



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

01674
20

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LOS
GENES DEL OPERÓN DE LA FIMBRIA POLAR LARGA (*lpf*)
DE *Salmonella gallinarum*.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

ESTELA TERESITA MÉNDEZ OLVERA

TUTOR: DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ

COMITÉ TUTORAL:
DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
DR. JOSÉ LUIS PUENTE GARCÍA

MÉXICO, DF

2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
INTRODUCCIÓN	1
• Generalidades	1
• Adhesión	4
• Estructura molecular de las adhesinas fimbriales	5
• Sistema chaperona-acomodador	7
• Sistema general de secreción	8
• Sistema de nucleación-precipitación extracelular	9
• Sistema alterno de chaperonas	10
• <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC)	12
• Coordinación de señales en la adhesión	13
• Salmonelosis	14
• Fimbrias en <i>Salmonella</i>	24
HIPÓTESIS	27
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
MATERIAL Y MÉTODOS	28
• Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	28
• Cinéticas bacterianas	28
• Inoculación de embrión de pollo	29
• Extracción de ADN	30
• Oligonucleótidos	30
• Amplificación de los genes del operón <i>lpf</i>	31
• Hemoaglutinación en placa	32
• Cultivo celular	32
• Interpretación del ensayo de adherencia	33
RESULTADOS	36
• Cinética de desarrollo	36
• Inoculación en embrión de pollo	37
• Amplificación de los genes del operón <i>lpf</i>	40
• Análisis de Secuencias	44
• Hemoaglutinación en placa	52
• Cultivo celular	53
DISCUSIÓN	58
CONCLUSIONES	63
LITERATURA CITADA	64

Autoriza a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a publicar en formato electrónico e impreso el contenido de esta tesis profesional.

Asesora: Estela T. Méndez

Olvera

21.10.03

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2

RESUMEN.

El potencial patógeno de *Salmonella* o de cualquier enterobacteria depende en gran medida del reconocimiento y colonización de un nicho adecuado para que se desarrolle la enfermedad, este reconocimiento es generalmente mediado por adhesinas que se encuentran en la superficie del microorganismo. El género *Salmonella* incluye diferentes tipos de fimbrias, entre ellas a la descrita como "Long Polar Fimbriae" (lpf).

En este trabajo se han identificado los cinco genes que componen la región del operón *lpf* en *Salmonella gallinarum*, dichos genes presentan una alta identidad a nivel nucleotídico, como a nivel de aminoácidos con el operón *lpf* de *Salmonella typhimurium* y de *Escherichia coli* enterohemorrágica O157:H7.

Los ensayos de adherencia muestran que *S. gallinarum* presenta un patrón difuso de adherencia en células epiteliales tanto de carcinoma de laringe humano (Hep-2) como de carcinoma cervical humano (HeLa). Los ensayos de invasión en células Hep-2 y HeLa demostraron que *S. gallinarum* es capaz de invadir desde los primeros 5 minutos de infección y, a la vez, demostraron que la adherencia es un paso primordial para que se dé la invasión.

(*Salmonella gallinarum*, fimbria polar larga, adherencia, invasión)

Este trabajo fue financiado por los siguientes proyectos:

- Desarrollo de herramientas moleculares para el control de la Salmonelosis aviar.
Fase III. PAPIIT, IN-223398.
- Desarrollo de herramientas moleculares para el control de la Salmonelosis aviar.
CONACYT, No. 27669-B.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABSTRACT.

The pathogenic potential of *Salmonella* or any other enteric bacteria, depends on the ability to recognize and colonize unique niches along the intestine. This event is mainly based on receptor distribution and environmental signals leading to the expression of specific adherence factors.

Salmonella possess multiple fimbriae, many of which play critical roles in attachment to epithelial cell surfaces. In this work, we have identified in *Salmonella gallinarum* an operon consisting of five genes, *lpfABCDE*, these genes are closely related to the long polar fimbriae operon of *Salmonella typhimurium* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, as in gene order as in conservation of the deduced amino acid sequences.

Adherence assays showed that *S. gallinarum* had a diffuse pattern of attachment to HeLa and Hep-2 epithelial cells. On the other hand, invasion assays showed that *S. gallinarum* is able to invade since the first five minutes of infection and that attachment to the host epithelium is an initial step of pathogenesis.

(*Salmonella gallinarum*, long polar fimbriae, adherence, invasion)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4

INTRODUCCIÓN

Generalidades

La sobrevivencia de microorganismos en diferentes nichos es dependiente entre otros factores de su habilidad para adherirse a superficies o sustratos. El proceso de adhesión implica una interacción entre moléculas complementarias en las superficies involucradas, la del microorganismo por una parte y el sustrato por otra. Dado lo anterior, el desarrollo de estructuras especializadas para la adhesión es un proceso fundamental en todas las células, aun en las patógenas¹.

Las bacterias patógenas ensamblan sobre su superficie, estructuras de virulencia que sirven como organelos que les permiten adherirse². La adherencia de la bacteria a las células epiteliales del hospedador es un importante evento en la patogénesis de infecciones intestinales, respiratorias y del tracto urinario³.

La capacidad de adhesión de estos organelos está determinada por proteínas especializadas llamadas adhesinas. Las adhesinas tienen una estructura que les permite reconocer moléculas presentes en las células del hospedador, llamadas receptores, con una especificidad estereoquímica. Esta especificidad entre adhesinas y receptores tiene un papel importante en determinar el tropismo de hospedero y tejido en diversas bacterias patógenas^{1,2,4 y 5}.

Durante su evolución, las bacterias han desarrollado complejos y variados mecanismos para presentar adhesinas a receptores eucariotes, que promueven la unión y colonización de mucosas y en muchos casos la subsecuente invasión de esos tejidos. Apéndices

extracelulares largos, que semejan cabellos son producidos por la mayoría de los microorganismos patógenos Gram negativos, dichas estructuras son llamadas fimbrias o pilis y median la unión de un gran número de bacterias patógenas^{6,7}.

El nombre de estas estructuras se le atribuye a Dungeid, quien en 1955 observó en *E. coli* apéndices largos a los cuales llamo *fimbriae*, del latín fiber que quiere decir hilo. En 1959, Brinton sugirió el nombre de pill (del latín que describe a estructuras con forma de cabello) para estructuras no flagelares en *E. coli*, a la fecha ambos términos se continúan empleando y frecuentemente significan lo mismo. La palabra fimbria parece ser más aceptada actualmente. La palabra pilus (singular de pili) es ahora usada más comúnmente para describir los filamentos formados en la conjugación bacteriana^{1,2}.

No sólo las bacterias Gram negativas forman fimbrias, también las bacterias Gram positivas pueden hacerlo¹. La diferencia radica en donde está unida dicha estructura, para el caso de las bacterias Gram positivas dicha estructura está unida y ensamblada desde la membrana citoplasmática^{2,8}. En las bacterias Gram negativas esta estructura puede ensamblarse en la membrana citoplasmática (pili tipo IV) o en la membrana externa (long polar fimbriae, bundling-forming pili, etc)^{10,11}.

Aunque adhesinas afimbriales han sido descritas, incluso algunas son secretadas en formas solubles para después unirse con la bacteria, la adhesión de las bacterias a las células del hospedador está principalmente mediada por fimbrias o pilis¹.

Desde su descubrimiento, diversos trabajos se han realizado para la clasificación de estas estructuras. Duguin *et al* en 1966 sugirieron que las fimbrias de las bacterias Gram negativas fueran clasificadas en tipos de acuerdo a su forma y su patrón de hemoaglutinación. De esta

forma, las fimbrias tipo 1 comprenden fimbrias rígidas con un patrón de hemoaglutinación sensible a manosa (ver mas adelante); las fimbrias tipo 2, las cuales están serológicamente relacionadas con las fimbrias tipo I pero no producen hemoaglutinación; las fimbrias tipo 3 que se refiere a las fimbrias resistentes a manosa, flexibles que son comunes en las Enterobacteriaceae, salvo en *E. coli* y *Shigella* spp.; las fimbrias tipo 4 son aquellas que poseen una N-metilfenilalanina en su extremo aminoterminal de la subunidad principal; y las fimbrias tipo 5 que son manosa resistentes, más delgadas que el tipo 1 y se encuentran comúnmente pocas por célula. En los años noventas Orskov y Orskov propusieron un nuevo esquema basándose en la morfología y marcadores serológicos, grupo fimbrial I son aquellas que son rígidas (aproximadamente 7 nm de diámetro) en las cuales la subunidad principal es distinta de la subunidad que media la adhesión, grupo fimbrial II comprenden estructuras delgadas y flexibles (< 7 nm en diámetro) que frecuentemente aparecen como cápsula a través de microscopía electrónica y usualmente la subunidad mayor también funciona como una adhesina. La serotipificación dentro del grupo I y el grupo II clasifica fimbrias individualmente^{1,2,9}. Finalmente existe una clasificación la cual se basa en la forma en que las fimbrias son ensambladas en la superficie bacteriana, de esta clasificación se hablará más adelante.

Las fimbrias son estructuras heteropoliméricas. El cuerpo de la fimbria está compuesto de alrededor de 1000 monómeros idénticos, conocidos como subunidades principales y de 1 a 10 subunidades menores distintas. Las subunidades principales o una de las subunidades menores pueden servir como adhesinas, mientras que otras subunidades, comúnmente más grandes, se encuentran localizadas en la base de las fimbrias intercaladas entre la membrana citoplasmática bacteriana sirviendo como proteínas de anclaje de la fimbria a la misma. La microscopía electrónica ha revelado que las fimbrias pueden variar de diámetro y largo. La longitud de las fimbrias puede ser hasta de 10 μm y el diámetro de 1 hasta de 11 nm, aunque

esto puede ser efecto del procedimiento de purificación de la fimbria y el poder de resolución del microscopio electrónico^{1,2,10}.

Existen otras estructuras que median también la adhesión bacteriana. Entre estas se encuentran el lipopolisacárido, proteínas de la membrana externa, peptidoglicano, ácidos teicoicos, ácidos teicurónicos, flagelo, cápsulas y capas S, lo cual nos hace pensar en el importante papel que tiene la adherencia en la sobrevivencia bacteriana¹.

Adhesión.

El primer paso en la adhesión bacteriana es la unión inmediata de la bacteria con el sustrato, lo cual es un proceso reversible¹¹. La adhesión de un microorganismo a una superficie está determinada por las propiedades fisicoquímicas de la superficie de la bacteria. Si el acercamiento a la superficie es desfavorable, la bacteria debe romper esta barrera de energía para establecer contacto directo con la superficie. Sólo cuando la bacteria esta en una estrecha proximidad con la superficie, las interacciones pueden ser significativas. Entonces los eventos de proteína-ligando mediados por las adhesinas bacterianas y en algunos casos la producción de polímeros extracelulares, dan como resultado una adhesión casi irreversible¹¹.

La atracción o repulsión bacteriana inicial a una superficie puede ser descrita en términos de interacciones coloidales, consecuentemente la fuerza de la interacción depende de parámetros fisicoquímicos como energía libre de superficie y densidad de carga. La propensión de la bacteria para adherirse a superficies ha sido analizada contabilizando las bacterias que permanecen unidas a superficies después de una incubación por un tiempo determinado^{1,11,12}. También se ha empleado la microscopía electrónica con métodos como la tinción negativa, en la cual un compuesto con una densidad alta de electrones (número

atómico alto) es mezclado con la muestra a analizar. Estructuras como fimbrias, flagelos, cápsulas, capas S, membranas y peptidoglicano, pueden ser identificados con esta técnica, incluso es posible determinar que estructuras de la superficie están en contacto directo con el sustrato. La resolución con esta técnica es de aproximadamente 2 nm. Otra técnica usada es la unión de bacterias a octyl-sepharosa u otros hidrocarburos unidos a perlas^{1,12,13}.

Estos estudios han permitido establecer que la hidrofobicidad está involucrada en varios fenómenos de adhesión bacteriana, incluso se han podido establecer los siguientes rangos:

HIDROFÍLICO



HIDROFÓBICO

Ácidos teicolcos y teicurónicos.
Cápsula.
Peptidoglicano.
Lipopolisacárido.
Ácido lipoteicoico.
Fimbrias.
Flagelo.
Proteínas de la membrana externa.

Finalmente, la adhesión entre receptor y adhesinas está determinada por interacciones Coloumbicas (interacciones iónicas), por puentes de hidrógeno, por interacciones hidrofóbicas y por una compleja coordinación de iones multivalentes. No hay otras fuerzas conocidas involucradas en la adhesión^{1,2,12}.

Estructura molecular de las adhesinas fimbriales.

En 1977 Ofek ¹ sugirió que proteínas con propiedades de lectinas podían funcionar como adhesinas. Tiempo después se encontró en *E. coli* una estructura capaz de aglutinar glóbulos rojos de cobayo, lo cual podía ser bloqueado agregando manosa u otros disacáridos a la reacción. Lo anterior hizo considerar que varias adhesinas en la superficie bacteriana podrían tratarse en realidad de lectinas bacterianas; sin embargo, se encontró que algunos miembros

del género *Staphylococcus* y *Streptococcus* expresaban adhesinas que carecían de actividad de lectina, lo cual hizo reconsiderar la naturaleza de las adhesinas^{1,2}. Actualmente se conocen diferentes métodos de adhesión que incluyen no solamente lectinas, sino también sistemas complejos de translocación de receptores como los descritos en *E. coli* enteropatógena (EPEC)^{31,32,33}.

Los primeros trabajos en lo que se refiere a adhesión en la familia Enterobacteriaceae fueron hechos en los años 50's y 60's por Duguid (1955) y Brinton (1965)¹, quienes realizaron estudios sistemáticos de propiedades hemoaglutinantes. En estos trabajos se pudo observar que varias bacterias aglutinaban eritrocitos de diferentes especies animales, clasificando las bacterias en dos grupos. El primer grupo aglutinaba fuertemente eritrocitos de cobayo, lo cual era inhibido con bajas concentraciones de manosa, metil- α -manósidos y mananas de hongos. Estas bacterias fueron designadas como manosa sensibles (MS). El segundo grupo aglutinaba fuertemente eritrocitos humanos, lo cual no era inhibido con manosa, a este grupo se le denominó manosa resistentes (MR). En el grupo de bacterias MS fueron identificados por primera vez las fimbrias^{1,14}.

A partir de los trabajos anteriores muchos más se han realizado y actualmente se cuenta con una descripción detallada de carbohidratos que bloquean la adhesión¹.

En lo que se refiere a su biogénesis al menos cuatro mecanismos de ensamblaje de fimbrias han sido descritos en los últimos años, los cuales son:

- 1.- sistema de chaperona-acomodador
- 2.- sistema general de secreción
- 3.- sistema de nucleación-precipitación extracelular
- 4.- sistema alterno de chaperonas

Para cada uno de estos sistemas existen modelos prototipo que son los más estudiados. El pili P y el pili tipo I (sistema de chaperona-acomodador), el pili tipo IV (sistema general de secreción), el curli (sistema de nucleación-precipitación) y el pili CS1 (sistema alternativo de chaperonas)¹⁵.

Sistema de chaperona-acomodador, Pili P y tipo I.

Más estudiado en cepas de *E. coli* uropatógenas asociadas con pielonefritis agudas, donde parecen ser un factor primordial en la colonización de la vejiga y virulencia del tracto urinario. Lo anterior fue comprobado cuando *E. coli* expresando la fimbria tipo I desde el cromosoma o desde un plásmido colonizaban más que las mutantes que carecían de dicha fimbria. Además, la fimbria tipo I se une a un receptor de uroplaquina en las células epiteliales de la vejiga promoviendo la exfoliación. La expresión de esta fimbria presenta un mecanismo de variación de fase, en la cual la transcripción de sus genes está controlada por un promotor contenido en un segmento invertible de 314 pb. En una orientación este elemento permite la transcripción pero invertido la bloquea^{15,16}.

En lo que se refiere al pili P también estudiado en cepas de *E. coli* uropatógenas, ésta tiene la capacidad de unirse a un α -D-galactopiranosil-(1-4) galactopiranosido presente en los glucolípidos de las membranas celulares del epitelio del tracto urinario¹⁷. Once genes organizados en el operón *pap* son requeridos para la expresión y ensamblaje de este pili¹⁵. El gen *papG* codifica a la adhesina responsable de unirse al receptor en la célula, la eliminación de este gen no afecta el ensamblaje del pili; sin embargo, resulta en una pérdida de la adhesión. La proteína PapA forma el cuerpo de la fimbria, agregándose en forma de cilindro helicoidal con 3.28 subunidades por cada vuelta. La fibrilla localizada en la parte distal del pili

está formada por varias subunidades de PapE arregladas también en hélice. La adhesina PapG esta unida a esta fibrilla por PapF y la fibrilla se une al pili por medio de PapK (Figura 1). PapD es el prototipo de la chaperonas periplásmicas que dirigen el ensamblaje en el sistema de chaperona-acomodador, que incluye a más de treinta miembros. PapD es una proteína con forma en "V", que posee dos dominios similares a moléculas de inmunoglobulinas. Las funciones de PapD son: 1) Ayudar en el plegamiento correcto de cada una de las subunidades; 2) Unirse a cada una de las subunidades para prevenir su ensamblaje en el periplasma y; 3) facilitar el transporte de moléculas desde el periplasma. Los complejos chaperona-subunidad se unen a PapC, la cual es una proteína de la membrana externa que forma un poro y, además, facilita la separación de la chaperona con cada subunidad, y la translocación, dando como resultado la formación del pili (Figura 2) ^{15, 17, 18,19,20,21}. Dentro de este grupo de chaperona-acomodador se encuentra también la fimbria "Fim", descrita en varios miembros de la familia *Enterobacteriaceae* ^{22,23}.

