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol.* 1997; 24:155-167.
- 112.- Lee AK, Detweiler CS and Falkow S.** Omp regulates the two-component system SsrA-SsrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J Bacteriol.* 2000; 182: 771-781.
- 113.- Beuzón CR, Unsworth KE and Holden WD.** In vivo genetic analysis indicates that PhoP-PhoQ and the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system contribute independently to *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* virulence. *Infect. Immun.* 2001; 69: 7254-7261.
- 114.- Klein JR and Jones BD.** *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded proteins SseC and SseD are essential for virulence and are substrates of the type III secretion system. *Infect Immun.* 2001; 69:737-743.
- 115.- Miao EA , et. al.** *Salmonella typhimurium* leucine-rich repeat proteins are targeted to the SPI1 and SPI2 type III secretion systems. *Mol Microbiol.* 1999; 34:850-864.

- 116.- Buchmeier NA, Heffron F.** Intracellular survival of wild-type *Salmonella typhimurium* and macrophages-sensitive mutants in diverse populations of macrophages. *Infect. Immun.* 1989;13: 1-17.
- 117.- Ochman H, Soncini FC, Solomon F and Groisman EA.** Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996b; 93: 7800-7804.
- 118.- Uchiya K, Barbieri MA, Funato K, Shah AH, Stahl PD and Groisman EA.** A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. *EMBO J.* 1999; 18: 3924-1999.
- 119.- Deiwick J, Nikolaus T, Shea JE, Gleeson C, Holden DW and Hensel M.** Mutations in *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI2) genes affecting transcription of SPI1 genes and resistance to antimicrobial agents. *J Bacteriol.* 1998; 180: 4775-80.
- 120.- Wood MW, Jones MA, Watson PR, Hedges S, Wallis TS and Galyov EE.** Identificación of pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Mol Microbiol.* 1998; 29: 883-891.
- 121.- DeVinney R, Steele-Mortimer O and Finlay BB.** Phosphatases and kinases delivered to the host cell by bacterial pathogens. *Trends Microbiol.* 2000; 8: 29-33.
- 122.- Knodler LA, Celli J, Hard WD, Vallance BA, Yip C and Finlay BB.** *Salmonella* effectors within a single pathogenicity island are differentially expressed and translocated by separate type III secretion systems. *Mol. Microbiol.* 2002; 43: 1089-1103.
- 123.- Hacker J and Kaper JB.** Pathogenicity island and the evolution of microbes. *Annul Rev Microbiol.* 2000; 54: 641-679.
- 124.- Thanassi DG and Hultgren.** Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Current Opinión in Cell Biol.* 2000;12: 420-430.
- 125.- Kubori T et al.** Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* 1998; 280: 602-605.
- 126.- Klein JR, Fahlen TF and Jones BD.** Transcriptional organization and function of invasion genes within *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* pathogenicity island 1, including the *prgH*, *prgI*, *prgJ*, *prgK*, *orgA*, *orgB* and *orgC* genes. *Infect Immun.* 2000; 68: 3368-3376.
- 127.- Sukhan A.** The invasion-associated type III secretion system of *Salmonella typhimurium*: common and unique features. *CMLS.* 2000; 57: 1033-1049.
- 128.- Galán JE.** *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001; 17: 53-86.
- 129.- Kimbrough TG and Miller SI.** Assembly of the type III secretion needle complex of *Salmonella typhimurium*. *Microbes and Infection.* 2002; 4:75-82
- 130.- Ginocchio C, Pace J and Galán JE.** Identification and molecular characterization of a *Salmonella typhimurium* gene involved in triggering the internalization of salmonellae into cultured epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 5976-5980.
- 131.- Kaniga K, Bossio JC and Galán JE.** The *S. typhimurium* invasion genes *invF* and *invG* encode homologues of the AraC and PulD family of proteins. *Mol. Microbiol.* 1994; 13: 555-68.
- 132.- Collazo CM, Zierler, MK, Galán JE.** Functional analysis of *Salmonella typhimurium* invasión genes *invI* and *invJ* and identification of a target of the protein secretion apparatus encoded in the *inv* locus. *Mol. Microbiol.* 1995; 15: 25-38.