Sistema general de secreción , Pili tipo IV

La formación del pili tipo IV requiere de la expresión de: 1) una prepilin peptidasa que corta la secuencia señal de las subunidades, 2) una proteína integral de membrana interna, que sirve de plataforma para el ensamblaje del pili, 3) una proteína con actividad de ATPasa, asociada con la membrana citoplásmica y 4) una proteína en la membrana externa que forma un canal que permite la translocación del pili ensamblado. El ensamblaje de este pili parece ser independiente de cualquier chaperona ¹⁵.

El pili tipo IV es expresado en una gran variedad de microorganismos patógenos. Estas fimbrias median la adherencia a células epiteliales, la autoagregación bacteriana, actúan como receptores para bacteriófagos y median un tipo muy especial de movimiento conocido como "twitching motility". En EPEC una fimbria de este tipo denominada bundle forming pilus (BFP)

está codificada en un plásmido y tiene un papel importante en la patogénesis de las lesiones producidas por este microorganismo^{24, 25, 26}.

La formación de este pili en *E. coli*, es de la forma siguiente; después de la translocación de los precursores prePilE en el espacio periplásmico por medio del sistema general de secreción, estas moléculas son mantenidas en la membrana interna por su extremo N'-terminal hidrofóbico, mientras que el extremo C'-terminal hidrofílico está orientado hacia el espacio periplásmico. La peptidasa señal PilD remueve entonces la secuencia líder desde la membrana interna, para generar la subunidad PilE madura la cual puede entonces comenzar a unirse para ensamblar el pili. Los factores requeridos para este ensamble posiblemente son proporcionados por las proteínas PilF, PilG y PilT. La proteína PilF podría funcionar como una ATPasa o como una cinasa. Para PilG se ha propuesto un papel en la localización o estabilización de PilD y PilF. PilT es una proteína unidora de nucleótidos y se ha propuesto que tiene un papel importante en el fenómeno de "twitching motility" y en la retracción del pili. El pili ensamblado es translocado a través de la membrana externa por un poro formado por varias unidades de PilQ. La lipoproteína PilP parece estabilizar la expresión de PilQ como un multímero. PilC es una adhesina que parece facilitar el paso y el crecimiento de este organelo a través del poro^{15,26,27}.

Sistema de nucleación-precipitación extracelular , curli.

Mientras que los mecanismos que se han descrito en torno al ensamblaje de un pili, comienzan desde la membrana interna o externa, la formación del curli ocurre fuera de la bacteria por la precipitación de las subunidades solubles secretadas, formando fibras delgadas en la superficie de la bacteria. En *E. coli* se han descrito dos operones para el ensamblaje de este tipo de fimbrias conocidas como "curli". El operón *csgBA*, en el cual *csgA* codifica para la

subunidad principal que forma el "curli" y *csgB* se ha propuesto que codifica un nucleador, que induce la polimerización de *csgA* en la superficie de la célula. El operón *csgDEFG* codifica un activador transcripcional para la formación de este pili y de tres factores putativos de ensamble. Uno de ellos *CsgG*, es una lipoproteína que se localiza en la membrana externa. En su ausencia, la formación del pili no se lleva a cabo y parece que *CsgA* y *CsgB* se encuentran en rápida degradación proteolítica. *CsgG* podría ser una chaperona que trabaja junto con otras para translocar cada una de las subunidades *CsgA* y *CsgB* y evitar una degradación prematura de dichas subunidades^{15,28}.

Sistema alternativo de chaperonas, pili CS1.

Este sistema también utiliza un grupo especializado de chaperonas que son distintas a las del sistema de chaperona acomodador. Los pili CS1, CS2 y la fimbria CFA/1 representan ejemplos de este sistema. Para el caso del pili CS1, la chaperona *CooB* forma complejos periplásmicos con las subunidades estructurales del pili, *CooA* y *CooD*, los cuales son transportados al interior del espacio periplásmico de manera Sec-dependiente. Ambos polipéptidos tienen una secuencia conservada cerca de su extremo C'-terminal, el cual funciona como región de reconocimiento para la chaperona. Dicha secuencia no presenta homología con las secuencias C'-terminales de residuos hidrofóbicos alternos, encontradas en las subunidades del sistema chaperona-acomodador. *CooC* es una proteína de membrana externa que funciona como un canal para el paso del pili; *CooB* estabiliza a *CooC* en la membrana externa y se une a ésta en ausencia de cualquier otra subunidad^{15,29}.

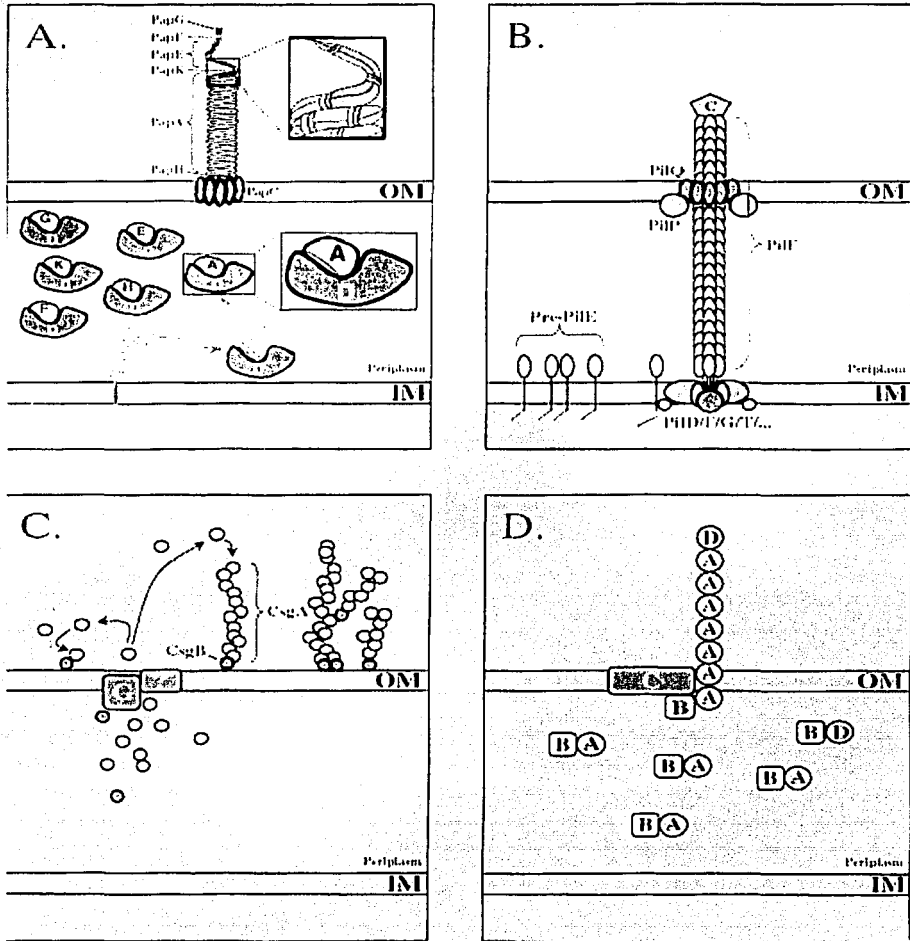


Figura 1. Esquema representativo del ensamblaje de las cuatro tipos de fimbrias descritas en este trabajo. En A sistema de chaperona-acomodador, B sistema tipo IV, C Sistema de nucleación-precipitación extracelular v en D sistema alternativo de chaperonas¹⁵.

Los cuatro anteriores no son todos los sistemas descritos, ya que existen otros modelos de adhesión, sobre todo en bacterias Gram positivas, que no han sido considerados en este trabajo. Para concluir esta parte se muestra el caso especial de *E. coli* enteropatógena con sofisticados mecanismos de adhesión.

***Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).**

EPEC es la principal causa de diarreas infantiles de origen bacteriano en países en desarrollo. La diarrea es consecuencia de las lesiones que esta bacteria produce en el intestino. En el intestino o en cultivos *in vitro* EPEC produce dos fenotipos de adherencia distintos y conocidos como adherencia localizada (AL) y adherencia y esfacelamiento (A / E). En el primer caso, EPEC expresa una fimbria tipo IV conocida como BFP (bundle-forming pilus) que es requerida para la autoagregación y la AL a las células del hospedero. Un grupo de 14 genes es necesario para la formación de esta fimbria, el cual se encuentra localizado en un plásmido. La fimbria tipo IV es expresada en una amplia variedad de microorganismos patógenos. Estas fimbrias no sólo median la adherencia a células del hospedero, también permiten la agregación bacteriana y sirven como receptores para fagos^{30,31,32,33}.

El segundo fenotipo, la lesión A / E, es el resultado de un complejo sistema que permite a la bacteria translocar la proteína Tir, la cual es el receptor de la íntima, ambas proteínas bacterianas. Una característica especial de la A / E es la formación de pedestales de actina por debajo del sitio de adhesión, junto con una destrucción de las microvellosidades en el intestino^{32,33}.

Coordinación de señales en la adhesión.

La habilidad de la bacteria para reconocer y adherirse a una superficie específica es un aspecto fundamental en la ecología microbiana y en la patogénesis. *E. coli* es la causa más frecuente de infecciones en el tracto urinario, la mayoría de las bacterias implicadas en estas infecciones son capaces de expresar sobre su superficie diferentes tipos de pili. Cuando la bacteria se une al epitelio del tracto urinario utilizando su fimbria P, la activación transcripcional del gen *airS* ocurre. El producto del gen *airS* es una proteína localizada en la membrana citoplásmica que pertenece a la familia de reguladores de dos componentes. Aunque el mecanismo preciso no ha sido aún determinado, se conoce que *airS* regula un sistema de adquisición de hierro en la bacteria, el cual consiste en proteínas de alta afinidad, captadoras de hierro o sideróforos y proteínas de membrana reguladas por hierro que sirven como receptores para los complejos sideróforos-hierro. Si el *airS* es bloqueado en la bacteria, se pierde la capacidad de producir sideróforos y sus receptores, con lo cual pierde su capacidad para sobrevivir en el tracto urinario^{34,35,36}.

Por otra parte en el hospedador un proceso inflamatorio comienza cuando la bacteria dispara la producción de mediadores proinflamatorios en el sitio de la adhesión. Cuando *E. coli* uropatógena se une al epitelio, la producción de IL-6 y IL-8 son activadas, este fenómeno fue observado cuando las bacterias poseían fimbrias, aunque el LPS también participa de forma importante. Como se aprecia en este caso, la adherencia implica el disparo de una serie de señales que le permiten a la bacteria acoplarse al medio y en el caso de adherencia a epitelios animales, estimular que el organismo tome medidas para evitar esta adhesión³⁷.

Salmonelosis.

La salmonelosis es una de las enfermedades zoonóticas más importantes a nivel mundial, que también afecta la producción animal. La Tifoidea Aviar (TA) causada por *Salmonella enterica* serovariedad *gallinarum* es una enfermedad septicémica infecciosa que afecta aves domésticas de todas las edades con una alta tasa de mortalidad, lo que conlleva a importantes pérdidas económicas en la industria aviar. Este problema se encuentra en muchos países, especialmente aquellos en vías de desarrollo,^{38,39,40,41}

Salmonella gallinarum es un bacilo Gram negativo, intracelular facultativo con una longitud aproximada de 4 μm por 1.5 μm de diámetro, no forma esporas y no presenta cápsula. Sobre su superficie posee el antígeno somático O de los grupos 1,9 y 12. No presenta antígeno capsular Vi, ni antígeno flagelar H, debido a que es inmóvil⁴², sin embargo estudios recientes muestran que *Salmonella pullorum* tiene motilidad en agar semisólido o en agar Hektöen. Incluso para esta especie se han realizado estudios de microscopía electrónica y un flagelo pequeño y deforme ha sido observado⁴³.

Salmonella gallinarum tiene una alta especificidad de especie, y los brotes naturales se observan en pollos, pavos, gallinas de Guinea, pavos reales, patos, y aves salvajes. Incluso inoculaciones experimentales en ratones y otros animales de laboratorio no se reprodujo el cuadro clínico. No obstante lo anterior, en el hombre se describen problemas de enteritis muy leves, aunque sólo en casos esporádicos. Esto se debe a que la especificidad de *Salmonella gallinarum* está principalmente relacionada a nivel del sistema mononuclear fagocítico y epitelio intestinal^{44,45,46}.

La TA se transmite de diferentes maneras, las principales vías de infección son la transovárica y la oral, sin embargo puede haber una diseminación mecánica de la enfermedad por medio de ropa mal desinfectada de los trabajadores y visitantes; camiones y otros vehículos; así como de animales y moscas que se alimentan de cadáveres de aves muertas por TA. Las aves infectadas son principalmente el medio de perpetuación y diseminación de la enfermedad ^{42,44,47}.

El período de incubación es de 4 a 5 días, una vez establecida la enfermedad, la muerte se presenta en un período de 4-10 días. La mortalidad producida por esta enfermedad va del 10 al 50%, esta variación depende de la edad del hospedador, línea genética del ave y virulencia del microorganismo ^{47,48,49}.

Si se incuban huevos infectados, se ven pollitos moribundos y muertos. Otros muestran somnolencia, pobre crecimiento, debilidad, inapetencia y adherencia de material blancuzco en la cloaca. Se puede notar que respiran con dificultad como resultado de la congestión pulmonar. En aves maduras la TA se manifiesta con la disminución en la ingesta de alimento, aves decaídas, plumas erizadas, cabeza pálida y crestas encogidas ^{44,48}.

Para *Salmonella* o para cualquier enterobacteria su potencial patógeno depende en gran medida del reconocimiento y colonización de un nicho adecuado para que se desarrolle el microorganismo y así la enfermedad. Las especies de *Salmonella* son capaces de adherirse, penetrar, sobrevivir y replicarse en células epiteliales y fagocíticas ^{49,50}.

Cada ambiente del hospedero cuenta con diferentes propiedades físicas y químicas, como es la temperatura, pH, osmolaridad y disponibilidad de nutrimentos⁵¹. En cada ambiente el patógeno se enfrenta con los componentes del sistema inmune innato del huésped que van

desde la barrera anatómica que forma el epitelio, hasta las actividades microbicidas del Complemento y fagocitos. El patógeno debe sentir todos estos cambios que le rodean para responder de manera adaptativa y sacar ventaja del nuevo ambiente que lo rodea. Dentro de las respuestas que monta el patógeno se encuentran: el estrés producido por la limitación de nutrimentos y la activación de sistemas de virulencia específicos que le permitan resistir, evadir, o manipular los efectores de la respuesta inmune innata^{52,53}. Por otro lado, una respuesta simultánea se presenta por parte del huésped, el cual detecta la presencia del patógeno por medio de receptores que son capaces de sentir y distinguir elementos que forman parte de la membrana externa de la bacteria⁵⁴.

Salmonella gallinarum tiene una alta predilección por intestino delgado, particularmente por el yeyuno y el íleon, sin embargo, para que la bacteria sea capaz de llegar a esta parte del intestino, es necesario que se enfrente a diversas barreras. El estómago se considera como la primera barrera para la colonización, ya que el ambiente es totalmente ácido (pH 3) y puede inactivar a la bacteria, aquellas bacterias que llegan a vencer el ambiente ácido es porque de alguna manera pudieron colonizar la faringe e incrementar la posibilidad de sobrevivencia, por un lado o bien o debido a que el alimento ingerido incrementó el pH a grado tal que el microorganismo pudo sobrevivir, el contenido del estómago pasa al intestino delgado, donde el pH se neutraliza por las secreciones pancreáticas. El epitelio del intestino delgado consiste principalmente en células epiteliales y células M de las Placas de Peyer, las cuales *Salmonella* invade. Es a través de éstas células que *Salmonella* pasa al torrente sanguíneo llegando a provocar un problema septicémico^{55,56}.

A nivel molecular se sabe muy poco de los mecanismos específicos de *Salmonella gallinarum*, sin embargo, investigaciones a la fecha reportan un plásmido de 85 Kb, esencial para la virulencia. Este plásmido contiene genes que no son requeridos o que no tienen la función de

un gen de mantenimiento y codifican a productos que ayudan al microorganismo para establecerse en el huésped, causarle daño o ambas ⁵⁷.

Salmonella gallinarum posee, al igual que otras especies en su género, islas de patogenicidad (SPI), las cuales son básicamente largas regiones del cromosoma que contienen genes que codifican para factores de patogenicidad ^{58, 59}.

El estudio de estas regiones o islas de patogenicidad ha permitido postular hipótesis acerca de la evolución de este género, a través de fenómenos de transferencia horizontal de la información genética, se ha podido establecer que la adquisición de estos fragmentos, sucedió hace miles de años y de forma secuencial. Para el caso de *Salmonella*, primero se adquirió la isla I y después la isla II ^{58,60,61,62}.

La isla I esta en el cromosoma de *Salmonella* en el centisoma 63, tiene un porcentaje de G:C del 42%, el cual, es más bajo que el del resto del genoma (52%). Esta isla contiene en su interior genes que en tamaño y orden son similares a los de *Shigella* spp. los cuales se encuentran en un plásmido en esta última ⁶⁰.

La isla de patogenicidad I de *Salmonella gallinarum* codifica para un sistema de secreción tipo III como en el resto de las bacterias del mismo género, para el caso de *Salmonella typhimurium* este sistema se conoce mucho más ^{63,64}.

El sistema de secreción tipo III es un complejo multiprotéico en la membrana bacteriana, que permite a la bacteria Gram negativa secretar e inyectar proteínas patógenas en el citoplasma de la célula eucariota. Cabe mencionar en esta parte que mientras el sistema de secreción es conservado en patógenos no relacionados cercanamente como *Salmonella* y *Erwinia*, las

proteínas que se secretan difieren completamente, ilustrando como un sólo mecanismo de patogenicidad bacteriana puede producir enfermedades tan diversas como Fiebre Tifoidea o Enfermedad de los Árboles Frutales ^{65,66,67,68,69,70,71,72,73}.

La secreción e inyección de estas proteínas patógenas en el citoplasma celular inicia un sofisticado "Diálogo Bioquímico" entre el patógeno y el hospedero⁶⁹.

Las proteínas secretadas, comúnmente simulan factores celulares que intervienen en la transducción de señales en la célula eucariota, la redirección de estas señales celulares puede resultar en el desarme de la respuesta inmune, como en el caso de *Yersinia*, rearrreglos en el citoesqueleto como en el caso de EPEC, o el establecimiento de nichos subcelulares como en el caso de *Salmonella*, entre otros casos ^{68,74,75}.

Estructuralmente, el sistema de secreción tipo III se asemeja a la del flagelo, incluso varios de sus componentes comparten una alta homología, algunos ejemplos de estas proteínas se muestran en la tabla 1⁶⁸.

TABLA 1. Proteínas asociadas al Sistema de Secreción Tipo III.

Proteínas Flagelares	Proteínas de <i>Yersinia</i>	Proteínas de <i>Erwinia</i>	Proteínas de <i>Salmonella</i>	Proteínas de <i>Shigella</i>
FliA	LcrD	HrcV	InvA	MxiA
FliI	YscN	HrcN	InvC	Spa47
FliN/FliY	YscQ	HrcQ	SpaO	Spa33
FliP	YscR	HrcR	SpaP	Spa24
FliQ	YscS	HrcS	SpaQ	Spa9
FliB	YscU	HrcU	SpaS	Spa40
FliF	YscJ	HrcJ	PrgK	MxiD

Trabajos de microscopía electrónica llevados a cabo con este sistema confirman la homología tan alta que guarda con el flagelo, ver (Figura 2). Esto, junto con lo antes mencionado, sustentan una importante teoría, la cual postula que el sistema de secreción deriva del flagelo, el cual se adaptó a la secreción de factores de virulencia⁷³.

Tal vez uno de los aspectos más estudiados y más impresionantes en lo que se refiere al sistema de secreción Tipo III en *Salmonella*, es la formación de "ruffling", que permite a la bacteria invadir células eucariotes. El término "ruffling" se refiere a la manera en que la célula engloba a la bacteria, dando como resultado una apariencia de onda en la superficie de la célula (Figura3).

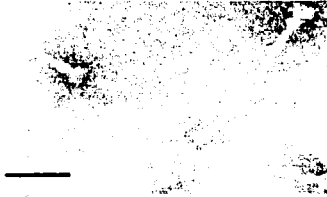


FIGURA 2. Microscopía Electrónica del sistema de secreción tipo III de *S. typhimurium*, nótese la forma de aguja del complejo, así mismo su semejanza con la base del flagelo⁷⁴.

Durante este evento *Salmonella* manipula el citoesqueleto celular a través de dos proteínas: SopE codificada en un fago, fuera de la isla de patogenicidad tipoi, que codifica este sistema de secreción tipo III, involucrado en la invasión, y SptP que en conjunto con SipA, otra proteína translocada por el sistema tipo III, tienen la función de estimular y destimular respectivamente, la formación de lamelipodia por medio de la vía de las proteínas GTPasas pequeñas de la familia Rho, involucrando a Cdc42 y otras proteínas del citoesqueleto. Al proyectar elongaciones celulares, la bacteria es capturada e introducida en la célula, lugar donde suele establecer su nicho, utilizando sus otros sistemas de patogenicidad ubicados en islas distintas^{76,77,78,79,80,81}.



FIGURA 3. Se muestra a *Salmonella typhimurium* entrando a una célula epitelial Hep-2 por medio de endocitosis. Se pueden observar las ondas que se producen en la superficie de la célula, debido al englobamiento e internación de la bacteria adherente ⁸.

Pero lo anterior no constituyen todos los cambios observados dentro de las células, también son observados cambios en los niveles de calcio, debido a la estimulación de la vía IP3 (inositol 3-fosfato). La elevación de niveles de calcio permite entre otras acciones, estimular la vía de las MAP cinasas, que liberan activadores transcripcionales como NF- κ B (Figura 4) ^{81,82,83,84,85}.

Otra proteína translocada por este sistema es SopB, la cual es una inositol fosfato fosfatasa que tiene una función primordial en la enteropatogenicidad, la delección de ésta proteína no suprime la invasión, pero sí reduce la secreción de líquido y acumulación de neutrófilos en el intestino de animales infectados, por lo que se le considera como la responsable de producir

cambios en el epitelio que favorecen la entrada de *Salmonella* entre los espacios intercelulares cuando hay migración de polimorfonucleares. Además, junto con las enterotoxinas producen diarrea⁸⁶.

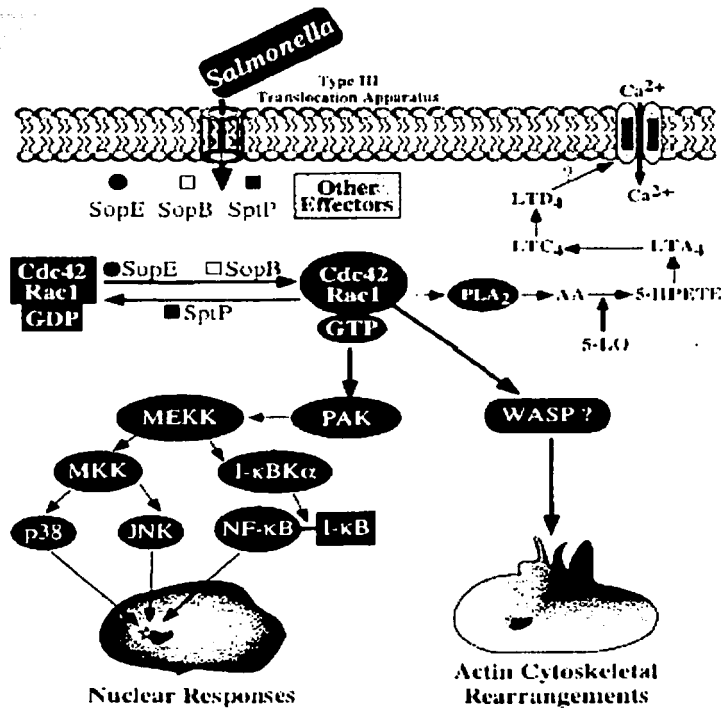


FIGURA 4. Transducción de señales en la célula cuando *Salmonella* la invade, en la figura se aprecian las cascadas de fosforilación que ocurren dentro de la célula y la activación de proteínas de la familia Rho⁷⁷.

Durante otra etapa de la patogénesis de la infección por *Salmonella*, se establece la formación de nichos intracelulares en células fagocíticas no profesionales. En la formación de éstos nichos se involucra la segunda isla de patogenicidad de las cinco descritas en *S. typhimurium*^{87,88,89}. La isla de patogenicidad II, también codifica para un sistema de secreción tipo III, el

cual es activado sólo cuando *Salmonella* se encuentra dentro de la vacuola. Este sistema transloca una proteína, SipC, que interfiere con el tráfico intracelular normal al evitar que la vacuola se fusione con los lisosomas, evitando también que a la vacuola se le fusione una NADPH oxidasa que acidifica su contenido (Figura 5) ^{88,89,90,91,92}. Otra proteína translocada por este sistema es SipB que produce muerte en macrófagos por apoptosis, al activar la vía de las caspasas. Este último evento es importante en el establecimiento de la infección por *Salmonella*, como lo muestran algunas mutantes ^{93,94}.

Existen otras tres islas de patogenicidad en *Salmonella* las cuales codifican diferentes factores de virulencia involucrados en la patogenicidad en diversos hospederos u órganos, por ejemplo la isla de patogenicidad III y IV están principalmente involucradas en la sobrevivencia y replicación de la bacteria dentro del huésped, lo cual se manifiesta, como la fase septicémica de la enfermedad. Por otro lado la isla de patogenicidad V participa en la mediación de la inflamación y secreción de cloro, las cuales forman parte de la fase entérica de la enfermedad ^{59,60,63}.

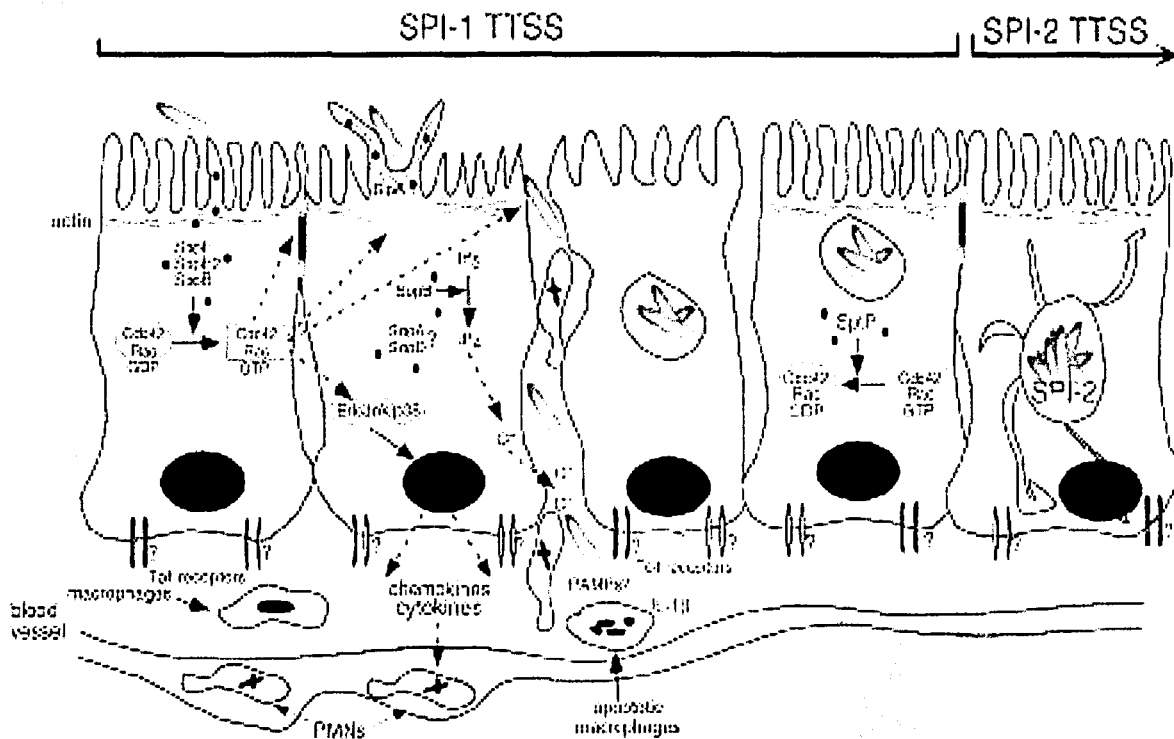


FIGURA 5. Representación esquemática de los diferentes eventos que ocurren en el intestino, en la figura se aprecia la participación de las islas de patogenicidad I y II⁶⁸.

Otros factores de virulencia que han sido estudiados con respecto a su contribución en la patogénesis de *Salmonella* son las enterotoxinas. La actividad enterotóxica se ha reportado en muy pocas serovariedades de *Salmonella*, por ejemplo en *S. typhimurium* se ha identificado una enterotoxina parecida a la toxina del cólera (CT), que comparte la misma estructura, función y antigenicidad; también se ha descrito una enterotoxina termo-lábil (LT), parecida a la de *E. coli*, la cual se asocia a células^{95,96,97,109,110}.

Otras toxinas identificadas en varias especies del género *Salmonella* son las citotoxinas. Estas citotoxinas causan daño en células epiteliales, existen tres citotoxinas, una de ellas es termo-lábil y sensible a la tripsina, otra se ha reportado como componente de la membrana externa de las bacterias con un bajo peso molecular y finalmente una con actividad hemolítica^{98,99}.

Fimbrias en *Salmonella*

La fimbria, como ya se mencionó es un apéndice proteínico de diversas longitudes y diámetros que protruye de la bacteria. Este organelo está compuesto de proteínas adhesivas que le permiten el contacto con la célula huésped. La colonización e internación son eventos generalmente mediados por adhesinas que se encuentran en la superficie del microorganismo, que son responsables del reconocimiento y unión a receptores específicos de la célula huésped. El evento de unión al receptor en la célula huésped, puede activar cascadas de transducción de señales y activar el sistema inmune innato o, por el contrario, facilitar la colonización e invasión bacteriana.

El género *Salmonella* incluye diferentes especies cada una con diferentes tipos de fimbrias^{100,101}. En la patogénesis de la salmonelosis como en algunas otras enfermedades, el papel de la fimbria es todavía controversial. Se sabe que las fimbrias tienen un papel importante en la

virulencia al permitir a la bacteria interactuar con las células del hospedero u otros sustratos sólidos.

Diferentes operones han sido descritos en cada una de las variedades de *Salmonella enterica*, cada uno de ellos participando en la adhesión a diferentes tipos celulares. Los genes de cada operón se expresan cuando en el huésped las condiciones físico-químicas son las adecuadas, como la temperatura, pH, osmolaridad, disponibilidad de nutrimentos y la presencia de sustancias tóxicas^{101,102,103}.

Para el caso de *Salmonella gallinarum*, a la fecha se conoce la presencia de 8 operones (*sef*, *lpf*, *fim*, *bcf*, *saf*, *stb*, *ste*, y *sth*), que determinan la especificidad de hospedero. Lo anterior es mas evidente cuando al clonar los genes de la fimbria tipo I de *S. typhimurium* en *S. gallinarum*, se incrementa en esta última, 20 veces la adherencia y 60 veces la invasión en el modelo murino¹⁰¹.

El locus *lpf ABCDE* que codifica para el "Long Polar Fimbriae" fue identificado como resultado de una búsqueda del loci de *S. typhimurium*¹⁰⁴. Este operón se encuentra localizado en el centisoma 80 de *S. typhimurium* y está flanqueado por secuencias similares a las descritas en *E. coli* K12 y O157:H7, sugiriendo que el operón *lpf* pudo haber sido adquirido por transferencia horizontal durante la evolución de *S. typhimurium*¹⁰⁸. Además, al menos dos serovariedades en *Salmonella* (*S. typhi* y *S. arizonae*) parecen haber perdido o no adquirido dicho operón¹⁰⁰.

La expresión del gen *lpf* en una cepa de *E. coli* carente de fimbrias, produce filamentos polares largos en una población de transformantes, de aquí su nombre de Long Polar

Fimbriae. Aunque la fimbria codificada por *lpf* sugiere una localización polar en la bacteria, no se ha determinado de forma concluyente que tenga la misma localización en *Salmonella*.

Lpf media la adhesión de la bacteria a las células de las placas de Peyer del Intestino delgado en el modelo murino. En un modelo *in vitro* en asas intestinales, las mutantes de *lpf* tienen capacidad reducida para colonizar placas de Peyer. El *lpf* es ensamblado mediante el sistema chaperona-acomodador, donde la translocación de componentes estructurales a través de la membrana interna es mediada por un sistema *sec*-dependiente, y el ensamblaje de la fimbria mediado por una chaperona como ya se mencionó. Los genes que forman parte de la fimbria en *Salmonella*, se han descrito en gran medida en *S. typhimurium*; sin embargo, no se ha estudiado a fondo el papel que juegan en la patogénesis de la infección.

En el caso de *S. gallinarum* no existe información al respecto, por lo que se estudiarán algunos mecanismos de adherencia de este microorganismo.

HIPÓTESIS.

Salmonella gallinarum presenta genes de adherencia homólogos a los descritos en *S. typhimurium*.

OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar genes de adherencia en *Salmonella gallinarum*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la presencia de *lpf* en *S. gallinarum*.
- Clonación de los genes *lpf* de *S. gallinarum*.
- Secuenciación y análisis de las secuencias obtenidas.
- Determinar la capacidad y tipo de adhesión de *S. gallinarum* en cultivo de células epiteliales.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.

Las cepas utilizadas en este estudio fueron:

- *Salmonella gallinarum* FVA -1 (Caso clínico del Departamento de Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM)
- *Salmonella gallinarum* FVB - 323 (Caso clínico del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM)
- *Salmonella typhimurium* 938 (Cepa de referencia del Instituto de Biotecnología, UNAM)
- *Salmonella typhi* IMSS-1 (Caso clínico del IMSS)
- ATCC (*American Type Culture Collection*)

Todas las cepas fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (LB) o en agar LB en aerobiosis a 37C. También se utilizaron agar MacConkey y agar Verde Brillante^a como medios diferenciales. La cepa de *Staphylococcus aureus* se cultivó en caldo nutritivo.

Cinéticas bacterianas.

Se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento de cada una de las cepas de *Salmonella*, para determinar la fase logarítmica de crecimiento de cada una de ellas. Para ello se realizó lo siguiente:

Cultivo Primario.

Se utilizó un cultivo de *Salmonella* con un crecimiento previo de 16 h, del cual se transfirió 1 ml a 9 ml de caldo LB, a fin de tener una dilución 1/10. Esta dilución se dejó incubando a 37C en agitación toda la noche (aprox. 16 h).

^a Agar MacConkey y Agar Verde Brillante, DIFCO.

Cultivo Secundario.

Al día siguiente se tomaron 100 l del cultivo primario y se agregaron a 50 ml de medio LB. Cada hora se tomó una muestra de 1 ml del cultivo para su lectura en un espectrofotómetro^a. La cinética de crecimiento se determinó por 12 h, las lecturas se realizaron a cada hora a una longitud de onda de 600 nm; Al mismo tiempo se hicieron diluciones seriadas de cada muestra, las cuales se plaquearon en agar LB para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC). Estas cajas fueron incubadas a 37C y al día siguiente se hizo el conteo. Este experimento se realizó por duplicado para cada cepa y se repitió 3 veces.

Inoculación en embrión de pollo.