- 133.- Zierler MK and Galán JE.** Contact with cultured epithelial cells stimulates secretion of *Salmonella typhimurium* invasion protein InvJ. *Infect Immun.* 1995; 63: 4024-4028.
- 134.- Goosney DL, Knoechel DG and Finlay BB.** Enteropathogenic *E. coli*, *Salmonella* and *Shigella*: Master of host cell cytoskeletal exploitation. *Emerging Infectious Diseases* 1999; 5: 216-223.
- 135.- Clark CG, MacDonald LA, Ginocchio CC, Galán JE and Johnson RP.** *S. typhimurium* InvA expression probed with a monoclonal antibody to the C-terminal peptide of InvA. *FEMS Microbiol. Letters.* 1996a; 136: 263-268.
- 136.- Ginocchio CC and Galán JE.** Functional conservation among members of the *S. typhimurium* InvA family of proteins. *Infect. Immun.* 1995; 63: 729-732.
- 137.- Boyd EF, Li J, Ochman H and Selander RK.** Comparative genetics of the *inv-spa* invasion genes complex of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* 1997; 179: 1985-1991.
- 138.- Galán JE, Pace J and Hayman MJ.** Involvement of the epidermal growth factor receptor in the invasion of cultured mammalian cells by *Salmonella typhimurium*. *Nature* 1992a; 357: 588-589.
- 139.- Tartera C and Metcalf ES.** Osmolarity and growth phase overlap in regulation of *Salmonella typhi* adherence to and invasion of human intestinal cells. *Infect. Immun* 1993; 61:3084-3089.
- 140.- Galán JE and Curtiss III R.** Distribution of the *invA*, *-B*, *-C* and *-D* genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. *Infect. Immun.* 1991; 59: 2901-2908.
- 141.- Galán JE, Ginocchio CC and Costeas P.** Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of InvA to members of a new protein family. *J. Bacteriol.* 1992b; 174: 4338-4349.
- 142.- Clark MA, Reed KA, Lodge J, Stephen J, Hirst BH and Jepson MA.** Invasion of murine intestinal M cells by *Salmonella typhimurium inv* mutants severely deficient for invasion cultured cells. *Infect. Immun* 1996b; 64: 4363-4368.
- 143.- Penheiter KL, Mathur N, Giles D, Fahien T and Jones BD.** Non-invasive *Salmonella typhimurium* mutants are avirulent because of an inability to enter and destroy M cells of ileal Peyer's patches. *Mol Microbiol.* 1997; 24:697-709.
- 144.- Jones BD and Falkow S.** Identification and characterization of a *S. typhimurium* oxygen-regulated gene required for bacterial internalization. *Infect. Immun.* 1994; 62: 3745-3752.
- 145.- Bäumler AJ, Tsolis RM, Valentine PJ, Ficht TA and Heffron F.** Synergistic effect of mutations in *invA* and *lpfC* on the ability of *Salmonella typhimurium* to cause murine typhoid. *Infect Immun.* 1997;65: 2254-2259.
- 146.- Lucas RL and Lee Ca.** Unravelling the mysteries of virulence gene regulation in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 2000; 36: 1024-33.
- 147.- Bajaj V, Hwang C and Lee CA.** *hilA* is a novel *ompR/toxR* family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. *Mol. Microbiol.* 1995; 18: 715-727.
- 148.- Lucas RL, Lostroh CP, Diruso CC, Spector MP, Waner BL and Lee CA.** Multiple factors independently regulate *hilA* and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *J. Bacteriol.* 2000; 182: 1872-1882.