A las cepas se les hizo un pase en embrión de pollo para recuperar su patogenicidad. Se utilizaron ocho embriones de pollo SPF^b de siete días de edad, de los cuales seis se inocularon por la vía del Saco Vitelino con 0.1ml del inóculo bacteriano (1×10^5 bacterias/ml) y 2 quedaron como controles negativos. Una vez inoculados, se incubaron a 37C hasta ver muerte embrionaria. Posteriormente todos los embriones se abrieron y se evaluó su integridad física, se tomaron 100 µl de saco vitelino (yema), los cuales se agregaron a 900 l de medio LB estéril, se hicieron 5 diluciones seriadas (10^{-1} hasta 10^{-5}) para el conteo de UFC. Al mismo tiempo, estas mismas muestras se sembraron en agar Mac Conkey y agar Verde Brillante por la técnica de aislamiento en cultivo puro, y se incubaron a 37 C en aerobiosis.

Una vez obtenido el aislamiento puro, se realizaron pruebas bioquímicas (TSI, H₂S, Indol, Motilidad, Citratos, Urea, Lisina- Descarboxilasa, Manitol, Ramnosa, Dulcitol, y

^a Espectrofotómetro, Amersham Pharmacia Biotech. Ultrospec 3000, Cambridge, Inglaterra

^b Embrión de Pollo (Huevo Fértil Alpes-II), Aves Libres de Patógenos Específicos, S.A.

ONPG) para verificar la autenticidad de la cepa. Por último, las cepas obtenidas se conservaron en agar Nutritivo A hasta su uso y en glicerol ^a a -70C.

Extracción de ADN.

Salmonella gallinarum FVA-1, *S. gallinarum* 323 y *S. thyphimurium* 938 fueron cultivadas hasta alcanzar su fase tardía (densidad óptica de 600 nm [OD₆₀₀]), y se realizó la extracción de ADN bacteriano mediante la técnica de CTAB¹⁰⁵. El ADN extraído se trató con RNasa ^b para eliminar todo el ARN contaminante y finalmente se cuantificó en el espectrofotómetro para verificar su concentración.

Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos que se utilizaron a lo largo del experimento para la amplificación y secuenciación de los diferentes fragmentos del operón *lpf* (long polar fimbriae) se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este experimento.

GEN	OLIGONUCLEÓTIDOS	POSICIÓN	REFERENCIA
<i>lpfA</i>	1: 5'-TTGCTCTGCTGCTCTCGCTGTAG-3' 2: 5'-CATGATTCTTCTCTGAGCCTCC-3'	505-528 pb 1078-1100 pb	100
<i>lpfB</i>	1: 5'-CCGGGGTATCTACGACAACGCTAACAAG-3' 2: 5'-GCATGCGCTCATGATCAGGGTCTGGTC-3'	841-863 pb 2260-2280 pb	Este estudio
<i>lpfD</i>	1: 5'-CCCGGGGGGGCAGGCGCTGGCAGCG-3' 2: 5'-GCATGCGGGGTATTGTTGCTCCCCACCA-3'	4421-4439 pb 5791-5813 pb	Este estudio
<i>lpfE</i>	1: 5'-TTTGATGCCAGCGTGTACTG-3' 2: 5'-AGTAGACCACCAGCAGAGGAAAG-3'	5454-5476 pb 6046-6069 pb	100

^a Glicerol, Cat. No. G5514, SIGMA.

^b Rnasa de pancreas bovino, Cat. No. 109134, Boehringer Mannheim, Alemania.

Amplificación de los genes del operon *lpf*.

El ADN genómico de las cepas anteriormente descritas fue utilizado como templado para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la cual se utilizaron 45 µl de Platinum PCR SuperMIX^a, 160 ng de DNA genómico, y 10 mM de oligonucleótidos. Las condiciones bajo las cuales el termociclador^b trabajó la reacción de PCR, se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3 Condiciones de PCR para cada uno de los genes.

GEN	CONDICIONES DE LA PCR	PRODUCTO
<i>lpfA</i>	95 C 1 min, 50 C 1 min, 72 C 6 min 25 ciclos	596 pb
<i>lpfB</i>	95 C 1 min, 66 C 1 min, 72 C 6 min 25 ciclos	1440 pb
<i>lpfD</i>	95 C 1min, 70 C min, 72 C 6 min 25 ciclos	1394 pb
<i>lpfE</i>	95 C 1 min, 50 C 1 min, 72 C 6 min 25 ciclos	616 pb

Todos los productos de PCR de la cepa FVA-1 de *S.gallinarum* se purificaron mediante columnas^c y se mandaron secuenciar al Instituto de Biotecnología, UNAM. Las secuencias fueron analizadas en el programa de computo DNAMAN^d (<http://www.lynnon.com>) y la predicción de estructuras de proteínas, se realizó con el programa RasMol^e (<http://www.umass.edu/microbio/rasmol/>) y el programa 3D-pssm (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/>).

^a Platinum® PCR SuperMix, Cat. No. 11306-016, GIBCO, USA.

^b Termociclador, Gene Amp PCR System 2400, PERKIN ELMER, USA.

^c Columnas de purificación, QIAquick PCR Purification Kit (50), Cat. No. 28104, Alemania

^d Lynnon Corporation. DNAMAN, (computer program) versión 3 (USA).1997

^e Sayle Roger. Ras Mol (computer program) versión 2.5 (UK). 1994

Hemoaglutinación en placa.

Para el ensayo de hemoaglutinación se utilizó la metodología descrita por Nesser, *et al*; para la cual se mezclaron 25 μ l de la suspensión bacteriana (1×10^9 bacterias / ml), con 25 μ l de la solución NaCl al 0.9%; con esta mezcla se hicieron diluciones dobles seriadas y por último se les agregaron 50 μ l de eritrocitos de cuye al 1% a cada pozo. La placa se incubó a 4C por 2 h y posteriormente se hizo la lectura.

Cultivo celular.

Las líneas celulares que se utilizaron en este estudio fueron: HeLa (carcinoma cervical humano)^a y Hep-2 (carcinoma de laringe humano)^b

Las células HeLa se cultivaron en medio MEM^c (Modified Eagle Medium), suplementado con suero fetal bovino^d al 10% (inactivado), L-glutamina^e 2mM y piruvato de sodio^f 0.1mM a 37C en una atmósfera con 95% de aire y 5% de CO₂.

Las células Hep-2 se cultivaron en medio MEM, suplementado con suero fetal bovino al 10% (inactivado) y bicarbonato de sodio^g al 0.11% a 37C en una atmósfera con 95% de aire y 5% de CO₂.

Se utilizaron inóculos bacterianos de *S. gallinarum* (FVA-1 y 323), *S. typhimurium* y *Staphylococcus aureus* como control negativo para la infección¹⁰⁶.

Para el ensayo de adherencia se siguió la siguiente metodología¹²:

- 1) Se cultivaron las células en placas de 24 pozos^h con cubre pozos de 15 mmⁱ.
Se utilizó una confluencia del 50% ($1-2 \times 10^2$ células/pozo) y las placas se incubaron por 48 h a 37C.
- 2) Se cultivaron las cepas bacterianas en medio LB de 12-18 h a 37C.

^a Células HeLa, pase 136, IN Vitro, S.A. México

^b Células Hep-2, pase:365, In Vitro, S.A., México

^c Medio MEM, Cat. No. 11095-080, GIBCO, USA.

^d Suero Fetal Bovino, Cat. No. 16000-044, GIBCO, USA.

^e L-glutamina 200mM, Cat. No. 21051-024, GIBCO, USA.

^f Piruvato de Sodio 10mM, Cat. No. 11360-070, GIBCO, USA.

^g Sol. Bicarbonato de Sodio al 7.5%, In Vitro, S.A., México

^h Placas de 24 pozos, Costar.

ⁱ Cell culture coverslips 15mm, Nalge Nunc International.

- 3) El medio de las placas se aspiró con pipeta de transferencia, y las células se lavaron 3 veces con 1 ml de solución de Hanks^a.
- 4) Se agregó un 1ml de MEM con 1% de manosa + 10 l del cultivo bacteriano a cada pozo (MOI 100:1). La turbidez del cultivo bacteriano se estandarizó de acuerdo al 0.5 de McFarland, utilizando un espectrofotómetro (la absorbancia a 625 nm debe ser de 0.08 a 0.10).
- 5) Las placas se incubaron a 37C, 95% de oxígeno y 5% de CO₂ por diferentes tiempos 5, 10, 15, 20, 25, 30 min.
- 6) Después de la incubación, el medio se quitó con pipeta de transferencia y cada pozo se lavó 4 veces con PBS pH 7.3.
- 7) Las células se fijaron incubándolas con 300 l de metanol^b al 70% por 5 min a temperatura ambiente.
- 8) Se aspiró el metanol con pipeta de transferencia y las células se tñieron con Giemsa^c al 10% por 15 min.
- 9) Las paredes de cada pozo se lavaron con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante. Los cubre pozos se retiraron y se dejaron secar a temperatura ambiente.
- 10) Los cubre pozos se montaron en laminillas y se examinaron al microscopio con aceite de inmersión y el objetivo de 100 x.

Interpretación del ensayo de adherencia:

La interpretación se realizó de dos maneras una visual (microscopio) y otra por conteo de unidades formadoras de colonias (UFC)¹².

^a Solución de Hanks 1X, sin bicarbonato de sodio ni rojo de fenol, In Vitro S.A, México

^b Metanol al 100%, J.T.Backer,

^c Karyo Max® Giemsa Stain, Cat No. 10092-013, GIBCO, USA

➤ Interpretación visual .

Se revisaron los cubreobjetos al microscopio^a con el objetivo de 100X y aceite de inmersión, si se observan microcolonias alrededor de las células, se trata de una "Adherencia Localizada", si por el contrario, no se ven microcolonias, sino solamente bacterias alrededor de las células, se habla de una "Adherencia Difusa", ver (Figura 6).

Para corroborar el papel de la adhesión en la invasión, los mismos ensayos se realizaron en presencia de gentamicina, la cual elimina a las bacterias que no invaden¹⁰⁷.

- 1) Se crecieron las células en placas de 24 pozos con una confluencia del 50% (1-2 x10² células/pozo) , las placas se incubaron por 48 h a 37C.
- 2) Se crecieron las cepas de *Salmonella* en medio LB de 12-18 h a 37C.
- 3) Se aspiró todo el medio de cultivo de las placas con pipeta de transferencia.
- 4) Se agregaron 10 µl del cultivo bacteriano a cada pozo y se incubó a diferentes tiempos: 5, 10, 15, 20, 25, y 30 min a 37 C con 5% de CO₂. Al mismo tiempo se sembró una caja de agar LB para saber el número de bacterias.
- 5) Se lavaron 3 veces las placas con PBS para eliminar todas aquellas bacterias que no invadieron.
- 6) Se agregaron 1.5 ml de MEM con 100 µg/ml de gentamicina^a a cada pozo. La placa se incubó a 37C por 2 horas con 5% de CO₂.
- 7) Se lavó la monocapa 2 veces con PBS para eliminar la gentamicina. Después del último lavado se agregó 1ml de TritonX-100 al 0.1% (disuelto en agua destilada) para lisar la monocapa.
- 8) Las bacterias liberadas fueron cuantificadas por diluciones seriadas y plaqueando en agar LB.

Los resultados se interpretaron como: $\frac{\text{Total de UFC recuperadas de 1 pozo}}{\text{UFC del inóculo}} \times 100$

^a Microscopio IV Leika, Alemania.

^a Gentamicina, Gentayet ,Browel,México.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

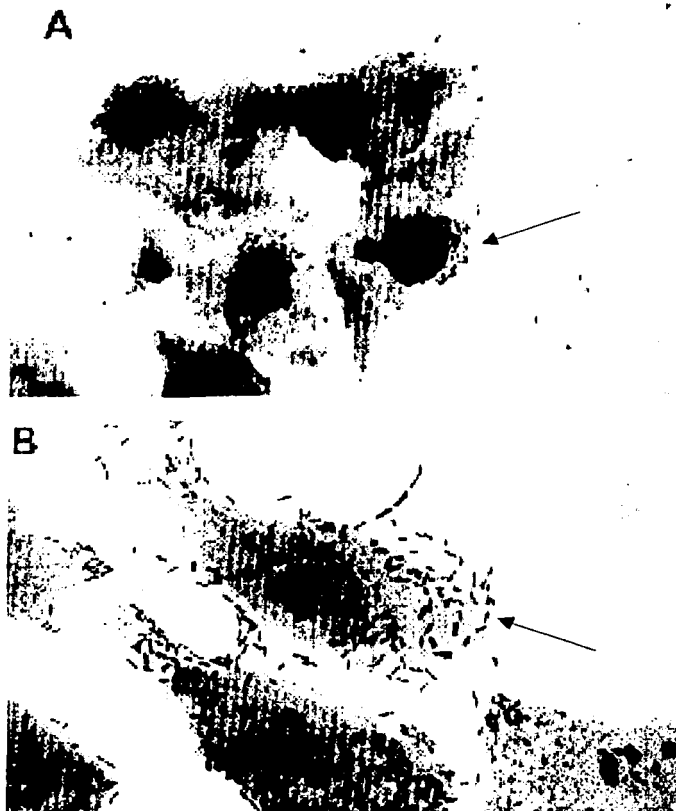


FIGURA 6.

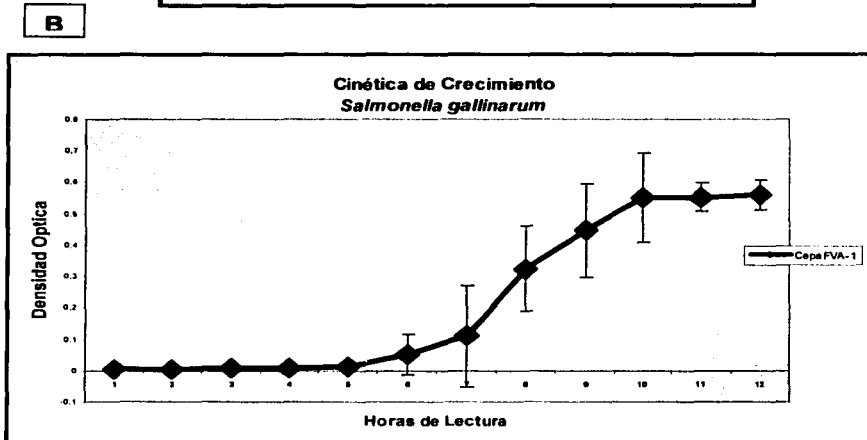
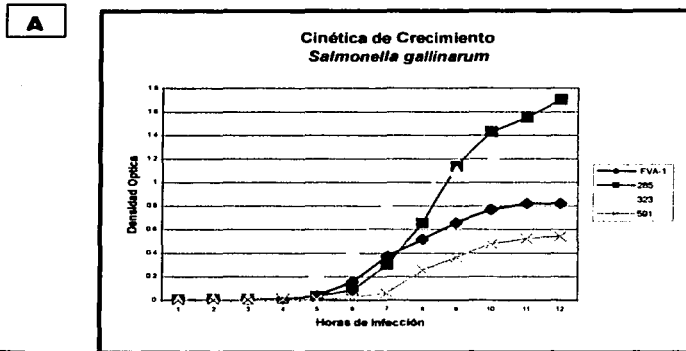
Interpretación Visual del Ensayo de Adherencia.

a) Adherencia Localizada y b) Adherencia Difusa.

RESULTADOS.

Cinéticas de desarrollo.

Se realizaron cinéticas de crecimiento de las cepas previamente descritas, en especial de las cepas FVA-1 y FVB-323, las cuales se usaron a lo largo de este estudio. Con los datos obtenidos se observó que *S. gallinarum* cepa FVA-1 y cepa FVB- 323 conservaron un patrón de desarrollo muy similar, dando un desarrollo logarítmico temprano a las 5 h, una fase logarítmica tardía de las 7-9 h y una fase estacionaria a las 10 h (Figura 7).



C

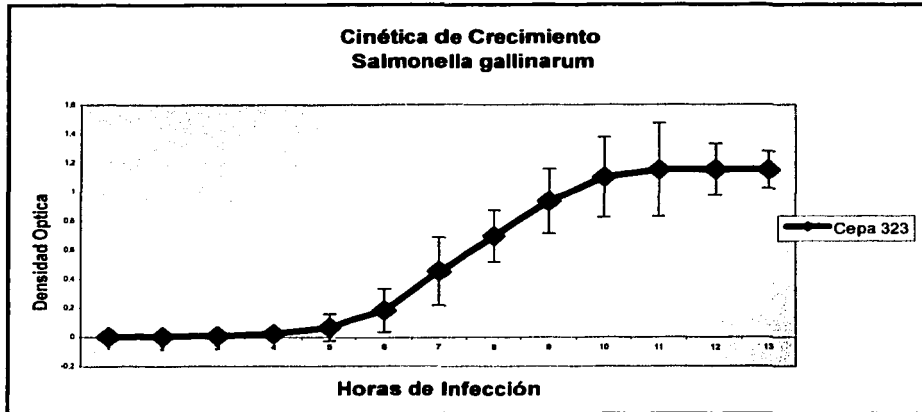


FIGURA 7.- En el panel A se muestra la cinética de crecimiento de varias cepas de *Salmonella gallinarum*, el panel B de *S. gallinarum* cepa FVA-1 y en el panel C de *S. gallinarum* cepa 323. Los datos muestran la media y el error estándar, el experimento se realizó por triplicado.

Al mismo tiempo que se realizó la cinética de desarrollo bacteriano, se elaboraron diluciones seriadas de cada hora de infección para determinar UFC. Los datos muestran la media geométrica, el ensayo se realizó por triplicado Tabla 4.

Tabla 4 Unidades Formadoras de colonias

Cepa	0h	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	9h	10h	11h	12h
FVA1	1.5×10^8	2.2×10^8	6.0×10^8	9.0×10^8	3.0×10^9	6.3×10^9	6.5×10^9	8.0×10^9	8.0×10^9	1.5×10^{10}	7.0×10^9	5.0×10^9	9.0×10^9
323	1.0×10^8	1.4×10^8	4.4×10^8	7.0×10^8	1.3×10^9	3.9×10^9	4.7×10^9	6.0×10^9	4.0×10^9	1.0×10^{10}	5.5×10^9	3.0×10^9	4.5×10^9

Inoculación en Embrión de Pollo.

Todas las cepas de *S. gallinarum* fueron inoculadas en embrión de pollo con 10000 bacterias cada una. Cada día los embriones de pollo fueron revisados para determinar muerte embrionaria, la cual se observó dos días después de la inoculación. Los embriones de pollo mostraron las siguientes lesiones: hemorragias, líquido amniótico turbio, licuefacción de la yema, olor putrefacto y enanismo (FIGURA 8).

Las cepas que produjeron mayor daño en el embrión de pollo fueron FVA-1, U2, FVB-323 y FVB- 591, por lo tanto, se les consideró como las más patógenas. Con base en estos resultados, las cepas FVA-1 y FVB-323 se seleccionaron para el resto de los experimentos.

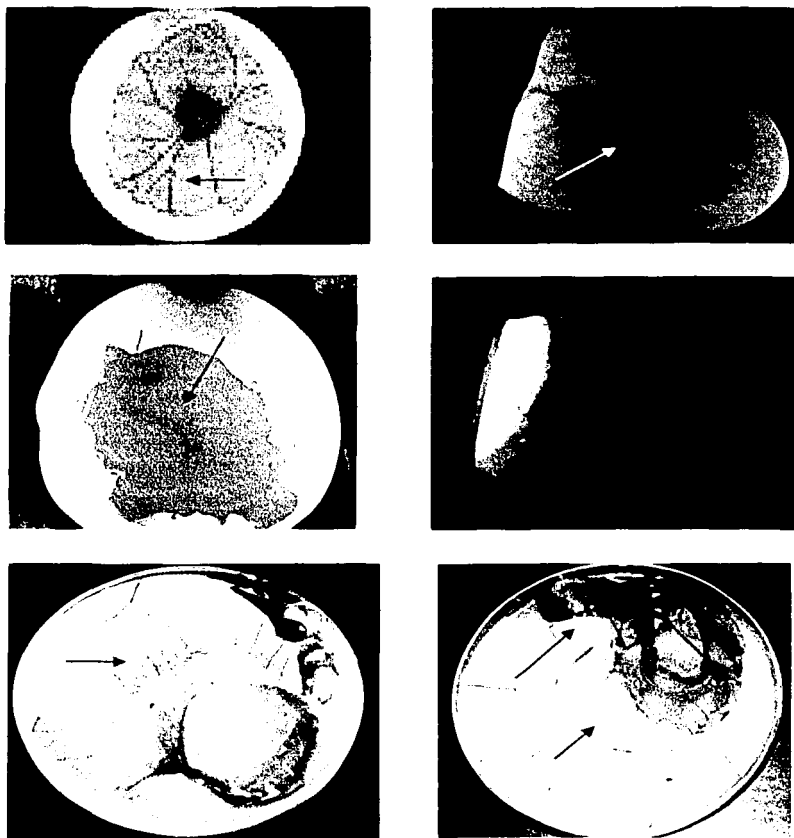


FIGURA 8. Inoculación de embrión de pollo con *S. gallinarum* FVA-1. A) Embrión de pollo viable. La flecha muestra la circulación en vasos sanguíneos; B) Embrión de pollo muerto, la flecha muestra la falta de circulación; C) Embrión de pollo sin inocular (control) y; D) Embrión inoculado que presenta: hemorragias, congestión, y licuefacción de yema.

Se determinó el número de UFC's recuperadas después de la infección, para ello se plaquearon las tres últimas diluciones (10^{-3} hasta 10^{-5}) y se recuperaron 3.79×10^8 UFC / ml.

De todos los embriones infectados se logró recuperar a las cepas en cultivo puro, a todas estas cepas se les realizaron pruebas bioquímicas utilizando tanto sistemas de identificación comerciales como pruebas bioquímicas elaboradas en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ- UNAM y se compararon con la identificación de *S. gallinarum* reportada por Cowan¹¹¹ Tabla 6 .

Tabla 6. Identificación de las cepas de *S. gallinarum* por pruebas bioquímicas. En la primera fila con las iniciales ID se muestra la identificación dada por Cowan para *S. gallinarum*. En las siguientes filas se muestran las diferentes cepas de campo. Con color rojo se resaltan las diferencias obtenidas con respecto a lo reportado por Cowan.

d = dudoso, - = negativo, + = positivo, v = variable

	TSI	H ₂ S	INDOL	MOTILIDAD	CITRATO	UREA	MALTOSA	DULCITOL	LD	RAMNOSA	ONPG
ID	2,3,4	d	-	-	-	-	v	+	+	v	-
323	3	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
285	4	+	-	-	v	-	+	-	+	+	-
9R	2	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
591	3	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
U-2	3	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
9184	3	+	-	-	-	-	+	v	+	-	-
FVA-1	2	+	-	-	v	-	+	+	+	+	-
347	2	+	-	-	v	-	+	+	+	+	-
415	2	+	-	-	v	-	+	-	+	+	-
383	3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-

Las reacciones que dieron las cepas de *Salmonella*, en su gran mayoría coinciden con la descrita para *S. gallinarum*; a excepción de los resultados negativos al sembrar en dulcitol. Estos resultados negativos se comportan como posibles cepas de *Salmonella pullorum*, ya que anteriormente se consideraba un biotipo de *Salmonella gallinarum*.

Amplificación de los genes del operón *lpf*

Utilizando los oligonucleótidos anteriormente descritos y como referencia, la secuencia del operón *lpf* de *S. typhimurium* (FIGURA 9), se pudo obtener gran parte del operón *lpf* de *S. gallinarum* cepa FVA-1 y FVB-323. Los oligonucleótidos *lpfA* 1-2 amplificaron un producto de PCR de 596 pb, *lpfE* 1-2 dio un producto de amplificación de 616 pb (FIGURA 10), *lpfB* 1-2 amplificó un producto de 1440 pb (FIGURA 11) y *lpfD* un producto de 1394 pb (FIGURA 12).

1	aaaagctctt	gtggcggag	taggggtgcta	accttctgcg	ttatctttgc	gctgttaatt
61	atctcgtctg	cactttccac	cactattcgc	cagccgcagc	gggagggggt	tagcgaagcg
121	tctcgtaac	acatgcaaca	ccaggcgtac	agcgcaccca	tttgggtgcc	ttttttttat
181	ttagcacaaa	tacctaatac	attgtagtta	aaaaaacgtc	taataaataa	ggaagacatt
241	taacttattt	atgaatagga	agaaaataa	tattaattat	attaatttat	tcttaataaa
301	aaattacatt	tatgtacatt	ccatttgtaa	tatattgatt	tctattcttt	ttaagattaa
361	ctaacaatta	ttttatata	tactaattat	agtatccaat	accoactctt	ataoactcca
421	tttcttcaca	gaatgcagat	aatcctaagg	atgctgtctg	ttatctaccg	tcataaatgg
481	agtttttaat	gaaaaaggtt	gttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tccacttctg
541	ctttcgcctg	tgaatctggt	gacggcacc	ttaaattcac	cggtgaaatc	gttgacgcgc
601	catcgcctgt	ttctactgac	tcccagaacc	aggaagtgtt	gctgggtcag	gtttaagaaaa
661	atatcttcaa	agccattggc	gacaagtctt	cttctaagcc	tttccagatc	aaactggaag
721	actgtgacat	caactctaat	accaaggtta	acgtaagctt	caatggcggt	ggtgatacag
781	acgatgcgac	actggtttct	gnttaacactg	aagcaggtgc	ggcaactggc	gctggcatcg
841	gcatctcttt	tttttttttt	tttttttttt	aaatgaacac	cggtaaatcc	accactacgt
901	tggctgctgg	tcagaccgtg	ctgtactaca	ccgctaacta	cgttgcaaca	aaagatactg
961	taaccactgg	ttacggtaac	gcagaagtgg	acttcaacct	gtctcaccga	taactcgaatt
1021	ttcgttaata	ctacgaatca	taatggcaac	ggaaatcccg	ttgccatttt	ttccagcttt
1081	tttttttttt	tttttttttt	aaccgctcac	gtttgatatt	ttgcacagca	ctggtgctgg
1141	cgtttgattg	tcaaaacagt	tttgccggag	gctgtggcatt	aagcagcacc	cgtgttattt
1201	atgacggtag	taqaaaggaa	gcttctctta	cggtaaataa	taaaagcacc	accgatgaat
1261	ttctcatcca	gtcatggatt	gatgatgcta	acggttaata	aaagacgcc	tttatcatca
1321	ctccaccggt	attttaaatta	agcccgacta	aaaaataacgt	tttaagctatt	gttaatacga
1381	cgaaacagtt	accgcaggat	cgcgagtcgc	tttatggat	taacgtaaaa	gctattcctg
1441	ccaaaagtga	agacgcggaa	gctaaaaacg	tactgcagat	cgcgctacgt	accgcgttaa
1501	aactgtttcta	tcgcccggcg	gcgctgaaa	cgaaatagcat	ggcggctctg	aacaaactgc
1561	agttccaccag	cgcaggggct	aaccagatca	aagtggaaaa	cccactctgc	tttaacctga
1621	cgtttaataa	attttatgce	aaacggccgtg	atattgaaaa	aacgggaatg	gttccggcaa
1681	aaggtcattt	gaatattgaa	ctgccagccg	gcaccggcaa	ggtaagcgaa	gttaaataca
1741	acattattaa	tgactttggc	actgctggcg	acatgttgac	acagcgcggt	aactaacacg
1801	ttttaaagga	tttactactt	gctatgtagc	catcttctct	ttgaatctaa	gacctcgcgt
1861	ttcaccgagt	ctacgcttgc	gctgatgata	gcccgtacgc	tcccgcggt	tgccgggaaca
1921	tttaacccgc	gcttctctga	ggatgtgccc	ggatctgac	agcaagctta	cctttcaatg
1981	tatgaatcca	ataaagctga	acacctgcca	ggtaaaatac	cgctctcgg	ggtggtoaac
2041	gaaaaaaaaa	tggagtctct	cacctgggag	tttaaggcag	cgaaagagge	gcagccgcga
2101	aaaaatgggtg	aattccctggt	ccgctgctta	agtcgctg	agcttgaaga	tatggcgctg
2161	cgattgata	gcttcccgcg	gctgaaaatg	gcccgcctg	aagcctgtgt	tgcttttgac
2221	gacattattt	cccagccgcg	caqcaatttc	gactttccag	acccagcaat	gatcaatgac
2281	ttcccgcagg	ctcgcattgaa	gcagacagcg	ccgggtaccg	tgccagaatc	gcagctgggac
2341	gaaggggtga	atgcocctgt	ggtggattat	aaactttccg	gcagcaaacg	acgctatgac
2401	gcacacgaca	gtgaaaccag	ctacaacagc	gacagctact	atctgaatct	gcgcagcgg
2461	atgaaccttg	gggcatggcg	gttacgtaac	tatagcacct	ggacgcgaaa	cgacggtaac

2521	aacacatggg	ataacatggg	cacatccetta	agccgtgcc	ttgtaccgct	gaaatcacag
2581	ctgacgttgg	gggataccctc	cactgcccgt	gatatttttg	acagcgttca	gatgcccgtg
2641	gtgcaggttaa	cttccgcagca	agagatgctg	cctgacagcc	agccgcttca	ctgcgccctg
2701	atccggatgg	ttgcccaaaag	taacgccqaa	gttaccgltg	agcagaaba	ctacgttat
2761	taccgttaagt	ttgttcaagcc	gggtgcgltt	gaaatlaacg	acctgtatcc	aacctcaaac
2821	agcgggcgacc	tgacggtccac	cattaaagaa	tgagaccgca	gtgagcagaa	gcttcgltcaag
2881	ccgttctcct	ccgtgcccgt	ccfccaagct	gaaggccatc	tcaaatcag	cctttccgcc
2941	ggggaaatacc	gtgcccgggaa	ctataaacagc	gccagaccga	aatccgggca	gcttgcgtcc
3001	atgtaaccgcc	tgcgcttatgg	ctttaccgtt	tacgggtggtg	cgatctttct	ttccgactat
3061	tactcgtctgg	ggggaggatt	aggtaaaaaac	ttcggttata	tcgycggctc	ttccatcgat
3121	gtaaccocagg	caaaaagcaa	gctggcaaat	gaggagaaat	cggaaggtca	gtcttatcgt
3181	ttcctctact	ccaagagctt	taacagcggg	acagatttcc	gtctgctggg	ttacaagtat
3241	tgcaccagcg	gctatlaaac	cttccaggaa	ggacaggtg	tgcacccga	tgccgacagc
3301	tctttagccg	agtaaccacaa	acgtagtccg	attccagggca	acctgaccga	gcaactgggc
3361	gctggggct	gggtctattt	taacgtcccg	cagcggga	actggaaaga	gttaggtaaa
3421	cagcgttccg	tgaattgccgg	ttataaacggc	cgtattggcc	ccgtgaacta	cagcgttctg
3481	tacacccrga	cyaaaagccc	ggngtgggtt	gagagcgtc	gtttactgtc	gtttctcctg
3541	tcgatccac	ttgggaccgct	gtggagtaac	taccacctca	cgaccgatca	gcattggccga
3601	accaaccagc	agtttaaggtt	gagggccacc	ggcgtgaaag	accacaacct	gaactatagt
3661	gtgcaggaag	gctaccggcag	caaccggcgtg	ggtaacagcg	gcagcgtgaa	ctcggattac
3721	caggccggcc	tgggtaccgc	caacctgggt	tcaaaccaca	acctgaccga	ccaacaggtt
3781	gaactaccgt	ttggccggcg	tgtaatagcc	catagccgaag	gtatcaacct	ttctcaaccg
3841	ctgggtgaat	ccatggccct	tattcccgcg	ccggccggcc	gcgcgcgcc	cgtgatcaac
3901	aacggtgggtg	tggaaagtgg	ctggatgggt	aatggcgtcg	taccttacct	tactccgtac
3961	cgtgaaacag	aagttctcacl	ggcaagcggc	agcctgaaca	accaggttga	ctctgatacc
4021	gctcccgcca	acgtagtgcc	gacacgcggc	gggatgttcc	gtgcccgtt	cgataccoga
4081	gtggcctatc	ctgtctctgat	gaaletgacg	cagjcccaatg	gcaagccgtt	cccggtttggt
4141	gctaccgccca	cgctgctgga	taccacaaaa	gagtcocaga	gcattgtggg	tgaaagcgtt
4201	cagcttata	tccgcccgat	gcggcagaana	ggtgcccttc	aggtgaactg	gggtaaagac
4261	caggcaacgc	aatgccccgt	ggcgtttacg	ctgcccgaac	aacaggataa	taccggcgtg
4321	gtgatggcga	atggcctctg	cccgtaaacg	ggaaaggaac	gattatctt	ctggcagcgg
4381	taactcttca	gctctctctc	ctggatcttg	ttgggtctct	ggggcagcgg	ctggcagcgg
4441	gatttttgg	gatttttct	ctggatcttg	ttgggtctct	ggggcagcgg	ctggcagcgg
4501	taactcttca	gctctctctc	ctggatcttg	ttgggtctct	ggggcagcgg	ctggcagcgg
4561	ggatcttca	tggatcttca	ggatcttca	ggatcttca	ggatcttca	ggatcttca
4621	atgacccctt	atllaagpat	atjgttccle	atjgttccle	atjgttccle	atjgttccle
4681	cccttctca	gatttttca	cttttttca	cttttttca	cttttttca	cttttttca
4741	aggaatatac	gttaaacacac	cgtagtaaac	tgacaaacaa	ccactctcag	tgcttccaaa
4801	atgcccagtag	taaaatgca	atattggacat	ccggtggca	aggtccctca	tgactctata
4861	ttctccatcc	gtttgtgggtt	gaaagttatta	taactagcac	caaaataatg	gactttcttg
4921	taccacagaa	accactata	ttggcagta	taactagcac	caaaataatg	gactttcttg
4981	caattaccggt	accacagggc	tgtagaacct	ccagcggcag	caactctcag	tgcttccaaa
5041	gggaattttaa	ggccactgat	ttttaaagatc	gcaaaagaca	aggttccca	tgactctata
5101	aattcaacaa	agagctcgag	ttttaaagca	ccaatatttc	ccatggccta	gactttcttg
5161	tgcctatttga	gggaatgcaa	atgcctaatg	attccaatcc	catggcctatg	ggcaacccgg
5221	atattccgctg	cgtcaatggag	ggccttaacg	gttaaaattt	ggtgcaaaat	gagccagctg
5281	ttatccaaaa	gctcaacgta	ttggctcttg	tttaagaaac	accccgtacc	gactcaacga
5341	ccattccgctc	ttaccctatc	agtaaccacgg	gcaatctcc	agccgcccgg	gacttccagg
5401	aatctccacc	catgcctatt	gattgtaggt	agcaggaatg	aaaaaccttc	atgctttgat
5461	ggccagctat	ctactcctta	ccgcttccgc	gatggcggca	ccctcgaata	ctcggttctgc
5521	tggtgatatac	caactttacca	ttactattaa	ggcggctacc	tgtagaacctg	aaaacagacg
5581	tatgcagctc	aaatctggaga	ccgctggtgct	tcagcccccg	gtaaaagtgg	gtaaaagcgt
5641	gaaccagaaa	aactttagca	tcggttaaa	agattgcggc	tatgccacaa	agccacagct
5701	tacgatggac	ggtttctccg	accgcactga	cccctgcctt	tttgccttgg	atagccggcg
5761	cgcgaacggc	gctcaacgta	aaattaaac	atctgggtggg	gagcaacaa	accctccagc
5821	taccgactct	accgctgtcg	aacacactgt	ctggtttgat	ggtacgaaca	agctgaacta
5881	tatccgcagc	tatgtcctg	ttaaagccga	tgcaccgctt	ggcacagga	atcgcagcgt
5941	gaatttttagc	gtcaacatag	aataatcact	gagggccagt	tcctgtccct	ttccactttt
6001	agtgattttt	tgtaaaaaact	tctccgatca	cactctcggg	tgcaatctc	actatgctgg
6061	tggctcactt	aaccgtgctt	gtagactttc	taacattctg	cgttagccgc	atattacct

```

6121 gtttgattaa agaatcggtg tacaggctcg ttttatcccg attccccagg gtttgtttgc
6181 atgagataca ttaaatacga gacgcaacag aaacttagtt tcttgcttgc gctctataac
6241 ggtctgttta tgaattgcgc cgtgttttac cgccgtttcg gcagttatgc acaagaattd
6301 accatttggg aaggcctctc cgcagttgtc gaactggggc ccacggtgct ggtcacttcc
6361 ttcttacttc gtcttcttcc actgtttggc cgacgcgctc ggcggtgctt ggccacgctg
6421 gtggtgctgt tttccgctgg cgcagttat tacatgacct tcctgaaact ggtgatggc
6481 tacggcatta ttgcgtctgt tatgaccacc gatatcgatc tctcgaaga ggtgggggg
6541 ctgcactttg tattgtgctt gatggccgtg agcgtgcttc cgctcatctt tatctggagt
6601 aaccactgtc gctacacgtt gttgcgccag ctacgtacgc cggggcagcg ttttcgacg
6661 gccgctgtag tggctactcg aggcgtaatg gttggtggcg ctattccctt gctggatata
6721 cagcaaaaaa aggttgaacg ggcgacaggg atcgacttac ccagctatgg cggcggtggg
6781 gcgaactcct acctgcctcc aaactggtta tctgcgctag ggctgtatgc ctgggcccag
6841 gtagatgagt cgtcggacaa taattcgtta ataaaccggc ccaggaaatt tacctatggt
6901 gcgccgaaag atggggatga cacctacgtc gttttcatta tcggtgagac gaccggttgg
6961 gatcacatgg ggattttcgg ctacgagcgt aataccacgc cgaagctggc gcaggaaaaa
7021 aatctggcgg cgttccgcgg ctattcctgc gataccgcca cgaag

```

Figura 9. Secuencia del operón *lpf* de *S. typhimurium*.