- 149.- Rakeman JL, Bonifield HR and Miller SI.** A HILA-independent pathway to *S. typhimurium* invasion gene transcription. *J Bacteriol.* 1999;181: 3096-3104.
- 150.- Steele-Mortimer O, St-Louis M, Oliver M and Finlay BB.** Vacuole acidification not required for survival of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* within cultured macrophages and epithelial cells. *Infect. Immun.* 2000;68: 5401-04.
- 151- Finlay BB and Falkow S.** Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1997; 61: 136-169.
- 152.- Garcia del Portillo F, Zwick MB, Leung KY, Finlay BB.** *Salmonella* induces the formation of filamentous structure containing lysosomal membrane glycoproteins in epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 10544-10548.
- 153.- Garcia-del Portillo F, Finlay BB.** Targeting of *Salmonella typhimurium* to vesicles containing lysosomal membrane glycoprotein bypasses compartments with mannose 6-phosphate receptors. *J. Cell. Biol.* 1995; 129: 81-97.
- 154.- Mukherjee K, Siddiqi SA, Hashim S, Raje M, Basu SK and Mukhopadhyay.** Live *Salmonella* recruits NSF on phagosomal membrane and promotes fusion with early endosome. *J Cell Biol.* 2000; 148: 741-753.
- 155.- Méresse S, Steele-Mortimer O, Finlay BB and Gorvel JP.** The rab7 GTPase controls the maturation of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles in HeLa cells. *EMBO J.* 1999; 18: 4394-4403.
- 156.- Barrow PA and Simpson JM, Lovell MA and Binns MM.** Contribution of *Salmonella gallinarum* large plasmid toward virulence in fowl typhoid. *Infect. Immun.* 1987; 55: 388-392.
- 157.- Salyers AA and Whitt DP.** *Bacterial Pathogenesis. A molecular Approach.* American Society for Microbiology Press. Washington, DC, 1994.
- 158.- Guiney, DG.** Perspectives series: Host/pathogen interactions. Regulation of bacterial virulence genes expression by the host environment. *J. Clin. Invest.* 1997; 99: 565-568.
- 159.- Straaten T Van Der, et. al.** Novel *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* protein that is indispensable for virulence and intracellular replication. *Infect Immun.* 2001; 69: 7413-7418.
- 160.- Ausubel FM. et.al.** *Current protocols in Molecular Biology.* Vol I. 1996. Massachusetts General Hospital. Harvard Medical School.
- 161.- Alexeyev MF, Shokolenko IN and Croughan TP.** Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *E. coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene.* 1995; 160: 63-67.
- 162.- Edwards EA, Keller LH and Schifferli DM:** Improved allelic exchange vectors and their use to analyze 897 P fimbria gene expression. *Gene.* 1998; 207: 149-157.
- 163.- Kaniga K, Delor I and Cornelis GR.** A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of *bla* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene.* 1991; 109: 137-141.
- 164.- Cowan and Steel's.** *Manual for the identification of Medical Bacteria.* Barrow GI and Feltham RKA editor 3 ed. Cambridge University Press; 1995.p. 128-145.
- 165.- Henderson SC, Bounous DI and Lee MD.** Early events in the pathogenesis of avian salmonellosis. *Infect. Immun.* 1999; 67: 3580-3586.
- 166.- Barrow P and Lovell MA:** Invasion of Vero cells by *Salmonella* species. *J. Med Microbiol.* 1989; 28: 59-67.

- 167.- Schwan WR, Huang XZ, Hu L and Kopecko DJ.** Differential bacterial survival, replication, and apoptosis-inducing ability of *Salmonella* serovars within human and murine macrophages. *Infect. Immun.* 2000; 68: 1005-1013.
- 168.- Powell PC.** Immune mechanisms in infections of poultry. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1987; 15: 87-113.
- 169.- Old DC and Threlfall.** *Salmonella*. In: Collier L, Balows A, Sussman M, editores. Topley and Wilson's. *Microbiology and Microbial Infections Vol. 2 Systematic Bacteriology.* 9 ed. Gran Bretaña: Arnold London; 1998. p. 969-997.
- 170.- Holt GJ, Krieg KN, Sneath HA, Stally TJ, Williams TS.** *Bergey's Manual. Determinative Bacteriology.* Hensyl RW editor. 9 ed. LippincottWilliams and Wilkins; 2000.p. 242.
- 171.- Finlay BB, Gumbiner B and Falkow S.** Penetration of *Salmonella* through a polarized Madin-Darby canine kidney epithelial cell monolayer. *J Cell Biol.* 1988; 107: 221-230.
- 172.- Giannella RA, Washington O, Gemski P, Formal SB.** Invasión of HeLa cells by *S. typhimurium*: a model for study of invasiveness of *Salmonella*. *J Infect Dis.* 1973; 128: 69-75.
- 173.- Lui SL et al.,** *Infect. Immun.* 1988; 56: 1967-1973.
- 174.- Finlay BB and Falkow S.** *Salmonella* as intracellular parasite. *Mol Microbiol.* 1989; 3: 1833-1841.
- 175.- Lee CA and Falkow S.** The ability of *Salmonella* to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 1990; 87: 4304-4308
- 176.- Ernest NK, Dombroski DM, Merrick JM.** Anaerobiosis, type 1 fimbriae, and growth phase are factors that affect invasion of Hep-2 cells by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 1990; 58: 2014-2016.
- 177.- Schiemann DA and Schope S.** Anaerobic growth of *Salmonella typhimurium* results in increased uptake by Henle 407 epithelial and mouse peritoneal cells in vitro and repression of a major outer membrane protein. *Infect. Immun.* 1991; 59: 437-440.
- 178.- Behlau I and Miller SJ.** A Pho-P repressed gene promotes *Salmonella typhimurium* invasion of epithelial cells. *J Bacteriol.* 1993; 175: 4475-4484.
- 179.- Pegues DA, Hantman MJ, Behlau I and Miller I.** PhoP/PhoQ transcriptional repression of *Salmonella typhimurium* invasion genes: evidence for role in protein secretion. *Mol Microbiol.* 1995; 17: 169-181.
- 180.- Galán JE and Curtiss III R.** Expresión of *Salmonella typhimurium* genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. *Infect. Immun.* 1990; 58: 1879-1885.
- 181.- Lingren SW, Stojiljkovic I, Heffron F.** Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 4197-4201
- 182.- Velden AWH, Lindgren SW, Worley MJ y Heffron F.** *Salmonella* pathogenicity island 1-independent induction of apoptosis in infected macrophages by *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *Infect. Immun.* 2000; 68: 5702-5709.
- 183.- Datsenko KA and Wanner BL.** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 6640-6645.