En colores se indica cada gen y en color verde los oligonucleótidos utilizados.

lpfA (477...1013), *lpfB* (1098...1796), *lpfC* (1819...4347), *lpfD* (4365...5432), *lpfE* (5438...5965).



Figura 10. Amplificación del producto de PCR de la cepa FVA-1. Carriles 1 y 4 Marcadores de Peso Molecular (1 kb y λ *HindIII* respectivamente), Carril 2 producto de *lpfA*, y Carril 3 producto de *lpfE*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

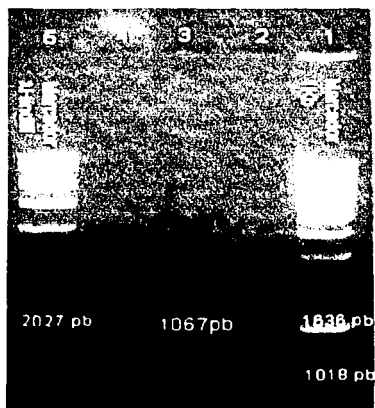


Figura 11. Amplificación del producto de PCR de la cepa FVA-1. Carril 1, Marcador de Peso Molecular 1 kb, Carriles 2 y 4 producto de *IpfD*, Carril 3 vacío, y Carril 5 Marcador de Peso λ *Hind* III.

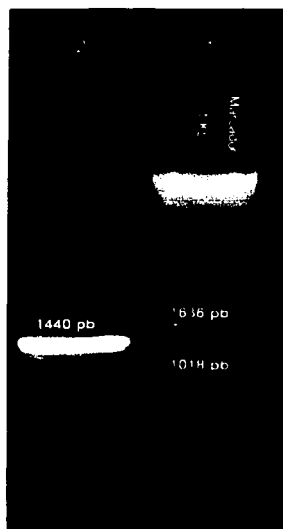


Figura 12. Amplificación del producto de PCR de la cepa FVA-1. Carril 1, Marcador de Peso Molecular 1 kb, y Carril 2 producto de *IpfB*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN


```

404 CCGGTAATCCACCACTACGTTGGCTGCTGGTCAGACCGTGCTGTACTACACCGCTAACT
421 ACGTTGCAACAAAAGATACTGTAACCACTGGTTACGGTAACGCAGAAGTGGACTTCAACC
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
464 ACGTTGCAACAAAAGATACTGTAACCACTGGTTACGGTAACGCAGAAGTGGACTTCAACC
481 TGTCCTACGAATAA

```

Figura 13. Secuencia nucleotídica de *lpfA* de *S.gallinarum* (color azul), comparada con *S. typhimurium* (color negro). Los nucleótidos diferentes se señalan en color rojo.

De igual manera se realizó la respectiva predicción de aminoácidos tanto de *S. typhimurium* como de *S. gallinarum*, al compararlas, se pudo apreciar que a *S. gallinarum* le faltaron los primeros 15 aminoácidos, debido al diseño de los oligonucleotidos. La secuencia muestra dos cambios en aminoácidos (FIGURA 14).

```

1 TCGCTGTAGTTTTCACCTTCTGCTTTCGCTGCTGAATCTGGTGACGGCACCATTAATTC
1 A V V F T S A F A A E S G D G T I K F T
61 CCGGTGAAATCGTTGACGCGCCATGCGTCGTTTCTACTGACTCTCAGAACCAGGAAGTTG
21 G E I V D A P C V V S T D S Q N Q E V V
121 TGCTGGGTCAGGTTAAGAAAAATATCTTCAAAGCCATTGGCGACAAGTCTTCTCTAAGC
41 L G Q V K K N I F K A I G D K S S S K P
181 CTTTCCAGATCAAAC TGGAAGACTGTGACATCACCTCTAATACCAAAGTTAACGTAAGCT
61 F Q I K L E D C D I T S N T K V N V S F
241 TCAATGGCGTTGGTGATACAGACGATGCGGACACTGGTTTCTGTTAACACTGAAGCAGGTG
81 N G V G D T D D A T L V S V N T E A G A
301 CGGCAACTGGCGTGGGCATCGGTATCTACGACAACGCTAACAAAGCTTGTTGAAATGAACA
101 A T G V G I G I Y D N A N K L V E M N T
361 CCAGTAAATCCACCACTACGTTGGCTGCTGGTCAGACCGTGCTGTACTACACCGCTAACT
121 S K S T T T L A A G Q T V L Y Y T A N Y
421 ACGTTGCAACAAAAGATACTGTAACCACTGGTTACGGTAACGCAGAAGTGGACTTCAACC
141 V A T K D T V T T G Y G N A E V D F N L
481 TGTCCTACGAATAATCGAATTTTCGTTAATACAGACAATCATAATGGCAACGGAAATCCC
161 S Y E * S N F R * Y R Q S * W Q R K S R
541 GTTGCCATTTTTCACGCGGAGGCT
181 C H F F Q R R

```

Figura 14. Secuencia de aminoácidos de *S. gallinarum*, en letras rojas se indican los diferentes aminoácidos con respecto a *S. typhimurium* y en color azul se muestra el término de la secuencia.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Con la secuencia de aminoácidos obtenida, se realizó una predicción de estructura secundaria, con ayuda del programa de computo 3D-pssm (Figura 15).

```
Pred: CEEEECCCCCCCCCEEEEEEEEEEECCCEEECCCCCEEECCCHHHHCCCCCCCCCEE
AA: AVVFTSAFAAESGDGTIKFTGEIVDAPCVVSTDSQNQEVVLGQVKKI FKAIGDKSSSKP

Pred: EEEEEEECCCCCCCCCEEEEEEEEEEECCCEEECCCCCCCCCEEEEEEECCCCCEEECC
AA: FQIKLEDCDITSNTKVNVSFNGVGD TDDATLVSVNTEAGAATGVGIGIYDNANKLVMNT

Pred: CCCCECCCCCEEEEEEEEEEECCCEEECCCCCEEEEEEEEEEEEC
AA: SKSTTTLAAGQTVLYYTANYVATKDTVTTGYGNAEVDNLSYE
```

Figura 15. Predicción de estructura secundaria de Ipfa.
E= Hoja β plegada C= Asa suelta H= α Hélice

Al mismo tiempo, este programa fue capaz de identificar homologías de estructuras con respecto a proteínas de otras bacterias (Figura 16).



Figura 16. Estructura de PapK, subunidad del pili de *Escherichia coli*.

Y

361 GAAGCTAAAAACGTACTGCAAATCGCCGTACGTACCCGCTTAAACTG
 121 E A K N V L Q I A V R T R L K L

D A

B2

1 AAAGTGCAGTTCCCCAGGCCAGGGGCTAACAGATCAAAGTGGAAAACCCATCTGCCTTT
 1 K L Q F P R P G A N Q I K V E N P S A F
 T S A
 61 AACCTGACGTTTAAATAAAATTTATGCCAACGGCCGTGATATTGAAAAAACCGGAATGGTT
 21 N L T F N K I Y A N G R D I E K T G M V
 F
 121 CCGGCAAAAGGCTCATTGAATATTGAACTGCCAGCCGGCCCCGGCAAGGTAAGGGAAAGTT
 41 P A K G S L N I E L P A G P G K V R E V
 T S
 181 AAATACACCATTATTAATGACTTTGGCACGGCTGGCGACATGTTGACACAGCGCGTTAAC
 61 K Y T I I N D F G T A G D M L T Q R V N
 N
 241 TAACACG
 81 * H

Figura 18. Secuencia de aminoácidos de *S. gallinarum*, en letras rojas se indican los diferentes aminoácidos con respecto a *S. typhimurium*.

Con los oligonucleótidos diseñados para *lpfB*, se alcanzaron tomar 402 pb de la parte amino terminal de *lpfC* (Figura 19).

1 ATGACATGGA CGCATCTTCC TCTGGGCAAT AAGACCTCGC GTTTCACGCA GTCTGCGCTT
 61 GCGCTGATGA TAGCGGGTAC GCTCCCCGCG TATGCGGGAA CATTTAACCC GCGCTTCTGT
 121 GAGGATGTGC CGGGTATTGA TCAGCACGTT GACCTTCAA TGATGAATC CAATAAAGCT
 181 GAACACCTGC CAGGTAATA CCGCGTCTCG GTGGTGGTCA ACGAAAAAAA AATGGAGTCT
 241 CGCACCTGG AGTTTAAAGC AGCGACAGAG GCGCAGCGCG CAAAAATGGG TGAATCCCTG
 301 GTGCCGTGCT TAAGCCGCGT GCAGCTTGAA GATATGGGCG TGCGATTGA TAGCTTCCCG
 361 GCTCTGAAAA TGGCCCCGCC TGAAGCCTGT GTTGCTTTTG AC

Figura 19. Primeras 402 pb del gene *lpfC*.

Se realizó la respectiva predicción de aminoácidos y se comparó con *S. typhimurium* (Figura20), la cual, resulto idéntica.

1 ATGACATGGACGCATCTTCTCTGGGCAATAAGACCTCGCGTTTACAGCAGTCTGCGCTT
 1 M T W T H L P L G N K T S R F T Q S A L
 61 GCGCTGATGATAGCGGGTACGCTCCCCGCGTATGCGGGAAACATTTAACCCGCGCTTCTGT
 21 A L M I A G T L P A Y A G T F N P R F L
 121 GAGGATGTGCCGGGTATTGATCAGCACGTTGACCTTTCATATGATGAATCCAATAAAGCT
 41 E D V P G I D Q H V D L S M Y E S N K A
 181 GAACACCTGCCAGGTAATAACCGCTCTCGGTGGTGGTCAACGAAAAAAAATGGAGTCT
 61 E H L P G K Y R V S V V V N E K K M E S

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

241 CGCACCTGGAGTTTAAGGCAGCGACAGAGGCGCAGCGCGCAAAAATGGGTGAATCCCTG
 81 R T L E F K A A T E A Q R A K M G E S L
 301 GTGCCGTGCTTAAGCCGCGTGCAGCTTGAAGATATGGGCGTGCATTTGATAGCTTCCCG
 101 V P C L S R V Q L E D M G V R I D S F P

361 GCTCTGAAAATGGCCCCGCTGAAGCCTGTGTGCTTTTGAC
 121 A L K M A P P E A C V A F D

Figura 20. Predicción de aminoácidos de la secuencia de *lpfC* de *S. gallinarum*.

La secuencia de *lpfD* de *S. gallinarum* fue comparada con un banco de genes, y se obtuvieron los siguientes resultados: Tabla 9.

BACTERIA	GENE	IDENTIDAD
Salmonella typhimurium LT2	Long Polar Fimbriae (A,B,C,D,E)	571/583 97%

Tabla 9. Comparación de nucleótidos de *Salmonella gallinarum lpfD*.

Se realizó la respectiva predicción de aminoácidos (FIGURA 21).

1 GTAACCTGACAAACAACCGCTCTCAGTGTTCGCAAAATGCAAGTAGTAAAGATGCAATAT
 1 N L T N N R S Q C S Q N A S S K D A I W

61 GGACATCCGGTGGCAAAGGTCACTTATCGCTCTATATCTCCATCCGTTTGTGGGTGAAA
 21 T S G G K G H L S L Y I L H P F V G E S

121 GTATTATACCTAGCACCAAAAATAATGGACCTTTTGTGACAAAGAAACCCAGTGTATATG
 41 I I P S T K I M D L F V T K K P S V Y G

181 GCAGTATACCTGCGTCTGTATATATCAGTGGTTC AATTACGGTACCTCAGGGCTGTG
 61 S I P A S S V Y I S G S I T V P Q G C E

241 AACTCTCCAGCGGCAGCAGCTGGAATTCGTTTGGGGAATTAAGGCCACTGATTTTA
 81 L S S G S T L E I P F G E F K A T D F K

301 AAGATCGCAAAGGACAAGTTGCAAAGAACGCCACGAAATTCACCAAAGAGCTGCAGTTTA
 101 D R K G Q V A K N A T K F T K E L Q F K

361 AATGCACCAATATTTCCGATGGCGTAAAGATCTTCCTGCGTATTGAGGGAATGCCAAACG
 121 C T N I S D G V K I F L R I E G M P N A

421 CTAATGATTCGAATGCCATCGACATGGGCAACCCGGATATCGGTGCCGTCATTGAGGGCG
 141 N D S N A I D M G N P D I G A V I E G A

481 CTAACGGTAAAATTTTGGTGCCAAATGACGCCAGTGTTAATCAGGAGCTGAGCGTATCGG
 161 N G K I L V P N D A S V N Q E L S V S G

541 GTCTTGTGACGACACGCACCGTACC GCCTCAACGACCATTTCCGCTTACCCTATCAGTA
 181 L V D D T H R T A S T T I S A Y P I S T

601 CCACCGGCAAATTTCCGGCCCGGGGATTTCCGAGGGAATGCCACCATGCGTATTGATG
 201 T G K L P A A G D F E G I A T M R I D V

661 TGGAGTAA
 221 E *

Se realizó la respectiva predicción de aminoácidos (FIGURA 23).

```

1      CTTACCGCTTCCGCGATGGCGGCACCGTCTAATATCGGTTCTGCTGGTGATATCCACTTT
1      L T A S A M A A P S N I G S A G D I H F

61     ACCATTACTATTAAGGCGGTACCTGTGAACTGGAAAACGACAGTATCGACGTC AATATG
21     T I T I K A A T C E L E N D S I D V N M

121    GAGACCGTGGTGCTTCAGCGCCCGGTAAAAGTGGGTAAAGAGCTGAACCAGAAAACTTT
41     E T V V L Q R P V K V G K E L N Q K N F

181    AGCATCGGCTTAAAAGATTGCGCGTATGCCACAAGGCCAGCGTTACGATGGACGGTTCT
61     S I G L K D C A Y A T K A S V T M D G S

241    CCGGACCCGACTGACCCCTCGCTTTTTGCCCCTGGATAGCGGGCGGCGACGGGCGTGTGCG
81     P D P T D P S L F A L D S G G A T G V S

301    TTAAAAATTTAAACATCTGGTGGGGAGCAACAATACCCCTCCAGTACCGACTCTACGCCT
101    L K I K T S G G E Q Q Y P S S T D S T P

361    GTCGAACACACTGTCTGGTTTGATGGTACGAACAAGCTGAACTATATCGCCAGCTATGTG
121    V E H T V W F D G T N K L N Y I A S Y V

421    CCTGTTAAGCCGATGCCACCGTTGGCACAGCGAATGCGACGGTGAATTTTAGCGTCACA
141    P V K P D A T V G T A N A T V N F S V T

481    TACGAATAACTACTGAGGGCCAGTTCGCTGGCCCTTTTCCATTTTGTAGTATTTTTGTGA
161    Y E * S L R A S S L A L F H F * * F F V

541    AAAATCTTCTCCGATCACACT
181    K I F S D H T
  
```

Figura 23. Predicción de aminoácidos del gen *lpfE* de *S. gallinarum*.

Hemoaglutinación en placa

Con el fin de determinar la fimbria tipo I de nuestras cepas, se realizaron hemoaglutinaciones en microplacas (FIGURA 24). El experimento se realizó por triplicado.

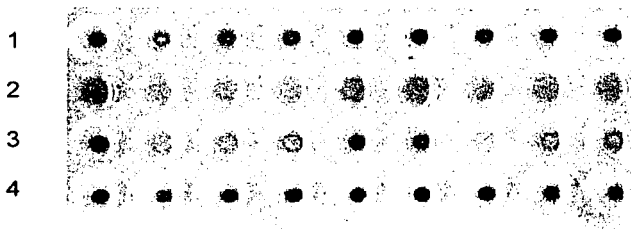
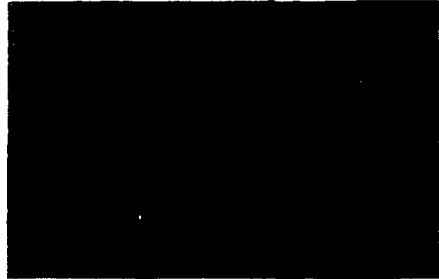
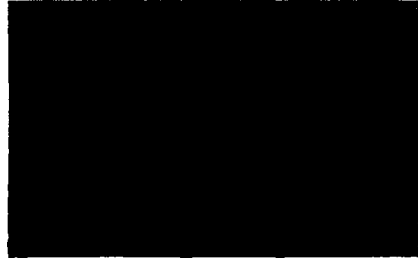
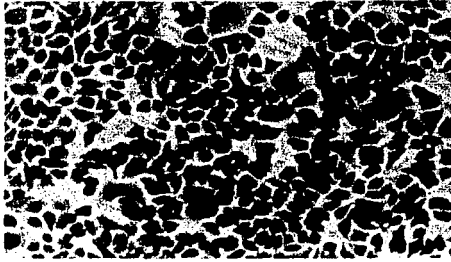


Figura 24.
Carril 1 cepa FVA-1 de *S. gallinarum*.
Carril 2 cepa 938 de *S. typhimurium*.
Carril 3 cepa 323 de *S. gallinarum*.
Carril 4 *S. typhi*.

Cultivo Celular

En los ensayos de cultivo celular se evaluó la adherencia de *S. gallinarum* a diferentes tiempos de infección (5, 10, 15, 20, 25 y 30 min), esto con el fin de determinar aproximadamente el tiempo que tardó *S. gallinarum* en adherirse a las células epiteliales. Es importante resaltar que los resultados de adherencia fueron únicamente cualitativos (adherencia difusa, adherencia localizada o ambas)(FIGURAS 25 y 26). Además, estos ensayos fueron acompañados de ensayos de protección de la gentamicina, para corroborar el papel de la adhesión en la invasión.

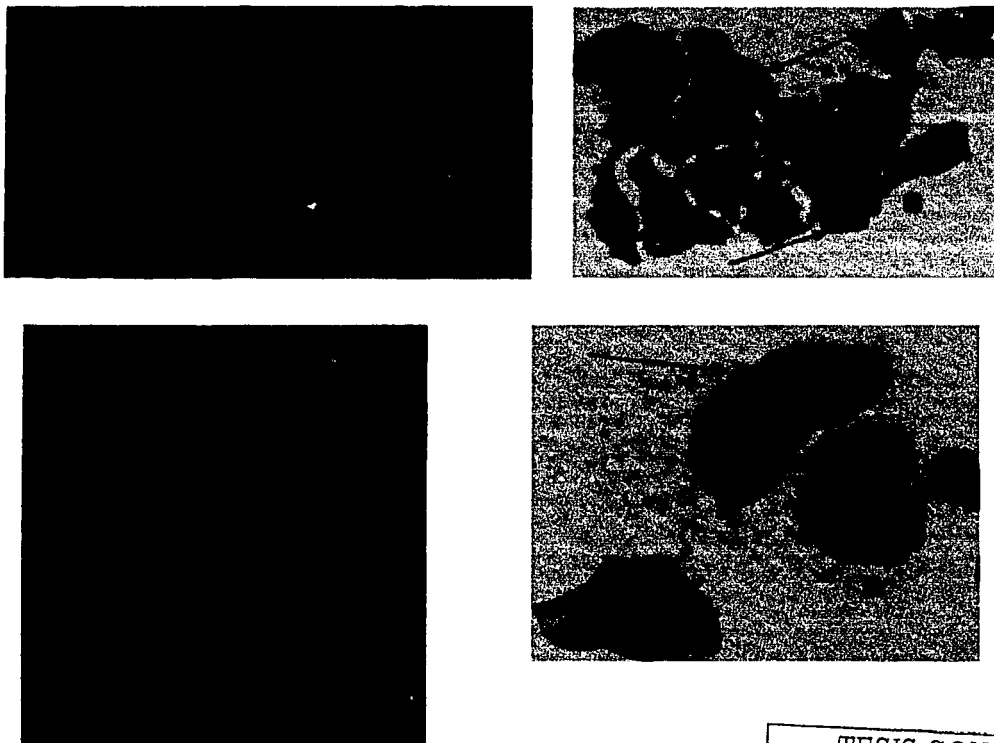
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 25. Adherencia en Células HeLa.

En el panel A, las células se encuentran sin infectar. El B, a los 5 min se empieza apreciar adherencia, las bacterias se localizan alrededor de las células epiteliales. En C, a los 15 min el patrón de adherencia difusa es más evidente, las bacterias no presentan agrupaciones específicas. En D, la cantidad de bacterias adheridas es mayor, las células empiezan a sufrir daño y en E, se pueden apreciar menos bacterias adheridas, algunas dan la impresión de formar agrupaciones(círculo rojo) y la célula empieza a formar vacuolas.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 26. Adherencia en células Hep-2.

En el panel A se muestran células sin infectar. En el B a los 15 min. el patrón de adherencia es difusa, las bacterias se localizan alrededor de la célula. En C, a los 20 min de infección las células presentan daño, se ven células redondeadas, algunas con el citoesqueleto laxo, sin embargo aún existen bacterias adheridas y en D a los 30 min las bacterias que se encuentran adheridas son menos, sin embargo, las células muestran un daño evidente con la formación de vacuolas, y otras su muerte celular.

La adhesión tanto en células HeLa como en Hep-2 se vió desde los primeros 5 minutos de infección, seguido de una invasión, ya que se pudieron recuperar colonias bacterianas después de este tiempo. Conforme avanzaba el tiempo, la adherencia era más notoria, y el número de colonias recuperadas fue mayor.

Se obtuvieron porcentajes de invasión de las diferentes cepas, cada una mostró un patrón distinto de invasión, dependiendo de la línea celular utilizada, ver (FIGURAS 27 y 28).

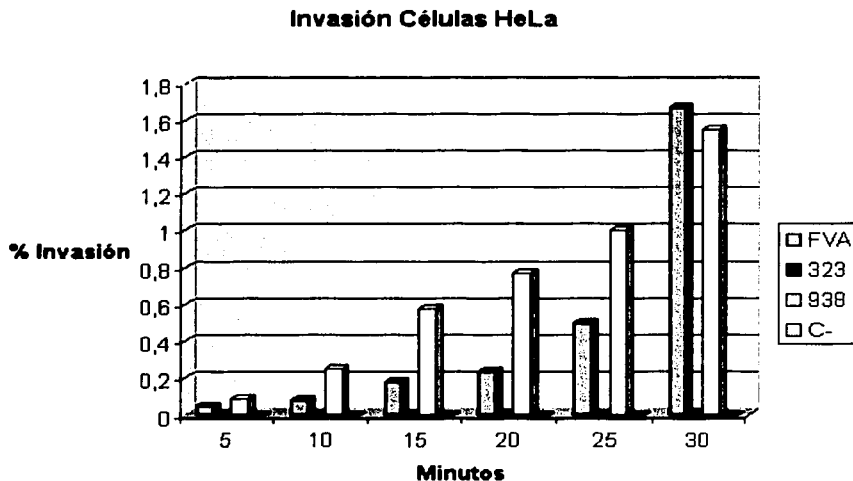


Figura 27. Porcentaje de invasión en células HeLa desde los 5 minutos de infección, hasta 30 minutos con una MOI 100:1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

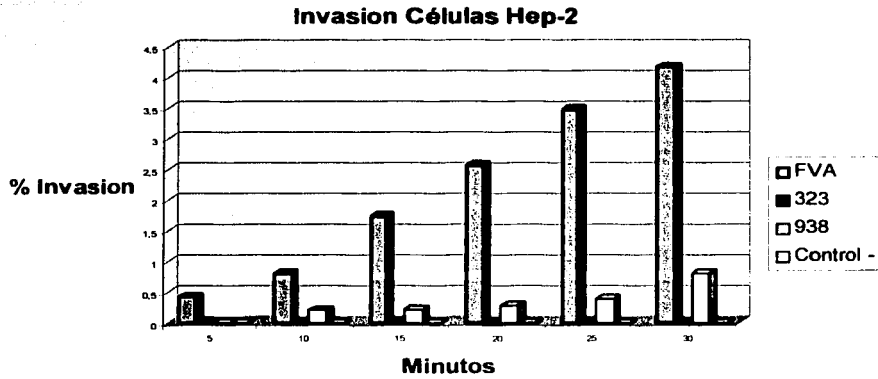


Figura 28. Porcentaje de invasión en células Hep-2 desde los 5 minutos de infección, hasta 30 minutos con una MOI 100:1.

Discusión

Una parte fundamental en la sobrevivencia de diversas especies bacterianas es la capacidad para adherirse a diferentes superficies y sustratos. En el presente trabajo se estudió la capacidad de adhesión de *S. gallinarum*, en ensayos *in vitro*, también se logró identificar y obtener una secuencia parcial del operón *lpf* descrito previamente en *S. typhimurium*, pero no en *S. gallinarum*.

La secuencia de *lpfA*, una de las subunidades más importantes en la formación del pili *lpf* de *S. gallinarum* fue obtenida a partir de la cepa FVA-1. Al realizar la comparación de esta secuencia en el banco de genes los resultados mostraron una identidad nucleotídica del 95% con la secuencia descrita en *S. typhimurium* para este gene. El alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos mostró que sólo hay dos cambios de aminoácidos, uno en la posición 19, donde en vez de encontrarse serina se encontró fenilalanina, y otro en la posición 139 donde se encontró serina en vez de encontrarse glicina. Cuando estos cambios fueron observados, se consideró que podrían afectar el plegamiento de la proteína, por lo cual se realizó una predicción de estructura secundaria. Los resultados obtenidos con esta predicción mostraron algo que la secuencia no pudo mostrar. La estructura secundaria obtenida y comparada en un banco de proteínas mostró una homología del 70% con la proteína PapK de *E. coli*. De esta forma el modelo de plegamiento encontrado, nos permitió ver, que a pesar de que el cambio de fenilalanina es drástico, ya que la serina es un aminoácido con una hidrofobicidad de -0.55 y la fenilalanina un aminoácido con una hidrofobicidad de 1.92, este cambio no afecta el plegamiento de la proteína, pues no cae dentro de los dominios de hojas beta plegadas que determinan la forma y función de esta proteína. En lo que se refiere al segundo cambio este si cae dentro de una de las hojas, sin

embargo el cambio no es radical, considerando que la serina tiene una hidrofobicidad de -0.55 y la glicina de -0.67 , por lo tanto la conformación beta se conserva.

En lo que se refiere a la posible similitud en la función, que pudieran tener PapK y LpfA, se debe considerar que a pesar de que PapK en sólo una subunidad menor que forma parte de la fibrilla del pili P, tiene la conformación necesaria para que la chaperona pueda reconocerla y transportarla a la membrana, esto es una conformación similar a la de las inmunoglobulinas. Al analizar nuestra secuencia observamos que la proteína LpfA tiene la misma conformación de inmunoglobulinas, necesaria para el sistema de chaperona acomodador y por tanto, aunque se trate de la unidad mayor que forma el cuerpo del pili y no la de fibrilla, la homología obedece al hecho de que ambas son ensambladas o pertenecen al sistema chaperona acomodador.

Como se aprecia en RESULTADOS, la secuencia presenta once hojas beta de tamaños diferentes. De estas once hojas, ocho participan en la formación del dominio clásico de Ig, que sirve como sitio de reconocimiento de la chaperona. De igual forma, es posible localizar dos cisteínas, las cuales ayudan al plegamiento global de proteína al formar un puente disulfuro. Finalmente, el extremo carboxilo terminal de esta proteína presenta residuos hidrofóbicos alternados, descritos en el sistema chaperona acomodador, los cuales son necesarios para el reconocimiento de la chaperona. Con esta evidencia podemos afirmar que LpfA presenta una alta homología con las proteínas del operón *pap*, lo cual nos hace sugerir que esta fimbria es ensamblada con un sistema de chaperona acomodador. Este dato no había sido reportado para *S. gallinarum*, lo que constituye un avance importante en la comprensión de como esta bacteria ensambla sus fimbrias.

Lo anterior permitirá comprender mejor los fenómenos de adhesión en esta bacteria, pero sobre todo permitirá el diseño de estrategias novedosas en el control de la enfermedad, por ejemplo, empleando estas fimbrias como antígenos protectores contra *S. gallinarum* y otras especies del género, que aunque no tienen importancia como enfermedad infecciosa en las aves, representan un problema grave de salud pública.

En lo referente a la predicción de LpFE, un dato importante a resaltar es la similitud con una proteína lectina que se une a manosas, lo cual coincide con el hecho de que LpFE es la adhesina en esta fimbria y que el fenotipo de aglutinación de la cepa FVA-1 mostró ser dependiente de manosas. Además de esta homología con proteínas lectinas, esta proteína mostró también el plegamiento clásico similar a Ig, necesario para su reconocimiento y ensamblaje por parte del sistema de chaperona acomodador, lo cual coincide con la suposición anterior sobre el tipo de ensamblaje que esta fimbria tiene.

El análisis de las otras secuencias no pudo llevarse a cabo debido al hecho de que para algunas no se logró obtener la secuencia completa, debido al tamaño de los fragmentos, nuevos iniciadores son necesarios los cuales se tendrán que diseñarse a partir de las secuencias obtenidas. No obstante cada uno de los segmentos se tienen clonados lo que permitirá la reconstrucción del operón más rápidamente.

Dado que los iniciadores empleados abarcan regiones adyacentes al gen amplificado, se pudo establecer que el orden de los genes en *S. gallinarum* es el mismo que el encontrado en *S. typhimurium*, es decir *lpfA*, *lpfB*, *lpfC*, *lpfD* y *lpfE*.

En los ensayos de hemoaglutinación llevados a cabo con las cepas empleadas en este estudio se pudo observar que *S. typhimurium* y una de las cepas de *S. gallinarum* (FVB-323) aglutinaron glóbulos rojos de cobayo, mientras que *S. gallinarum* FVA-1 y *S. typhi*, no lo hicieron. Este hecho nos hace pensar que la regulación de esta fimbria podría encontrarse en variación de fase como lo descrito en *E. coli*, ya que *S. gallinarum* cepa FVA-1 cuenta también con Lpf, pero no con la capacidad de aglutinar glóbulos rojos de cobayo, a pesar de que en ambas cepas se logró la amplificación de genes del operón *lpf*. Lo anterior destaca que la expresión de esta fimbria es un evento regulado en *Salmonella*, por factores aun desconocidos.

Contrario a lo anterior, en los ensayos *in vitro*, se pudo observar que tanto *S. gallinarum* como *S. typhimurium* fueron capaces de adherirse a las dos líneas celulares utilizadas pero lo importante a destacar es que el porcentaje de invasión varió, dependiendo de la línea celular utilizada, siendo que *S. gallinarum* cepa FVA-1 fue más invasiva en células Hep-2 y *S. typhimurium* presentó mayor invasividad en células HeLa; estos resultados sugieren la presencia de diferentes receptores a nivel de la célula huésped.

En los ensayos de adherencia pudimos observar que *S. gallinarum* es capaz de adherirse desde los primeros 5 min de infección, y lo más sorprendente es que en este mismo lapso, *Salmonella* ya esta invadiendo. Se sugiere realizar ensayos en tiempos aún mas cortos.

El patrón de adherencia de *Salmonella* fue difuso, aunque en algunos casos se pudo apreciar la formación de agregaciones (adherencia localizada), las cuales iban acompañadas de la formación de vacuolas en el interior de la célula huésped.

En un mismo campo visual se encontraron diferentes estadios celulares. Se encontraban células aparentemente sanas, únicamente con bacterias adheridas a la periferia de la membrana, células con cambios en su conformación, células laxas y con desprendimiento de la membrana y células muertas. Todos estos cambios se pueden deber a factores físico-químicos de las células, pero la participación de *Salmonella* en la infección es muy importante y cabe resaltar que estos cambios observados en la célula son debidos en gran parte a la interacción de *Salmonella* con la célula epitelial. Es importante recordar que una vez que *Salmonella* se adhiere a la célula huésped, empieza toda una cascada de señalización que conlleva, desde la movilización de actina, la formación de "ruffling", rearrreglo en el citoesqueleto, hasta recuperar por completo la morfología de la célula. Por tanto, ésta podría ser una explicación de los cambios observados.

Para poder ilustrar y entender por completo el papel de las fimbrias en la adherencia, es necesario caracterizar y estudiar a fondo cada una de ellas en un modelo adecuado y así poder determinar estrategias adecuadas de colonización.

Sin embargo, para determinar el papel que juega el operón *lpf* en la adhesión de *S. gallinarum*, es necesario hacer otro tipo de experimentos. En trabajos futuros está la elaboración de una mutante en el gene *lpfA* y su evaluación en modelos *in vitro* como *in vivo*.

TFCIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES.

- 1.- Se identificaron los cinco genes (*lpfA*, *lpfB*, *lpfC*, *lpfD* y *lpfE*) que componen la región del operón *lpf* en *Salmonella gallinarum*.
- 2.- *Salmonella gallinarum* presenta una alta identidad tanto en el orden de los genes como en la predicción de aminoácidos del operón *lpf* de *Salmonella typhimurium* y de *Escherichia coli*.
- 3.- El gene *lpfA* presenta una alta homología con proteínas del operón *pap* (*papK*), lo cual nos hace sugerir que esta fimbria es ensamblada como un sistema de chaperona acomodador.
- 4.- Con base en los ensayos de adherencia, se puede sugerir que la adherencia es un requisito necesario para que se lleve a cabo la invasión en *S. gallinarum* cepa FVA-1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Literatura Citada.