APÉNDICE A

Preparación de los medios de cultivo y reactivos

Caldo A

Caldo nutritivo (Difco, USA)	7.0 g
Extracto de levadura (Bioxon, México)	1.0 g
Glicerol (Sigma, USA)	2.0 ml
Fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) (Baker, México)	3.1 g
Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) (Baker)	1.3 g

Caldo LB 0.3 M

Cloruro de sodio (Merck, Alemania)	20 g
Triptona (Difco)	10 g
Extracto de levadura (Bioxon)	5 g

Agar LB

Cloruro de sodio (Merck)	10 g
Triptona (Difco)	10 g
Extracto de levadura (Bioxon)	5 g
Agar (Merck)	20 g

Solución salina fosfatada (PBS)

Solución A

NaCl (Merck)	8.0 g
KCl (Baker)	0.2 g
Agua destilada	800 ml

Solución B

Fosfato de sodio (Na_2HPO_4 anhídrido) (Baker) o	1.15 g
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ (Baker)	2.17 g
KH_2PO_4 (Baker)	0.2 g
Agua destilada	200 ml

Las soluciones se esterilizaron en autoclave por separado, una vez frías se vació B en A.

Buffer de carga 6X glicerol

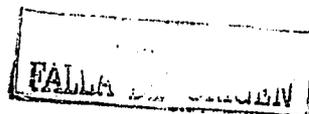
Azul de bromofenol sal sódica (Aldrich, USA)	1.5 ml
Xilyne Cyanol FF (Sigma)	1.5 ml
EDTA (Gibco) 5 mM pH 8	100 μ l
Glicerol (Sigma)	3 ml
Agua	3.9 ml

Buffer de electroforesis TAE

Solución 50X, pH 8.5:

242 g
57.1 ml
37.2 g

Tris base
Ácido acético gacial
 $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$



Aforar con agua a 1lt
 Solución de trabajo 1X
 40 mM
 2 mM

Tris acetato
 EDTA

APÉNDICE B
Análisis estadístico

1. Cinética de crecimiento de cepas de *S. gallinarum*

Valor p	0.0008	(p < 0.05)	
No. de grupos	6		
F	5.063		
ANDEVA	SC	gl	CM
Efecto de infección (entre columnas)	46260000000000000000	5	92520000000000000000
Individual (entre filas)	33570000000000000000	10	33570000000000000000
Residual (dentro columnas)	91370000000000000000	50	18270000000000000000
Total	47340000000000000000	65	
Prueba de Tukey			
cepa 415 LB 0.3M vs cepa 323LB 0.3M	-193900000	1.537	P > 0.05
cepa 415 LB 0.3M vs cepa U2 LB 0.3M	-76590000	0.6070	P > 0.05
cepa 415 LB 0.3M vs cepa 415	-318300000	2.523	P > 0.05
cepa 415 LB 0.3M vs cepa 383	-616400000	5.062	P < 0.01
cepa 415 LB 0.3M vs cepa U2	172800000	1.370	P > 0.05
cepa 323LB 0.3M vs cepa U2 LB 0.3M	117300000	0.9509	P > 0.05
cepa 323LB 0.3M vs cepa 415	-124400000	1.008	P > 0.05
cepa 323LB 0.3M vs cepa 383	-422500000	3.553	P > 0.05
cepa 323LB 0.3M vs cepa U2	366800000	2.972	P > 0.05
cepa U2 LB 0.3M vs cepa 415	-241800000	1.959	P > 0.05
cepa U2 LB 0.3M vs cepa 383	-539800000	4.540	P < 0.05
cepa U2 LB 0.3M vs cepa U2	249400000	2.021	P > 0.05
cepa 415 vs cepa 383	-298100000	2.507	P > 0.05
cepa 415 vs cepa U2	491200000	3.980	P > 0.05
cepa 383 vs cepa U2	789200000	6.637	P < 0.001

2. Porcentaje de invasión de *Salmonella* en células BAT.

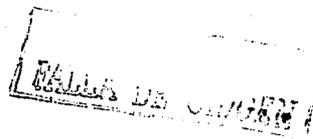
Valor p	P<0.0001	(p < 0.05)	
No. de grupos	3		
F	65.85		
ANDEVA	SC	gl	CM
Efecto de infección (entre columnas)	2.298	2	1.149
Residual (dentro columnas)	0.1047	6	0.01745
Total	2.403	8	
Prueba de Tukey			
<i>S. gallinarum</i> vs <i>S. typhimurium</i>	-1.034	13.56	P < 0.001
<i>S. gallinarum</i> vs <i>E. coli</i>	0.07213	0.9457	P > 0.05
<i>S. typhimurium</i> vs <i>E. coli</i>	1.106	14.50	P < 0.001

3. Porcentaje de invasión de *Salmonella* en células HeLa.

Análisis	<i>S. typhimurium</i> vs <i>S. gallinarum</i>
<i>Prueba t de Student</i>	
Valor p dos colas (p < 0.05)	0.0016
t, df	t=7.549 gl=4
Promedio ± SEM of <i>S. gallianrum</i>	1.152 ± 0.4388 N=3
Promedio ± SEM of <i>S. typhimurum</i>	5.538 ± 0.3810 N=3
Diferencia entre medias	-4.387 ± 0.5811
95% intervalo de confianza	2.774 a 6.000

4. Porcentaje de invasión de *Salmonella* en macrófagos J774.

Valor p	0.0176	(p < 0.05)	
No. de grupos	3		
F	8.541		
ANDEVA	SC	gl	CM
Efecto de infección (entre columnas)	608.9	2	304.4
Residual (dentro columnas)	213.9	6	35.64
Total	822.8	8	
Prueba de Tukey			
<i>S. gallinarum</i> vs <i>S. typhimurium</i>	-16.88	4.897	P < 0.05
<i>S. gallinarum</i> vs <i>E. coli</i>	1.089	0.3160	P > 0.05



<i>S. typhimurium</i> vs <i>E. coli</i>	17.97	5.213	P < 0.05
---	-------	-------	--------------------

5. Porcentaje de invasión de *Salmonella* en células BAT a las 2, 4 y 6 h.

Valor p	0.0034	(p < 0.05)		
No. de grupos	3			
F	16.93			
ANDEVA	SC	gl	CM	
Efecto de infección (entre columnas)	631100000	2	315500000	
Residual (dentro columnas)	111800000	6	186300000	
Total	742900000	8		
Prueba de Tukey	Dif. de medias	q	Valor de p	95% CI de dif
BAT 2 vs BAT 4	-7240	2.905	P > 0.05	-18050 to 3574
BAT 2 vs BAT 6	-20240	8.121	P < 0.01	-31050 to -9426
BAT 4 vs BAT 6	-13000	5.216	P < 0.05	-23810 to -2186

6. Porcentaje de invasión de *Salmonella* en células HeLa a las 2, 4 y 6 h.

Valor p	0.0004	(p < 0.05)	
No. de grupos	6		
F	11.05		
ANDEVA	SC	gl	CM
Efecto de infección (entre columnas)	260.0	5	51.99
Residual (dentro columnas)	56.49	12	4.707
Total	316.5	17	
Prueba de Tukey			
<i>S. gallinarum</i> 2 vs <i>S. typhimurium</i> 2	-4.525	3.612	P > 0.05
<i>S. gallinarum</i> 2 vs <i>S. gallinarum</i> 4	-1.238	0.9879	P > 0.05
<i>S. typhimurium</i> 2 vs <i>S. typhimurium</i> 4	-5.500	4.391	P > 0.05
<i>S. gallinarum</i> 4 vs <i>S. typhimurium</i> 4	-8.788	7.015	P < 0.01
<i>S. gallinarum</i> 4 vs <i>S. gallinarum</i> 6	2.257	1.802	P > 0.05
<i>S. typhimurium</i> 4 vs <i>S. typhimurium</i> 6	9.913	7.913	P < 0.01
<i>S. gallinarum</i> 6 vs <i>S. typhimurium</i> 6	-1.132	0.9039	P > 0.05

TECNOLOGÍA
FALLA DE ORIGEN

7. Porcentaje de fagocitosis en macrófagos J774 a la hora y dos horas postinfección.

ANDEVA	SC	gl	CM	F	F tablas p < 0.05
bacteria (cepa)	2367.90	3	789.30	5.28	4.26
Error dentro	1194.96	8	149.37		
total	3562.85				

Prueba de Tukey	Q	CMerror/2	(1/na+1/nb)	raiz(cme*1/na)	DMSH
	4.53	74.68	0.67	7.06	31.96
<i>S. gallinarum</i> 1 h vs <i>S. gallinarum</i> 2 h		p > 0.05			
<i>S. typhimurium</i> 1 h vs <i>S. typhimurium</i> 2 h		p < 0.05			
<i>S. gallinarum</i> 1 h vs <i>S. typhimurium</i> 1 h		p < 0.05			
<i>S. gallinarum</i> 2 h vs <i>S. typhimurium</i> 2 h		p < 0.05			

8. Porcentaje de muerte celular inducida *Salmonella* en macrófagos J774.

Valor p	P<0.0001	(p < 0.05)	
No. de grupos	9		
F	34.44		
ANDEVA	SC	gl	CM
Efecto de infección (entre columnas)	12240	8	1531
Residual (dentro columnas)	400.0	9	44.44
Total	12640	17	
Prueba de Tukey			
No infección 1 vs No infección 2	0.0000	0.0000	P > 0.05
No infección 2 vs No infección 3	-10.00	2.121	P > 0.05
<i>S. gallinarum</i> 1 vs <i>S. gallinarum</i> 2	-10.00	2.121	P > 0.05
<i>S. gallinarum</i> 2 vs <i>S. gallinarum</i> 3	-20.00	4.243	P > 0.05
<i>S. typhimurium</i> 1 vs <i>S. typhimurium</i> 2	-20.00	4.243	P > 0.05
<i>S. typhimurium</i> 2 vs <i>S. typhimurium</i> 3	-35.00	7.425	P < 0.01
No infección 1 vs <i>S. gallinarum</i> 1	-20.00	4.243	P > 0.05

TESIS DE GRADO
FALLA DE ORIGEN

No infección 1 vs <i>S typhimurium</i> 1	-30.00	6.364	P < 0.05
No infección 2 vs <i>S. gallinarum</i> 2	-30.00	6.364	P < 0.05
No infección 2 vs <i>S typhimurium</i> 2	-50.00	10.61	P < 0.001
No infección 3 vs <i>S. gallinarum</i> 3	-40.00	8.485	P < 0.01
No infección 3 vs <i>S typhimurium</i> 3	-75.00	15.91	P < 0.001
<i>S. gallinarum</i> 1 vs <i>S typhimurium</i> 1	-10.00	2.121	P > 0.05
No infección 1 vs <i>S typhimurium</i> 2	-50.00	10.61	P < 0.001
<i>S. gallinarum</i> 2 vs <i>S typhimurium</i> 2	-20.00	4.243	P > 0.05
<i>S. gallinarum</i> 3 vs <i>S typhimurium</i> 3	-35.00	7.425	P < 0.01

9. Porcentaje de apoptosis inducido por la infección de *Salmonella* en macrófagos J774.

Valor p	0.0083	(p < 0.05)		
No. de grupos	3			
F	35.10			
ANDEVA	SC	gl	CM	
Efecto de infección (entre columnas)	117.0	2	58.50	117.0
Residual (dentro columnas)	5.000	3	1.667	5.000
Total	122.0	5		122.0
Prueba de Tukey				
No infección vs <i>S. gallinarum</i>	-7.500	8.216	P < 0.05	
No infección vs <i>S typhimurium</i>	-10.50	11.50	P < 0.01	
<i>S. gallinarum</i> vs <i>S typhimurium</i>	-3.000	3.286	P > 0.05	

Trabaja con
FALLA DE ORIGEN