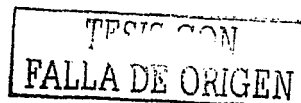
1. Ofek I, Doyle RJ. Bacterial adhesión to cells and tissues, Chapman and Hall, New York, 1994.
2. Hultgren SJ, Jones CH, Normark S. Bacterial adhesion and their assembly. In: Neidhardt FC, *et al*, editors. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. USA: Academic Press, 1996: 2730-2756.
3. Groisman E., Ochman H. The path to *Salmonella*. ASM News 2000;66:21-27.
4. Edwards R, Puente JL. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. Trends Microbiol 1998;6:282-287.
5. Finlay BB, Falkow S. Virulence factors associated with *Salmonella* species. Microbiol Sci 1988;11:324-328.
6. Jones CH, Jacob FD, Dodson MK, Kuehn ML, Slonim L, Stricker R, *et al*. J. Adhesin presentation in bacterial requires molecular chaperones and ushers. Infec Immun 1992;60:4445-4451.
7. Gyles LC, Thoen OC. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 2nd ed. USA: Iowa State University Press/AMES, 1993.
8. Ohi ME, Miller SI. *Samonella*: A model of bacterial pathogenesis. Annu Rev Med 2001;52:259-274.
9. Klemm P, Schembri AM. Bacterial adhesins: Fuction and Structure. Int J Med Microbiol 2000;290:27-35.
10. Thorns CJ, Woodward MJ. Fimbriae of *Salmonella*. In: Wray C, editor. *Salmonella* in domestic animals. USA: CABI Publishing, 2000:35-55.
11. Razatos A., Yea-Ling O., Sharma MM, Georgiou G. Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy. Proc Natl Acad Sci 1998; 95:11059-11064.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

12. Donnenberg MS, Nataro JP. Methods for adhesion of diarrheagenic *Escherichia coli*. In: Doyle RJ, Ofek, editors. *Methods in Enzymology. Adhesion of microbial pathogens*. USA: Academic Press, 1995:324-336.
13. Hultgren SJ, Jones CH, Normark S. Bacterial adhesion and their assembly. In: Neidhardt FC, *et al*, editors. *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. USA: Academic Press, 1996:2730-2756.
14. Low D, Braten B, Woude M. Fimbriae. In: Neidhardt FC, *et al*, editors. *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. USA: Academic Press, 1996:146-157.
15. Soto EG, Hultgren JS. Bacterial adhesins: Common themes and variations in architecture and assembly. *J Bacteriol* 1999;181:1059-1071.
16. Mobley HL. Virulence of the two primary uropathogens. *ASM News* 2000;66:403-409.
17. Mobley HL, Jarvis KG, Elwood JP, Whittle DI, Lockett CV, Russell RG, *et al*. Isogenic P fimbrial deletion mutants of pyelonephritogenic *E. coli*: the role of α gal(1-4) β gal binding in virulence of a wild-type strain. *Mol Microbiol*. 1993;10:143-155.
18. Sauer FG, Matthew AM, Schilling JD, Martínez JJ, Hultgren JS. Bacterial pili: Molecular mechanism of pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 2000;3:65-72.
19. Barnhart MM, Jerone SP, Soto GE, Sauer FG, Langermann S, Waksman CF, *et al*. PapD-like chaperone provide the missing information for folding of pilin proteins. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:7709-7714.
20. Hung D, Pinkner JS, Knigh SD, Hultgren JS. Structural basis of chaperone self-capping in P pilus biogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:8178-8183.
21. Bullitt E, Makowski L. Structural polymorphism of bacterial adhesion Pili. *Nature* 1995;373:164-167.

22. Girardeau JP, Bertin Y. Pillins of fimbrial adhesins of different member species of Enterobacteriaceae are structurally similar to the C-terminal half of adhesin proteins. FEBS Lett 1995;357:103-108.
23. Jones CH, Pinkner JS, Nicholes AV, Slonim LN, Sonam AA, Hultgren JS. Fim C is a periplasmic PapD-like chaperone that directs assembly of type 1 pili in bacteria. Proc Natl Acad Sci 1993;90:8397-8401.
24. Bieber D, Ramer SW, Cheng YW, Murray WJ, Tobe T, Rosemary F, et al. Type IV pill, transient bacterial aggregates and virulence of Enteropathogenic *E. coli*. Science 1998;280:2114-2118.
25. Merz AJ, So M, Sheetz P. Pilus retraction powers bacterial twitching motility. Nature 2000;407:98-102.
26. Wall D, Kaiser D. Type IV pili and cell motility. Mol. Microbiol 1999;32:1-10.
27. Sonnenberg M., Zhong ZH, Stone KD. Biogenesis of the bundle forming pilus of Enteropathogenic *E. coli*. Gene 1997;192:33-38.
28. Wilson JW, Schurr MJ, LeBlanc CL, Ramamurthy R, Buchanan KL, Nickerson CA. Mechanisms of bacterial pathogenicity. Postgrad Med J 2002;78:216-224.
29. Sakellaris H, Scott JR. New tools in an old trade: CS1 pilus morphogenesis. Mol Microbiol 1998;30:681-687.
30. Keen N, Staskawicz B, Mekalanos J, Ausubel F, Cook RJ. Pathogens and hosts: The dance is the same, the couples are different. Proc Natl Acad Sci 2000;97:8752-8753.
31. Sonnenberg MS. Pathogenic strategies of enteric bacteria. Nature 2000;406:768-774.
32. Sonnenberg MS, Kaper JB. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. Infect Immun 1991;59:4310-4317.

33. Finlay B, Ruschkowski S, Kenny B, Stein M, Reinscheid D, Stein M, Rosenshine I. Enteropathogenic *E. coli* exploitation of host epithelial cells. *Ann New York Acad Sci* 1996;797:26-31.
34. Soman NA, Jonsson A, Normark S. Fimbriae-mediated host-pathogen cross-talk. *Curr Opin Microbiol* 1998;1:75-81.
35. Hedlund M, Duan R, Nilsson A, Svensson M, Karpman D, Svanborg C. Fimbriae, transmembrane signaling, and cell activation. *J Infect Dis* 2001;183:S47-50.
36. Schembri MA, Klemm P. Coordinate gene regulation by fimbriae-induced signal transduction. *EMBO J* 2001;20:3074-3081.
37. Svanborg C., Hedlund M., Connel H., Agace W., Duan R. D., Nilsson A, *et al.* Bacterial adherence and mucosal cytokine responses. Receptors and transmembrane signaling. *Ann New York Acad Sci* 1996;797:177-190.
38. Rizo QN,. Como está integrada la avicultura nacional. Memorias del VII curso sobre Control y Erradicación de la Tifoidea Aviar; 1987 agosto 2-12; Monterrey (Nuevo León) México. México (DF): Comisión permanente para el control y erradicación de la Pulorosis y Tifoidea Aviar,1987.
39. Unión Nacional de Avicultores . Compendio de indicadores económicos del sector avícola. México (DF):UNA,1999.
40. Principal Impacto del Departamento de Producción Animal: Aves en el Ámbito Social información en línea 2003 disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/departamentos/aves.htm>
41. Mosqueda TA. Análisis y perspectivas de la patología aviar en México. Memorias de VII Ciclo Internacional de Conferencias sobre Avicultura; 1984 7-20; México (DF). México Colegio de Postgraduados. Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas e Instituto Nacional en Ciencias Avícolas, 1984.
42. Calnek BW. Enfermedades de las Aves. 2da ed. México: Manual Moderno,1995.


 TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

43. Humphries AD, Townsend SM, Kingsley RA, Nicholson TL, Tsolis RM, Bäumlér AJ. Role of fimbriae as antigens and intestinal colonization factors of *Salmonella* serovars. FEMS Microbiol Lett 2001;201:121-125.
44. Shivaprasad HL. Fowl typhoid and pullorum disease. Rev Sci Tech Off Int Epiz 2000; 19:405-424.
45. Barrow PA. The paratyphoid salmonellae. Rev Sci Tech Off Int Epiz 2000;19:351-375.
46. Barrow PA, Huggins MB, 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.
47. Henderson SC, Bounous DI, Lee MD. Early events in the pathogenesis of avian salmonellosis. Infect Immun 1999;67:3580-3586.
48. Mdegela RH, Msoffe PL, Waihenya RW, Kasanga JC, Mtambo MM, Olsen JE. Comparative pathogenesis of experimental infections with *Salmonella gallinarum* in local and commercial chickens. Trop Anim Health Prod 2002;34:195-204.
49. Zhang-Barber L, Turner AK, Barrow PA. Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. Vaccine 1999;17:2538-2545.
50. Hirsh D, ZeeY. Veterinary Microbiology. 1st ed. USA: Blackwell Science,1999.
51. Tartera C, 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.
52. Finlay BB, Leung KY, Rosenshine I, Garcia del Portillo F. *Salmonella* interactions with the epithelial cell. ASM News 1992;58:486-489.
53. Bäumlér AJ, Tsolis RM, Ficht TA, Adams GL. Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. Infect Immun 1998;66:4579-4587.

54. VanCott JL, Chatfield SN, Roberts M, Hone DM, Hohmann EL, Pascual DW, *et al.* Regulation of host immune responses by modification of *Salmonella* virulence genes. *Nature Med* 1998;4:1247-1251.
55. Gulig PA. Pathogenesis of systematic disease. In: Neidhardt FC, *et al* editors. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. USA: Academic Press, 1996:2774-2787.
56. Poppe C, *Salmonella* infections in domestic fowl. In: Wray C editor. *Salmonella* in domestic animals. USA: CABI Publishing, 2000:107-132.
57. Barrow PA, Simpson JM, Lovell MA, Binns MM. Contribution of *Salmonella gallinarum* large plasmid toward virulence in fowl typhoid. *Infect Immun* 1987;55:388-392.
58. Edwards RA, Olsen GJ, Maloy SR. Comparative genomics of closely related salmonellae. *Trends Microbiol* 2002;10:94-98.
59. Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect* 2000;2:145-156.
60. Bäumler AJ. The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. *Trends Microbiol* 1997;5:318-322.
61. Groisman EA, Ochman H. How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol* 1997;5:343-349.
62. Groisman EA, Ochman H. How to become a pathogen. *Trends Microbiol* 1994; 2:289-294.
63. Darwin HK, Miller VL. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:405-428.
64. Ginocchio C, Pace J, 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* 1992;89:5976-5980.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

65. Koster M, Bitter W, Tommassen J. Protein secretion mechanism in Gram-negative bacteria. *Int J Med Microbiol* 2000;290:325-331.
66. Weinstein DL, O'Neil BL, Hone DM, Metcalf ES. Differential early interaction between *Salmonella enterica* serovar *typhi* and two other pathogenic *Salmonella* serovars with intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 1998;66:2310-2318.
67. Galán JE, Sansonetti PJ. Molecular and cellular bases of *Salmonella* and *Shigella* interactions with host cells. In: Neidhardt FC, *et al* editors. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. USA: Academic Press, 1996:2757-2773.
68. Hueck C. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:379-433.
69. Galán J, Bliska J. Cross-Talk between bacterial pathogens and their host cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12:219-253.
70. Yang SH. Type III protein secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 1998;36:363-92.
71. Kurobi T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Tejero M, Sukhan A, *et al*. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* Type III protein secretion system. *Science* 1998;280:602-605.
72. Van Gijsegem F, Genin S, Boucher C. Conservation of secretion pathways for pathogenicity determinants of plant and animal bacteria. *Trends Microbiol* 1993; 1:175-179.
73. Yang S. Hrp-controlled interkingdom protein transport: learning from flagellar assembly? *Trends Microbiol* 1997;5:489-495.
74. Galán J, Colmer A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 1999;284:1322-1328.
75. Uchiya K, Barbieri M, Funato K, Shah A, Stahl A, Groisman E. A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. *EMBO J* 1999;18:3924-3933.

TRIP CON
FALLA DE ORIGEN

76. Zhuo D, Mooseker M, Galán J. Role of *Salmonella typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science* 1999;283:2092-2095.
77. Galán J, Zhuo D. Striking a balance: Modulation of the actin cytoskeleton by *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:8754-8761.
78. Donnenberg M. *Salmonella* strikes a balance. *Nature* 1999;401:218-219.
79. Fu Y, Galán J. The *Salmonella typhimurium* tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton. *Mol Microbiol* 1998;27:359-368.
80. Jones B, Paterson H, Hall P, Falkow S. *Salmonella typhimurium* induces membrane ruffling by growth factor-receptor-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:10390-10394.
81. Hardt W, Chen L, Schuebel K, Bustelo X, Galán J. *Salmonella typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses into host cells. *Cell* 1998;93:815-826.
82. Stebbins C, Galán J. Modulation of host signaling by a bacterial mimic: structure of the *Salmonella* effector *sptP* bound to Rac1. *Mol Cell* 2000;6:1449-1460.
83. Fu Y, Galán J. A *Salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature* 1999;401:293-297.
84. Chen L, Hobbie S, Galán J. Requirement of Cdc42 for *Salmonella*-induced cytoskeletal and nuclear responses. *Science* 1996;274:2115-2118.
85. Pace J, Hayman M, Galán J. Signal transduction and invasion of epithelial cells by *Salmonella typhimurium*. *Cell* 1993;72:505-514.
86. Norris FA, Wilson M, Wallis T, Galyov E, Majerus P. Sop B, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:14057-14059.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

87. Finlay BB, Falkow S. Micro Review. *Salmonella* as an intracellular parasite. Mol Microbiol 1989;3:1833-1841.
88. Galán J. Salmonella Interactions with host cells: type III secretion at work. Ann Rev Cell Dev Biol 2001;17:53-86.
89. Collazo C, Galán J. 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.
90. Hensel M. *Salmonella* Pathogenicity Island 2. Mol Microbiol 2000;36:1015-1023.
91. Alpuche C, Swanson J, Loomis W, Miller S. *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. Proc Natl Acad Sci 1992;89:10079-10083.
92. Pfeifer C, Marcus S, Steele-Mortimer O, Knodler L, Finlay B. *Salmonella typhimurium* virulence genes are induced upon bacterial invasion into phagocytic and nonphagocytic cells. Infect Immun 1999;67:5690-5698.
93. Hersh D, Monack D, Smith M, Ghori N, Falkow S. The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. Proc Natl Acad Sci 1999;96:2396-2401.
94. Lindgren S, Stojilkovic I, Heffron F. Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella typhimurium*. Proc Natl Acad Sci 1996;93:4197-4201.
95. Chopra AK, Huang JH, Xu XJ, Burden K, Niesel DW, Rosenbaum MW, Popov VL, Peterson JW. Role of *Salmonella* enterotoxin in overall virulence of organism. Microb Pathog 1999;27:155-171.
96. Prasad R, Chopra AK, Peterson JW, Pericas R. Biological and immunological characterization of a cloned cholera toxin-like enterotoxin from *Salmonella typhimurium*. Microb Pathog 1990;9:315-29.

TECNO
FALLA DE ORIGEN

97. Prasad R, Chopra AK, Charry P, Peterson JW. Expression and characterization of the cloned *Salmonella typhimurium* enterotoxin. *Microb Pathog* 1992;113:109-121.
98. AshKenazi S, Cleary TG, Murray BE, Wanger A, Pickering LK. Quantitative analysis and partial characterization of cytotoxin production by *Salmonella* strains. *Infect Immun* 1988;56:3089-94.
99. Reitmeyer JC, Peterson JW, Wilson KJ. *Salmonella* cytotoxin: A component of the bacterial outer membrane. *Microb Pathog* 1986;1:503-10.
100. Bäumlér A, Gilde A, Tsolis R, Velden A, Ahmer B, Heffron F. Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operons during evolution of *Salmonella* serotypes. *J Bacteriol* 1997;179:317-322.
101. Townsend SM, Kramer NE, Edwards R, Baker S, Hamlin SM, Simmonds M, Stevens K, Maloy S, Parkhill J, Dougan G, Bäumlér A. *Salmonella enterica* serovar *typhi* possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. *Infect Immun* 2001;69:2894-2901.
102. Edwards RA, Dieter SM, Stanley MR. A role for *Salmonella* fimbriae in intraperitoneal infections. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:1258-1262.
103. Kusters J, Mulders-Kremers G, Doornik C, Zeijst B. Effects of multiplicity of infection, bacterial protein synthesis, and growth phase on adhesion to and invasion. *Infect Immun* 1993;61:5013-5020.
104. Bäumlér A, Heffron F. Identification and Sequence Analysis of *lpf A,B,C,D,E* a putative fimbrial operon of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 1995;177:2087-2097.
105. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
106. NCCLS. *Métodos de dilución para el estudio de susceptibilidad antimicrobiana para bacterias de crecimiento aeróbico-Cuarta edición*. México (DF):NCCLS, 1997.

TRFIS CON
FALLA DE ORIGEN

107. Elsinghorst E A ; Measurement of invasion by gentamicin resistance. In: Clark V, Bavoil PM, editors. Bacterial Pathogenesis. New York: Academic Press, 1997: 667-681.
108. Torres AG, Giron JA, Perna NT, Burland V, Blattner FR, Avellino-Flores F, Kaper JB. Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun 2002;70: 5416-5427.
109. Balcázar QJ. Determinación de la existencia de un gen para una enterotoxina LT-like en *Salmonella gallinarum*. (Tesis de Licenciatura). México (DF) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1993.
110. Vázquez NJ. Clonación y caracterización de los genes que expresan una enterotoxina similar a LT en *Salmonella gallinarum*. (Tesis de Doctorado). México (DF) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2003.
111. Cowan and Steel's. Manual of identification of Medical Bacteria. Barrow GI and Feltham RA editors. 3th ed. London:Cambridge University Press,1995.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN