



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Elementos genéticos de *Salmonella* Typhi involucrados en la resistencia a la sal biliar deoxicolato de sodio

TESIS

Que para obtener el título de

Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

Presenta

Isaac Beirut Olivar Casique

Tutor principal de tesis:

Dr. Ismael Hernández Lucas

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2020



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por llevar a cabo la importante labor humanística de brindar formación académica de prestigio de forma gratuita a miles de personas que de otra forma no la habrían podido adquirir.

Al Dr. Ismael Hernández Lucas, porque a pesar de mis innumerables errores y deficiencias ha tenido mucha paciencia y no se ha rendido conmigo en lo que ha sido mi primer incursión en el ámbito de la investigación. Muchas gracias por creer en mí y ser un gran mentor académico y personal.

A Lili, Esteban, Dinora, Sara y Selena. Gracias por estar siempre dispuestos a prestar su ayuda y sus consejos. A ustedes les debo el relativo éxito con el que se llevaron a cabo estos experimentos, y todo lo que hasta ahora sé sobre trabajar en el laboratorio de microbiología molecular. Estoy con la mejor compañía.

A Elizabeth, a quien debo las mejores experiencias que he tenido en la vida. Gracias por haberme acompañado desde el bachillerato y a lo largo de la licenciatura. Nunca te olvidaré ni dejaré de estar agradecido contigo. Te deseo éxito y felicidad siempre.

A mis padres, que con infinito amor y esfuerzo me han dado la mejor crianza que pudieron y que pudiera yo pedir. Nada de lo que han hecho por mí ha pasado desapercibido, ni será en vano.

DEO GRATIAS

ÍNDICE

1. Resumen.....	5
2. Introducción.....	7
2.1 Historia.....	7
2.2 Epidemiología.....	10
2.3 El género <i>Salmonella</i>	11
2.4 Presentación clínica de la fiebre tifoidea	15
2.5 Las sales biliares y su compleja relación con <i>Salmonella</i>	16
3. Antecedentes.....	22
4. Objetivos.....	23
4.1 Objetivo general.....	23
4.2 Objetivos particulares.....	23
5. Material y Métodos.....	24
5.1 Cepas bacterianas.....	24
5.2 Plásmidos.....	27
5.3 Medios de cultivo.....	27
5.4 Experimentos de microarreglos.....	28
5.5 Análisis de extractos de proteínas totales.....	29
5.6 Análisis proteómico de extractos de membrana interna.....	30
5.7 Ensayos de expresión de las fusiones transcripcionales al gen reportero <i>cat</i>	33
5.8 Obtención de cepas mutantes.....	34
5.9 Evaluación del crecimiento de mutantes en LB y LB DOC 5%.....	34
6 Resultados.....	36

6.1 El deoxicolato de sodio induce la expresión de genes con una gran diversidad de funciones.....	36
6.2 <i>Salmonella</i> Typhi experimenta un cambio metabólico ante la presencia de deoxicolato de sodio.....	37
6.3 El deoxicolato de sodio estimula la expresión de decenas de reguladores transcripcionales.....	38
6.4 La envoltura celular responde a la agresión de las sales biliares con una reestructuración de sus niveles.....	41
6.5 El deoxicolato de sodio reprime la expresión de genes capsulares, flagelares, de síntesis de cardiolipina y de fagos.....	45
6.6 La actividad transcripcional de reguladores esenciales para la tolerancia a deoxicolato de sodio no es necesariamente inducida por la presencia de esta sal biliar.....	46
6.7 Perfil proteómico de <i>Salmonella</i> Typhi en deoxicolato de sodio.....	47
6.8 La membrana interna es un sitio activo de rearrreglo proteico en la exposición al deoxicolato de sodio.....	49
6.9 La eliminación de distintos fragmentos del genoma de <i>S. Typhi</i> producen diferentes comportamientos ante el deoxicolato de sodio.....	51
6.10 La delección del fragmento 23 produce una cepa de <i>S. Typhi</i> hiperresistente a deoxicolato de sodio.....	53
7. Discusión.....	54
8. Conclusiones.....	65
9. Perspectivas.....	66
10. Referencias.....	67

1. Resumen

Salmonella Typhi es el agente etiológico de la fiebre tifoidea. Para establecer su infección en el hospedero humano, *S. Typhi* tiene que sobrevivir a la presencia de sales biliares en el tracto digestivo y en la vesícula biliar. Con la finalidad de determinar la respuesta de *S. Typhi* ante las sales biliares, en este trabajo se llevaron a cabo estudios de transcriptoma y análisis proteómicos totales y de extracto de membranas de cultivos de *Salmonella enterica* serovar Typhi suplementados con 5% de deoxicolato de sodio, la sal biliar más abundante en los humanos. Adicionalmente, se evaluó la capacidad de crecimiento de una colección de 40 cepas mutantes en presencia de 5% de deoxicolato de sodio.

Los estudios de transcriptoma y proteómicos revelaron que el deoxicolato de sodio es un estímulo al que *Salmonella* responde con cambios notables de envoltura celular que conciernen cambios en elementos como cápsula, LPS, ECA, peptidoglicano, flagelos y un rearrreglo de proteínas y lípidos de membrana interna; estos cambios en estructura están además acompañados de modificaciones en actividad metabólica y estilo de vida.

La evaluación de las cepas mutantes sugiere que hay alrededor de 800 genes en *S. Typhi* que son potencialmente requeridos para resistir a deoxicolato de sodio y cuya relación con este fenómeno no ha sido establecida aún. Adicionalmente, se identificó una cepa mutante con un fenotipo hiperresistente a deoxicolato de sodio.

Esta evidencia confirma que para sobrevivir a las sales biliares, *S. Typhi* requiere de la participación de una gran cantidad de genes involucrados en todos los aspectos de su estructura y fisiología para conferirle una condición en la que sea física y metabólicamente capaz de contener a los efectos bactericidas de estos agentes.

1. Abstract

Salmonella Typhi is the etiological agent of typhoid fever. To establish an infection in its human host, *S. Typhi* must survive the presence of bile salts in the gut and gallbladder. To determine the genetic elements that this pathogen utilizes to survive under such host stress conditions, transcriptomic and proteomic analyses, along with the assessment of a collection of forty genomic deletions were carried out under the presence of sodium deoxycholate - the most abundant bile salt in humans. Transcriptomic and proteomic studies revealed changing patterns in the expression of genes coding for capsule, LPS, ECA, peptidoglycan, flagella, inner membrane proteins and lipids, and enzymes of central metabolism. The assessment of the genomic deletions and single mutants revealed up to 800 genes that are potentially required for sodium deoxycholate resistance. Furthermore, a strain carrying a deletion that produces a sodium deoxycholate hyper-resistant phenotype was identified in this work.

2. Introducción

2.1 Historia de la fiebre tifoidea

Desde nuestros más remotos orígenes evolutivos, las enfermedades febriles han flagelado a la humanidad; sus malestares han aquejado y diezmando las poblaciones de todos los grupos humanos en casi cualquier rincón del mundo a lo largo de milenios. Los primeros registros de tales enfermedades datan de medio milenio antes de Cristo, en la Antigua Grecia de los tiempos de Hipócrates, donde se comenzó a utilizar el término *typhous* (tifus) para referirse a cuadros febriles continuos acompañados de estupor y delirio (1). El significado mismo de *typhous*—brumoso—hace alusión a la experiencia deliriosa que sufre aquél atribulado por estas dolencias. Este término, sin embargo, fue utilizado de manera amplia y general para referirse a un conjunto de afecciones con presentación sintomatológica similar pero que hoy en día se sabe que son de etiologías diversas. Entre éstas seguramente figuraba la fiebre tifoidea (1). Dada la poca especificidad que implicaba el uso de *typhous*, no es sorprendente que se pueda atribuir a la fiebre tifoidea el protagonismo de acontecimientos relevantes en la civilización helénica, como epidemias – la Plaga de Atenas - o la muerte de personajes notables como Alejandro Magno (2).

El uso del término tifus continuó empleándose a la vieja usanza griega aún transcurridos muchos siglos, estando ya avanzada la Edad Moderna. Las enfermedades febriles seguían siendo misteriosas y mortales, poco se conocía de su etiología, modo de transmisión o de medidas preventivas. La teoría del miasma era dominante en Occidente; consistía en suponer que las personas adquirirían el tifus después de inhalar vapores y olores contaminados que desprenden de materia contaminada, en descomposición y cuerpos enfermos (3).

Como muchas otras enfermedades infecciosas, no fue sino hasta el siglo XIX junto con el florecimiento explosivo de numerosas otras ciencias, que la microbiología y la medicina basadas en el método científico lograron establecer los criterios que diferenciaron clínicamente la fiebre tifoidea de otras entidades con manifestaciones semejantes, y con ella su hasta entonces desconocido agente causal. Estos descubrimientos finalmente desmembraron el concepto de tifus y permitieron estudiar a distintas enfermedades febriles como entidades separadas. En esta vanguardia se encontraba Pierre

Charles Alexandre Louis quien, en los años 30 de ese siglo, examinando tejido linfático logró establecer una de las primeras observaciones sobre la histopatología de la enfermedad, la cual consistió en puntualizar que la fiebre tifoidea estaba caracterizada por lesiones en las placas de Peyer y nódulos linfáticos mesentéricos, mientras que tales lesiones podían estar ausentes en el tifus (4). En los años posteriores, la noción de que la fiebre tifoidea y el tifus eran entidades clínicas distintas fue propagada al resto de Europa y América. Pronto, otra característica de la fiebre tifoidea sería descubierta: William Budd en el Reino Unido comunicó en 1856 que la fiebre tifoidea es transmitida por la vía fecal-oral, y propone como medida preventiva la cloración del agua. El trabajo de Budd es el primer estudio epidemiológico de su tipo sobre la fiebre tifoidea, y sus propuestas de medidas preventivas fueron aplicadas eventualmente, en 1875, casi 20 años después, con resultados satisfactorios.

El culpable de esta enfermedad fue por fin puesto al descubierto en la Alemania imperial cuando en 1880, examinando secciones histológicas, el patólogo Carl J. Eberth observó por primera vez al bacilo tifoideo, presentando evidencia que asienta a la teoría del germen como principal explicación del origen de la fiebre tifoidea. Más pruebas contundentes de que este bacilo generaba la fiebre tifoidea fueron halladas por el médico Georg Theodor August Gaffky, quien logró aislar el bacilo y crecerlo en un cultivo puro. Gaffky lo nombró como *Bacterium typhosum* (5).

Al año siguiente, en el Nuevo Mundo, Theobald Smith aisló de cerdo lo que él llamó *Bacterium cholera-suis*, mientras trabajaba en el grupo de Daniel E. Salmon en la División de Veterinaria de la USDA. Fue en honor a Elmer Salmon que en 1890 el género haya sido nombrado *Salmonella*, y la especie tipo del género fue bautizada como *Salmonella cholera-suis*. No obstante, para cumplir a la totalidad los postulados de Koch y terminar con el trabajo iniciado por Gaffky, tendríamos que regresar a Gran Bretaña, donde el médico Albert Sydney Grünbaum demostró que la infección experimental con inóculo oral del bacilo tifoideo en chimpancés produce leves estados febriles y las características lesiones intestinales en placas de Peyer que son observadas en pacientes humanos (6).

Los esfuerzos y ambiciones de investigadores del siglo XIX resultaron fructíferas también en la innovación del diagnóstico de la fiebre tifoidea. El diagnóstico serológico vio

la luz cuando, en 1896, Georges-Fernand-Isidor Widal descubrió que el suero de pacientes enfermos de fiebre tifoidea aglutinaba *Salmonella* proveniente de cultivos puros. Esta prueba, posteriormente conocida como prueba de Widal, sigue utilizándose para diagnosticar fiebre tifoidea.

Asimismo, el desarrollo de este método serológico hizo posible otro descubrimiento relevante ese mismo año: el suero de dos individuos que presentaban un cuadro clínico de fiebre tifoidea fue sometido a la prueba de aglutinación de *S. Typhi* y el resultado fue negativo. Así entonces fue el descubrimiento de *Bacille paratyphique*, que siendo un serovar distinto a *S. Typhi*, ocasiona signos y síntomas idénticos a la fiebre tifoidea. La enfermedad que produce es conocida como fiebre paratifoidea (7).

El siglo XX comenzó con ajustes taxonómicos- luego de la designación del nombre *Salmonella choleraesuis* en 1900, el bacilo tifoideo recibió una nueva denominación en 1908: *Eberthella typhi*, en honor al trabajo pionero de Eberth. Sin embargo, esta denominación terminó viéndose desfavorecida cuando en 1933 se adoptó el nombre *Salmonella typhi*. A partir de ese entonces el género quedó nombrado definitivamente como *Salmonella*. Mientras tanto, a inicios de siglo, Robert Koch proponía una ruta de transmisión de la fiebre tifoidea limitada exclusivamente a interacciones humano-humano. Además, propuso acertadamente la existencia de un estado de portador asintomático, el cuál convertía a individuos aparentemente sanos en focos de infección para el resto de la población (8).

La elucidación de las vías de transmisión tuvo como consecuencia la implementación de medidas sanitarias preventivas en gran parte de Europa y América, como la cloración de los sistemas de agua potable y la identificación de portadores humanos y su consecuente retiro de la elaboración de alimentos - esfuerzos que consiguieron disminuir considerablemente la morbilidad y mortalidad de esta enfermedad en los países industrializados de la época. No obstante, aún en la actualidad existen países en vías de desarrollo con endemicidad e incidencias de fiebre tifoidea similares a la que tenían los países desarrollados en la primera mitad del siglo pasado (9).

A pesar del gran avance que se ha visto en la comprensión de la fisiología bacteriana, vías de transmisión, patogenia, terapéutica y medidas preventivas de la fiebre

tifoidea, esta enfermedad sigue siendo un azote para muchas poblaciones que viven en zonas endémicas, donde sigue arrebatando la vida a cientos de miles de personas.

2.2 Epidemiología de la fiebre entérica

La fiebre tifoidea, también llamada fiebre entérica, es endémica de áreas con deficiencias sanitarias de todo el mundo subdesarrollado: es un problema de salud pública importante en Asia, África y América Latina. India, Pakistán y Bangladesh presentan hasta el 85% de los casos que ocurren a nivel global (10). La perpetuación de la fiebre tifoidea en muchos de estos países en vías de desarrollo es sustentada por factores socioeconómicos, culturales y medioambientales. El comportamiento de la enfermedad en las zonas endémicas es de tipo estacional, existiendo un incremento en la incidencia durante las estaciones lluviosas; en el subcontinente indio durante el monzón se reportan el 45% de los casos de esa región (10).

La cuenta total de casos anuales de fiebre tifoidea asciende a 21,650,971 casos para el año 2000 (11). La incidencia más alta sucede en el sur y sureste asiáticos y el África subsahariana donde ocurren más de 100 casos por cada 100000 habitantes; en América Latina, el norte de África y Oceanía (a excepción de Australia y Nueva Zelanda) la incidencia es de 10 a 100 casos entre 100000 habitantes. En Europa, Norteamérica, Australia y Nueva Zelanda se reportan menos de 10 casos por cada 100000 habitantes (11).

Una estimación conservadora de la mortalidad de la fiebre tifoidea es del 1%, de acuerdo con esto, en el año 2000 fallecieron 216,651 personas a causa de este padecimiento (11). Sin embargo, la limitante de esta estimación es que hacen falta datos de tasa de fatalidad de estudios de población en zonas de mayor incidencia. Es probable que la tasa de mortalidad media más realista sea del 2% tomando en cuenta resultados de meta análisis hospitalarios conducidos entre 1984 y 2005 en África, Asia y América Latina. A razón de estos datos, la cifra de decesos anuales a consecuencia de la fiebre tifoidea sería de aproximadamente 433,302 personas (12). En la figura 1 se muestra un mapa mundial de riesgo de adquirir fiebre tifoidea.

En México, el último brote relevante de fiebre tifoidea ocurrió en la década de los 70 del siglo pasado, durante el cual se registraron más de 10,000 casos. Sin embargo, la

enfermedad continúa siendo endémica y debido al uso de prácticas diagnósticas inadecuadas como la dependencia casi exclusiva en la prueba de Widal y la escasez de botellas de hemocultivo en los hospitales de sector público, es probable que la enfermedad no esté siendo subreportada.

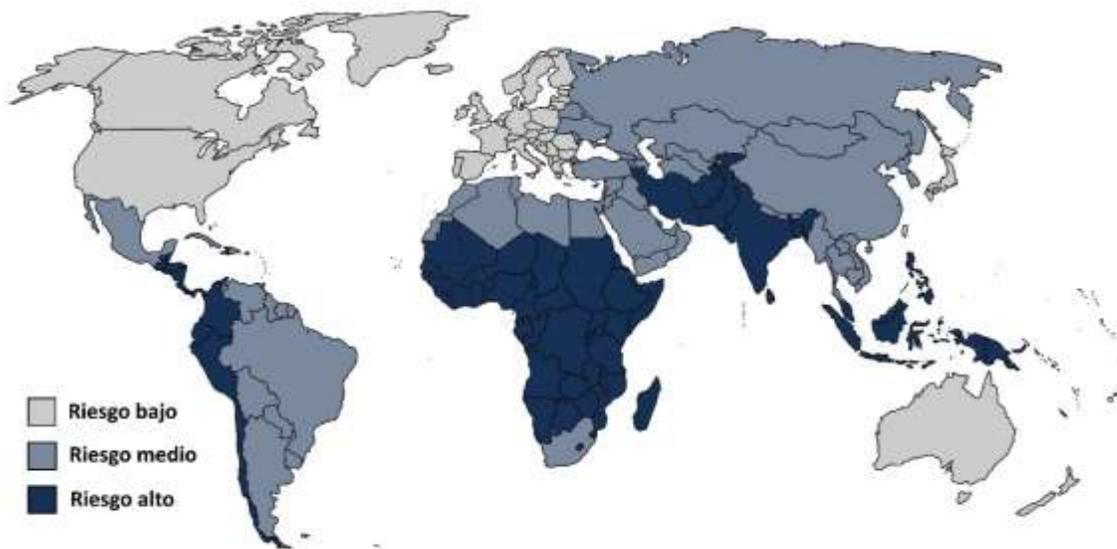


Figura 1. Riesgo mundial de adquirir fiebre tifoidea. Creación propia.

2.3 El género *Salmonella*

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Los géneros que comprende esta familia se encuentran ampliamente dispersos en la naturaleza, hallándose en la tierra, el agua, sobre las plantas y, notablemente, en el tracto digestivo de los vertebrados, incluyendo el de los humanos. Son, en realidad, las bacterias más frecuentemente recuperadas de muestras clínicas. Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son bacilos Gram-negativos no esporulados, fermentadores de glucosa, citocromooxidasa negativos y reductores de nitratos a nitritos(13). Los serovares de *Salmonella* son además motiles, expresando usualmente flagelos peritricos con la excepción de *Salmonella* *Pollorum* y *Salmonella* *Gallinarum*. Son anaerobios facultativos, que crecen en un rango de temperaturas entre 5–45 °C, siendo la temperatura más adecuada para su

desarrollo muy similar a la temperatura fisiológica de hospederos vertebrados (35-37 °C). Al estar adaptadas a sobrevivir al medio externo son capaces de resistir a pH bajo y frecuentemente forman cadenas filamentosas cuando son cultivadas en condiciones adversas de extremos de pH y temperatura (14).

Todas las especies de *Salmonella* son parásitos patógenos intracelulares facultativos, capaces de invadir un número de tipos celulares diferentes que incluyen principalmente macrófagos, células epiteliales y células dendríticas (14). La invasión a estas estirpes celulares está mediada por un conjunto impresionante de factores de virulencia.

Salmonella muestra su gran éxito evolutivo al poder transitar y colonizar el tracto digestivo de hospederos vertebrados e invertebrados muy variados: aves, reptiles, insectos, animales de granja y humanos. Es en algunos de estos hospederos, particularmente mamíferos, donde desarrollan algunos de sus procesos infecciosos mejor descritos y de mayor relevancia para salud humana.

La clasificación taxonómica del género *Salmonella* es la más complicada de todas las enterobacterias, y a lo largo del tiempo se ha favorecido el uso de varios métodos para clasificarlas. Históricamente la nomenclatura del género fue basada en el lugar donde se aisló la cepa por primera vez, por ejemplo, *S. dublin*, *S. london*, *S. miami*, *S. kentucky*, etc (14). Más recientemente, las salmonelas han sido ordenadas basándose en sus patrones antigénicos; somático (O), flagelar (H) y capsular (Vi). De acuerdo con esta clasificación, cada serotipo o serovar de *Salmonella* está definido por una fórmula antigénica que enlista factores O, H1 y H2 (1). Actualmente se reconocen 2,463 serotipos que pertenecen únicamente a dos especies: *Salmonella enterica* con 2,443 serotipos, y *Salmonella bongori*, con 20 (15,16). La especie *Salmonella enterica* está constituida por seis subespecies; *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*, que son representadas por números romanos I, II, IIa, IIb, IV y VI, respectivamente. Anteriormente *S. bongori* era la subespecie V de *Salmonella enterica*, pero ensayos de hibridación demostraron que se trata, en efecto, de una especie distinta (17,18).

Anteriormente, se reportaban tres especies de *Salmonella* para comunicar resultados positivos en la clínica: *S. choleraesuis*, *S. typhi* y *S. enteritidis*. Esta clasificación quedó en

desuso a partir del 1 de julio de 1983 (13). Hoy en día en la práctica clínica cotidiana las cepas desconocidas de muestras clínicas que por pruebas bioquímicas sean indicativas de especies de *Salmonella* son confirmadas serológicamente utilizando antisueros policlonales de anticuerpos específicos dirigidos contra las subespecies principales. La determinación de serotipo es llevada a cabo por laboratorios de salud pública sobre la base de reacciones serológicas contra los determinantes O y H (13).

Los serotipos de *Salmonella* pueden aislarse de distintas muestras clínicas. Apartir demateria fecal se les puede aislar estriando las muestras en placas de agar de baja selectividad como agar MacConkey, agar deoxicolato, agar de sales biliares y agar verde brillante. Estos medios contienen agentes que inhiben el crecimiento de microorganismos Gram-positivos de la microbiota acompañante y contaminantes. Sin embargo, el coprocultivo es casi exclusivamente empleado para aislar serotipos no tifoideosde *Salmonella*, que producen manifestaciones gastrointestinales más pronunciadas que *Salmonella* Typhi. Para el aislamiento de *S. Typhi* de individuos que cursan la enfermedad activamente el cultivo de aspirado de médula ósea es el que ofrece mayor recuperación, seguido de cultivo de contenido duodenal y hemocultivo (19, 20, 21, 22). Una combinación de estos métodosde cultivo resulta en un éxito del 90% para el aislamiento de serovares tifoidales de pacientes enfermos. No obstante, en la práctica suele realizarse únicamente el hemocultivo, que reduce el éxito del aislamiento del 40 al 70% (21, 22, 23).

El aislamiento de especies no tifoidales de *Salmonella* en coprocultivo es favorecido con el uso del medio verde brillante, que contiene altas concentraciones de verde brillante (12.5 g/l) como agente inhibidor de coliformes y Gram-positivos. Sin embargo, un medio más adecuado para recuperar *Salmonella* Typhi es el agar sulfito bismuto, el cual contiene 0.025 g/l de verde brillante como inhibidor y sulfato ferroso (FeSO_4) que es reducido a sulfuro de hidrógeno (H_2S)por proteínas codificadas en los operones *phsABC* y *asrABC*(24, 25). El sulfuro de hidrógeno reacciona con el indicador sulfito de bismuto ($\text{Bi}_2[\text{SO}_3]_3$) en el medio para producir sulfuro de bismuto (Bi_2S_3), un precipitado insoluble que le otorga el color negro característico a las colonias. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que no todas las cepas de serovares tifoidales producen cantidades apreciables de sulfuro de hidrógeno (1).

Una vez en cultivo, *Salmonella* puede identificarse y distinguirse de otras especies de enterobacterias mediante la realización de pruebas bioquímicas. La utilización de lactosa por *Escherichia coli* y especies de *Citrobacter*, por ejemplo, permite distinguirlas de cepas de *Salmonella* y *Shigella*, debido a que estos últimos dos géneros carecen de la capacidad de metabolizar lactosa, a excepción de algunos serotipos de *S. enterica* subespecies *arizonae* y *S. enterica* subespecies *diarizonae*. Asimismo, *Salmonella* es incapaz de fermentar sacarosa mientras que la mayoría de las cepas de *E. coli* y *Citrobacter spp* son perfectamente capaces de hacerlo. Algunos de los serotipos de *Salmonella* y especies de *Citrobacter* pueden reducir el sulfato ferroso (FeSO_4) a sulfuro de hidrógeno (H_2S), esta característica metabólica las distingue de *E. coli* y *Shigella*. Estas propiedades bioquímicas pueden evaluarse en medios como Triple Sugar Iron (TSI), un medio sólido inclinado que contiene 1% de sacarosa, 1% de lactosa, 0.1% de glucosa, sulfato ferroso y rojo de fenol como indicador(13).

Las patrones principales de las manifestaciones de la salmonelosis permiten establecer dos grupos de cepas de *Salmonella*: *Salmonella* tifoidea y no tifoidea (NTF). En infecciones humanas, se han descrito cuatro manifestaciones clínicas: fiebre entérica (fiebre tifoidea), gastroenteritis, bacteremia y otras complicaciones gastrointestinales y estado de portador crónico (14).

Salmonella enterica serovar Typhi es el tipo más invasivo y ocasiona fiebre tifoidea, una enfermedad sistémica en humanos. *S. enterica* serovar Typhimurium y serovar Enteritidis causan gastroenteritis o enterocolitis autolimitante, que está principalmente localizada y limitada al tracto digestivo. En humanos, *S. enterica* serovar Paratyphi genera una enfermedad similar a la fiebre tifoidea (14).

A pesar de que las cepas tifoidales y no tifoidales de *Salmonella* son muy cercanas genéticamente, llegando a compartir hasta el 90% de su genoma (26), producen cuadros patológicos por demás distintos (26). Las cepas no tifoidales de *Salmonella* (principalmente *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*), por ejemplo, generan gastroenteritis – una enfermedad diarrea típica localizada en el íleon terminal, nódulos linfáticos mesentéricos y en ocasiones el colon, mientras que la fiebre tifoidea es una enfermedad sistémica. El periodo de incubación de gastroenteritis es considerablemente más corto que el de la fiebre tifoidea,

requiriéndose tan sólo un día o menos para que se muestre la sintomatología (28). La característica histopatológica de esta gastroenteritis es inflamación local aguda con infiltrados de polimorfonucleares (29), como consecuencia, un examen de leucocitos fecales suele revelar abundantes neutrófilos (30).

La gastroenteritis producida por *Salmonella* NTF es una enfermedad autolimitada en individuos inmunocompetentes y los síntomas normalmente menguan antes de los diez días (28). En individuos inmunocomprometidos, en cambio, la gastroenteritis por *Salmonella* puede complicarse con bacteremia, en cuyo caso se detecta neutrofilia en sangre periférica; en contraste con la bacteremia en fiebre tifoidea donde no solamente no se presenta neutrofilia, sino que el 25% de pacientes transcurren con neutropenia (31, 32). Todo esto es evidencia de que las cepas no tifoideas de *Salmonella* generan una respuesta inmune fuerte y evidente, mientras que las cepas tifoideas son inmunológicamente más discretas (33).

2.4 Presentación clínica de la fiebre tifoidea

La fiebre tifoidea se caracteriza por una invasión bacteriana sistémica en individuos inmunocompetentes. La infección inicia al ingerir alimentos o agua contaminados con materia fecal humana que contiene el agente causal *Salmonella Typhi* (34), la dosis infectiva se estima en alrededor de 10,000 células (35). La diseminación sistémica inicia con la penetración del microorganismo en la mucosa del íleon a través las células M en las placas de Peyer, desde donde es capaz de diseminarse vía linfática y establece una infección no detectable clínicamente acompañada de bacteremia primaria transitoria (36). Como consecuencia de la vía de diseminación, el patógeno es aislado con mucha frecuencia de placas de Peyer, nódulos linfáticos mesentéricos, bazo, hígado, médula ósea, sangre periférica, vesícula biliar y, con menos frecuencia pulmones y riñones. *Salmonella Typhi* es un patógeno discreto que sabe tomar ventaja de la tolerancia inmunológica del tracto digestivo. Su presencia en el lumen intestinal y subsecuente infiltración no produce inflamación detectable en estos sitios. A consecuencia de esta estancia tan silenciosa es que el periodo de incubación de la enfermedad sea de alrededor de dos semanas después de haber ingerido alimentos o agua contaminados con el patógeno (37). Pasado este tiempo, la infección puede o no comenzar a manifestarse con signos y sintomatología inespecíficos como fiebre y bradicardia, escalofríos, mialgia, náusea y anorexia (38). Durante la

enfermedad, es común observar un patrón definido de fiebres, iniciando con fiebre de baja intensidad (37.5 a 38.2 °C) que progresivamente evoluciona en fiebre de alta intensidad (38.2 a 41.5 °C) (39). La sintomatología inespecífica dificulta el diagnóstico diferencial durante la inspección clínica, pero existen una serie de observaciones que suelen delatar la etiología subyacente, como picos en temperatura y puntillero rosáceo en el pecho (40).

La fiebre tifoidea no es considerada una enfermedad diarreica, y este síntoma se presenta en menos de una tercera parte de los pacientes, el resto de los cuales puede incluso experimentar estreñimiento (41). Sin embargo, los infantes suelen presentar diarrea con mayor frecuencia que los pacientes adultos (42). Otros signos menos frecuentes son la esplenomegalia y hepatomegalia, mientras que los síntomas neurológicos, tos, dolor abdominal y jaqueca se observan en aproximadamente la mitad de los individuos (43).

En regiones endémicas hasta el 15% de los pacientes desarrolla complicaciones en los órganos accesorios del tubo digestivo como pancreatitis, hepatitis y colecistitis, las cuales pueden ir acompañadas de ictericia (43). Complicaciones como coagulación intravascular diseminada son más comunes en pacientes pediátricos (1). La transmisión vertical intrauterina de una madre infectada puede ocasionar tifoidea neonatal, una condición rara pero muy peligrosa (1).

La perforación intestinal es una de las complicaciones más graves de la fiebre tifoidea y afecta alrededor del 5% de los pacientes (44). El infiltrado mononuclear en tejido linfóide ileal puede asociarse con depósito de fibrina en capilares, resultando en trombosis capilar y ulceración en zonas de las placas de Peyer que suelen observarse hacia la segunda mitad del cuadro febril. Si estos procesos de ulceración continúan, se puede producir hemorragia y perforación intestinal asociada con peritonitis, la cual ocurre hacia la tercer semana (45). La perforación intestinal en la fiebre entérica es una importante causa de mortalidad tanto para adultos como pacientes pediátricos (46). Tanto las recaídas como las reinfecciones son comunes en la fiebre tifoidea (1).

2.5 Las sales biliares y su compleja relación con *Salmonella*

Los hepatocitos pericentrales del hígado poseen la capacidad metabólica requerida para transformar el colesterol en ácidos biliares y sus sales (47). Como su nombre sugiere,

los ácidos biliares y sus sales son constituyentes de la bilis y, tras su síntesis, son secretados junto con los otros componentes de este fluido a los canalículos biliares. En la bilis, las sales biliares constituyen hasta el 50% de todos los componentes orgánicos en ésta (47). El carácter anfipático de los ácidos biliares es responsable en gran medida de la función principal de la bilis - emulsificar las grasas de la dieta, incrementando la superficie de contacto con enzimas digestivas.

La transformación hepática del colesterol en ácidos biliares es un proceso multienzimático, cuyos pasos incluyen la ruptura oxidativa de la cadena alifática en posición C17, reduciendo el número de carbonos en esta cadena de ocho a cinco, con la introducción de la función ácido carboxílico que a partir de ahora caracteriza a estas entidades químicas (48). Asimismo, se adicionan grupos hidroxilo al esqueleto anillado del colesterol; para dar ácido quenocólico se lleva a cabo una única hidroxilación en C7, mientras que para el ácido cólico se efectúa una hidroxilación doble para el ácido cólico en el C7 y el C12.

Los ácidos biliares se pueden clasificar dentro de cuatro grupos principales: por un lado los ácidos biliares primarios y secundarios y, por el otro, ácidos biliares conjugados y no conjugados. Las sales biliares primarias son los productos inmediatos de la transformación hepática del colesterol y su identidad y abundancia varía de acuerdo a la especie animal de la que se trate. Así por ejemplo, las sales biliares primarias más abundantes en humanos y ratas son el colato y el quenodeoxicolato, mientras que en ratones se habla de colato y muricolato (48). La remoción del grupo hidroxilo en la posición C7 de las sales biliares primarias rinde a las sales biliares secundarias. Esta transformación es llevada a cabo por enzimas bacterianas de la microbiota intestinal (48). En los humanos, los productos principales de esta deshidratación son el deoxicolato y el quenodeoxicolato.

Antes de ser secretados, los ácidos biliares son conjugados por unión peptídica con los aminoácidos glicina (produciendo glicoconjugados) o taurina (dando tauroconjugados) (49). Muy minoritariamente se producen conjugaciones con otros aminoácidos como lisina o leucina, que son hidrolizados rápidamente por carboxipeptidasas pancreáticas (50). Aunque depende de la dieta y otras variables, la proporción de glicoconjugados a tauroconjugados en la bilis humana es generalmente de 3:1 (48). No obstante, una vez en el lumen del colon,

diversos miembros de la microbiota intestinal, entre ellos especies de los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* y *Clostridium* (51, 52, 53), llevan a cabo la deconjugación de las sales biliares conjugadas, reacciones catalizadas por enzimas bacterianas conocidas como hidrolasas de sales biliares (BSH) (49). Como discutimos anteriormente, la deconjugación es un requisito previo para la transformación de sales biliares primarias a secundarias.

La deshidroxilación de las sales biliares primarias, llamada $7\alpha/\beta$ deshidroxilación, las convierte en sales biliares secundarias. La transformación de sales biliares primarias a secundarias requiere el transporte de sales primarias libres (desconjugadas) al interior de la célula bacteriana, tarea que es realizada por el transportador dependiente de protones BaiG (54). Una vez en el citosol bacteriano, la sal biliar es ligada a CoA por una ligasa de CoA dependiente de Mg^{2+} y ATP. El tioéster de sal biliar-CoA es posteriormente oxidado en el grupo 3-hidroxilo por acción de una 3α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (55). Después de esta oxidación, flavoproteínas dependientes de NAD sintetizan 3-dehidro- Δ^4 -quenodeoxicolato o 3-dehidro- Δ^4 -colato y 3-dehidro- Δ^4 -ursocolato, haciendo a la sal biliar químicamente lábil para 7α -deshidratación irreversible (56).

Las interacciones entre las sales biliares y la microbiota intestinal son estrechas, dinámicas y complejas, propias de las relaciones entre elementos de un verdadero ecosistema. Como todo ecosistema, la perturbación del equilibrio en las relaciones de sus elementos resulta comprometedor para la supervivencia de los elementos bióticos y en este caso particular las consecuencias de un desbalance entre la microbiota y las sales biliares podrían verse reflejadas en la salud del hospedero.

Las sales biliares influyen en el tamaño, diversidad y composición de la microbiota intestinal. Alteraciones en la cantidad, tipo y frecuencia de descarga de sales biliares impactan sensiblemente las poblaciones de microbios comensales en este nicho. Por ejemplo, una disminución en la descarga de sales biliares al intestino promueve la proliferación de bacterias Gram-negativas, patógenos entre ellas, mientras que un incremento en la cantidad de sales biliares favorecería la proliferación de organismos Gram-positivos y la reducción de la población de *Bacteroides* Gram-negativos (49). Alteraciones en el tipo y abundancia de sales biliares pueden estar indirectamente

relacionadas con el desarrollo de cáncer colorectal, al favorecer la proliferación de Firmicutes, Proteobacteria y la simultánea disminución de la población de Bacteroidetes (57).

Asimismo, la microbiota ejerce una considerable influencia sobre la identidad y proporción de las sales biliares en el tracto digestivo, ya que como se ha mencionado anteriormente las sales biliares son sustratos para enzimas bacterianas que modifican químicamente estas sales, cambiando las características fisicoquímicas y biológicas de los compuestos originales. Las bacterias intestinales pueden, además, servirse de las sales biliares usándolas como señales e incluso como nutrientes y aceptores de electrones (49).

Quizás la característica más sobresaliente de las sales biliares en su relación con las bacterias intestinales es su acción antimicrobiana, a la que le deben su capacidad de equilibrar y regular la microbiota. Para comprender algunos de los mecanismos inhibitorios de las sales biliares conviene recordar su naturaleza química, ya que al ser derivados del colesterol conservan un gran núcleo esteroidal hidrófobo al que se le han adicionado grupos polares (grupos hidroxilo) e ionizables (función ácido carboxílico y aminoácidos), rindiendo una estructura anfipática que puede interactuar por un lado con entidades químicas hidrofóbicas y por otro con grupos cargados. La anfipatía le confiere a las sales biliares acción detergente, lo que les hace especialmente perjudiciales para la integridad de las membranas biológicas. Altas concentraciones de bilis disuelven los lípidos de membrana causando fuga de contenido citosólico y muerte celular (58). Concentraciones menores tienen efectos perniciosos más sutiles sobre la fluidez y permeabilidad de la membrana, pueden alterar proteínas integrales de membrana, descontrolar el transporte de cationes y alterar la hidrofobicidad de la bicapa (59, 60).

Además de comprometer la integridad de las membranas, las sales biliares inducen inestabilidad y daño al DNA. En *Salmonella enterica*, las sales biliares incrementan la frecuencia de sustituciones nucleotídicas y *frameshifts* (61). La anfipatía de las sales biliares causa también que las proteínas pierdan su conformación nativa y adopten configuraciones en las que no son funcionales, contribuyendo al daño infringido sobre las bacterias (49).

Otra forma interesante en que las sales biliares representan una amenaza para la proliferación bacteriana consiste en la competencia directa entre sales biliares y bacterias por hierro y calcio; los ácidos taurocólico y glicocólico pueden formar complejos con hierro soluble Fe^{2+} (esto facilita la absorción intestinal de hierro). Adicionalmente, las micelas de sales biliares son capaces de quelar iones calcio Ca^{2+} . Puesto que ambos iones son críticos para las funciones celulares, la disminución de la disponibilidad de éstos a consecuencia de la acción quelante de las sales biliares compromete la capacidad de proliferación de las bacterias intestinales (62, 63).

Las sales biliares constituyen un verdadero y efectivo mecanismo de la inmunidad inespecífica del hospedero. Permiten únicamente la proliferación de las especies resistentes a esta presión de selección, que normalmente son aquellas que han evolucionado para estar mejor adaptadas a los tractos digestivos de los vertebrados y que suelen establecer relaciones de comensalismo y simbiosis con sus hospederos. Sin embargo, existen patógenos que han logrado superar esta barrera de selección y han probado ser grandes problemas sanitarios para las poblaciones humanas. Tales microorganismos incluyen *Vibrio cholerae*, patotipos de *E. coli*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Campylobacter* y *Salmonella*. *Salmonella* sobresale de los demás géneros resistentes a las sales biliares por su capacidad para colonizar el tracto hepatobiliar y la vesícula biliar, donde causa infecciones crónicas (64). Velkinburgh y Gunn (65) determinaron que las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) de hiel de buey para células en fase estacionaria de *S. Typhimurium* y *S. Typhi* fueron de 18% y 12%, respectivamente, y que las concentraciones bactericidas mínimas (MBC) fueron >60% para *S. Typhimurium* y 18% para *S. Typhi*.

Estudiar la estrecha interacción que estos microorganismos han establecido con las sales biliares y particularmente los mecanismos que les permiten tolerarlas, podría proporcionar nuevas estrategias terapéuticas para algunas de las infecciones que estas bacterias producen, que hasta el día de hoy son problemas relevantes de salud pública.

En la figura 2 se ilustran las principales formas en las que las sales biliares causan daño a las células bacterianas.

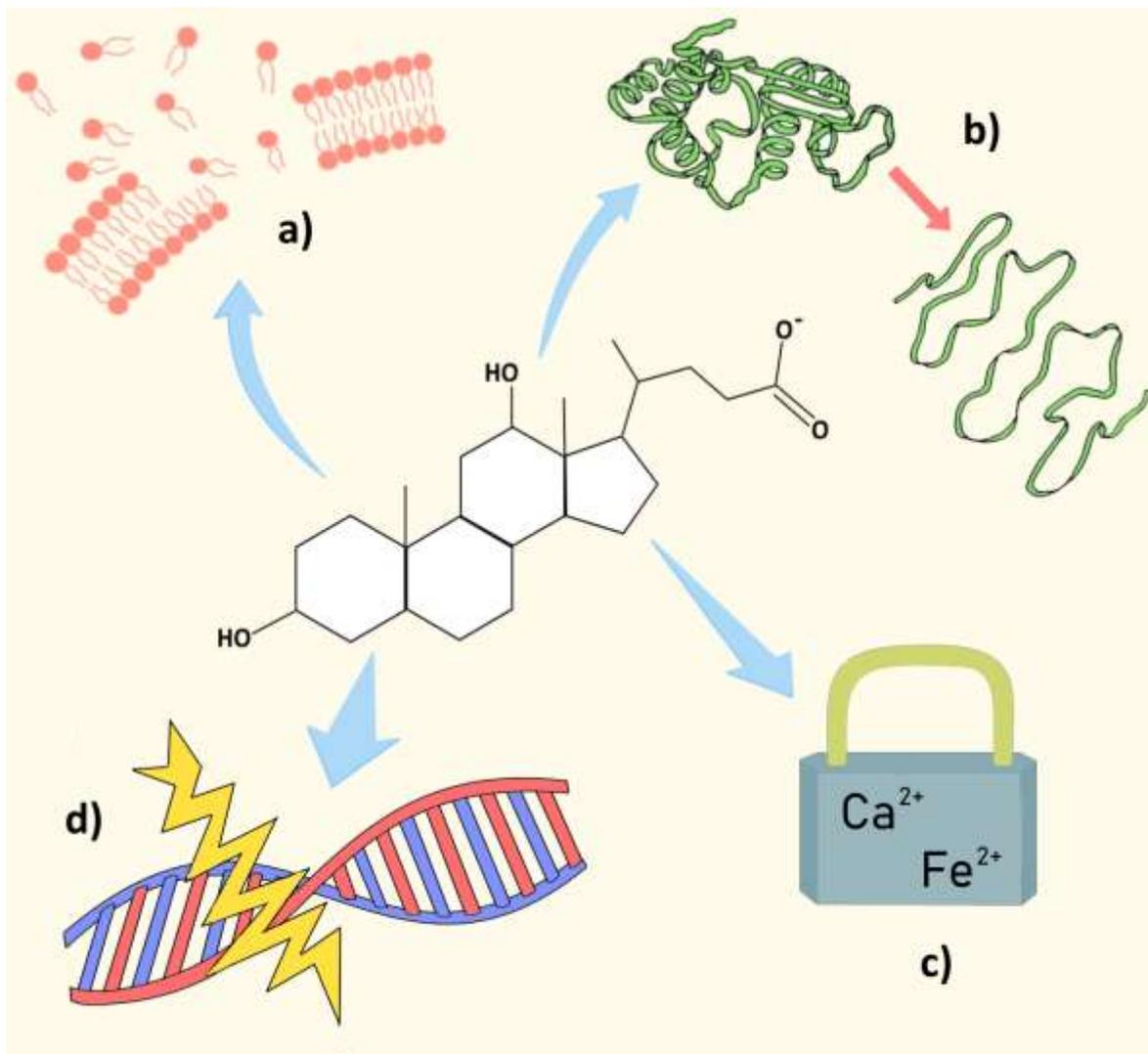


Figura 2. Principales efectos nocivos de las sales biliares para las bacterias. Las sales biliares, representadas en la figura por deoxicolato, son capaces de **a)** solubilizar membranas celulares, ocasionando cambios osmóticos y fuga de contenido intracelular; **b)** alterar la conformación de proteínas a causa de su naturaleza detergente; **c)** las sales biliares primarias actúan como quelantes, formando complejos con iones Ca²⁺ e iones Fe²⁺ solubles, limitando la disponibilidad de estos iones para la microbiota. **d)** Las sales biliares inducen inestabilidad genética a través de sustituciones nucleotídicas y *frameshifts*. Creación propia.

3. Antecedentes

La evidencia existente apunta a que no existe un mecanismo único que permita que *Salmonella enterica* resista las acciones de las sales biliares. En la literatura se reportan trabajos que a través de diversas técnicas de mutagénesis y evaluación fenotípica han determinado una listas de genes que son requeridos para sobrevivir a las sales biliares. La diversidad en la naturaleza, localización y función de éstos sugiere que se trata de un proceso complejo y de coordinación redundante.

En *Salmonella* y *Escherichia coli*, los principales elementos reportados como necesarios para la tolerancia a bilis y sus componentes pueden ser clasificados de manera general de la siguiente forma:

- Envoltura celular (66, 67, 68, 69, 70, 71, 72)
- Respuesta general a estrés (64, 73, 74, 75, 76)
- Mecanismos de reparación de DNA (77, 78, 61)
- Bombas de expulsión(79, 80, 81, 82)

En nuestro grupo se ha observadola importancia de algunos elementos como las porinas OmpC y OmpF así como el sistema CRISPR-Cas en la resitencia a deoxicolato de sodio. Además, se han caracterizado componentes clave en una cascada de regulación de las porinas mencionadas como es el caso del regulador tipo Lys-R,LtrR (83).

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar elementos genéticos en *Salmonella enterica* serovar Typhi involucrados con la respuesta y resistencia a deoxicolato de sodio a los niveles transcripcional, traduccional y geno-fenotípico.

4.2 Objetivos particulares

1) Obtener perfiles transcripcionales de cultivos de *S. Typhi* en medio libre y suplementado con deoxicolato de sodio.

2) Identificar proteínas cuya síntesis sea inducida o reprimida por sales biliares a partir de extractos proteicos totales de cultivos en medio libre y suplementado con deoxicolato de sodio.

3) Purificar proteínas de membrana interna de cultivos de *S. Typhi* en ausencia y presencia de deoxicolato de sodio.

4) Evaluar la capacidad de tolerancia y proliferación de un banco de cepas mutantes en medio suplementado con deoxicolato de sodio.

5. Materiales y Métodos

5.1 Cepas bacterianas utilizadas

En la tabla 1 se encuentran las cepas utilizadas en este estudio y sus características.

Tabla 1. Cepas bacterianas

Cepa	Descripción	Referencia
S. Typhi IMSS-1 WT	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi Serotipo Vi. Aislado clínico mexicano.	Puente <i>et al.</i> , 1987 (84)
IMSS-1 Δ-Fragmento 1	IMSS-1 Δ de la base 5114 a la base 11245	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 2	IMSS-1 Δ de la base 15020 a la base 44181	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 4	IMSS-1 Δ de la base 115562 a la base 140747	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 14	IMSS-1 Δ de la base 505095 a la base 511709	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 16	IMSS-1 Δ de la base 543995 a la base 559757	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 17	IMSS-1 Δ de la base 561169 a la base 568418	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 18	IMSS-1 Δ de la base 571070 a la base 603793	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 19	IMSS-1 Δ de la base 603869 a la base 662124	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 20	IMSS-1 Δ de la base 673526 a la base 692902	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 22	IMSS-1 Δ de la base 788781 a la base 803388	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 23	IMSS-1 Δ de la base 804424 a la base 853368	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 24	IMSS-1 Δ de la base 853371 a la base 902877	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 25	IMSS-1 Δ de la base 906205 a la base 951122	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 28	IMSS-1Δ de la base 1071866 a la base 1090452	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 29	IMSS-1Δ de la base 1090922 a la base 1125945	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 31	IMSS-1 Δ de la base 1157987 a la base 1177712	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 36	IMSS-1 Δ de la base 1268517 a la base 1279753	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 37	IMSS-1 Δ de la base 1287512 a la base 1306570	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 38	IMSS-1 Δ de la base 1306997 a la base 1355895	Este trabajo

Tabla 1 (Cont.). Cepas bacterianas

Cepa	Descripción	Referencia
IMSS-1 Δ-Fragmento 40	IMSS-1 Δ de la base 1379227 a la base 1399395	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 41	IMSS-1 Δ de la base 1400397 a la base 1407937	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 42	IMSS-1 Δ de la base 1409849 a la base 1428683	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 43	IMSS-1 Δ de la base 1428683 a la base 1469102	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 44	IMSS-1 Δ de la base 1469143 a la base 1528149	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 45	IMSS-1 Δ de la base 1530543 a la base 1576533	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 46	IMSS-1 Δ de la base 1577286 a la base 1621800	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 47	IMSS-1 Δ de la base 1621946 a la base 1667003	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 52	IMSS-1 Δ de la base 1846687 a la base 1895476	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 54	IMSS-1 Δ de la base 1921988 a la base 1963154	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 55	IMSS-1 Δ de la base 1966384 a la base 1977481	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 59	IMSS-1 Δ de la base 2131922 a la base 2186820	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 64	IMSS-1 Δ de la base 2347636 a la base 2374341	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 73	IMSS-1 Δ de la base 2614266 a la base 2677593	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 77	IMSS-1 Δ de la base 2862279 a la base 2904669	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 78	IMSS-1 Δ de la base 2907406 a la base 2946548	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 95	IMSS-1 Δ de la base 3512586 a la base 3538076	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 107	IMSS-1 Δ de la base 4019963 a la base 4090297	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 112	IMSS-1 Δ de la base 4351835 a la base 4393457	Este trabajo
IMSS-1 Δ-Fragmento 114	IMSS-1 Δ de la base 4406040 a la base 4455940	Este trabajo
S. Typhi IMSS-1+pKK232-8+RR <i>luxS</i>	IMSS-1 con el plásmido pKK232-8 que contiene la región reguladora del gen <i>luxS</i> . Ap ^R	Este trabajo

Tabla 1 (Cont.).Cepas bacterianas

Cepa	Descripción	Referencia
<i>S. Typhi</i> IMSS-1+pKK232-8+RR <i>fis</i>	IMSS-1 con el plásmido pKK232-8 que contiene la región reguladora del gen <i>fis</i> . Ap ^R	Este trabajo
<i>S. Typhi</i> IMSS-1+pKK232-8+RR <i>arcA</i>	IMSS-1 con el plásmido pKK232-8 que contiene la región reguladora del gen <i>arcA</i> . Ap ^R	Este trabajo
<i>S. Typhi</i> IMSS-1+pKK232-8+RR <i>crp</i>	IMSS-1 con el plásmido pKK232-8 que contiene la región reguladora del gen <i>crp</i> . Ap ^R	Este trabajo
<i>S. Typhi</i> IMSS-1+pKK232-8+RR <i>fur</i>	IMSS-1 con el plásmido pKK232-8 que contiene la región reguladora del gen <i>fur</i> . Ap ^R	Este trabajo
<i>S. Typhi</i> IMSS-1+pKK232-8+RR <i>soxR</i>	IMSS-1 con el plásmido pKK232-8 que contiene la región reguladora del gen <i>soxR</i> . Ap ^R	Este trabajo

5.2 Plásmidos

La tabla 2 reúne información sobre los plásmidos utilizados en este trabajo

Tabla 2. Plásmidos

Plásmido	Descripción	Referencia
pKK232-8	Derivado del plásmido pBR322, contiene el gen reportero cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) sin su promotor, Ap ^R	Pharmacia LKB Biotechnology
pKK232-8+R.R <i>luxS</i>	pKK232-8 conteniendo la región reguladora del gen <i>luxS</i>	Este trabajo
pKK232-8+R.R <i>soxR</i>	pKK232-8 conteniendo la región reguladora del gen <i>soxR</i>	Este trabajo
pKK232-8+R.R <i>fis</i>	pKK232-8 conteniendo la región reguladora del gen <i>fis</i>	Este trabajo
pKK232-8+R.R <i>arcA</i>	pKK232-8 conteniendo la región reguladora del gen <i>arcA</i>	Este trabajo
pKK232-8+R.R <i>crp</i>	pKK232-8 conteniendo la región reguladora del gen <i>crp</i>	Este trabajo
pKK232-8+R.R <i>fur</i>	pKK232-8 conteniendo la región reguladora del gen <i>fur</i>	Este trabajo

5.3 Medios de cultivo

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron cultivadas en medio Luria-Bertani [triptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1%, pH 7.5], suplementando con deoxicolato de sodio (Sigma Chemical, St. Louis, MO) cuando fue requerido. Para preparar medio sólido se utilizó agar al 1.5% y los cultivos crecieron en estado estático a 37 °C por 24 horas.

Los precultivos se realizaron inoculando una colonia de un cultivo sólido en 5 mL de medio líquido e incubando a 37 °C /200 rpm durante 16 horas.

Cuando fue necesario, se añadieron los siguientes antibióticos: ampicilina (Ap) 200 µg/mL y kanamicina (Km) 30 µg/mL

5.4 Experimentos de microarreglos

Condiciones de cultivo

La cepa *Salmonella enterica* serovar Typhi IMSS-1 fue inoculada en 50 mL de caldo Luria-Bertani (LB) o LB adicionado con deoxicolato de sodio (LB DOC) al 5%, incubándose a 37 °C y 200 rpm de agitación hasta alcanzar una O.D.₅₉₅ = 0.6.

Extracción de RNA

Se colectaron 25 mL de los cultivos mencionados y fueron lavados tres veces consecutivas con 25, 50 y 50 mL de PBS-DEPC centrifugando a 7,000 rpm y 4 °C en cada lavado. El RNA fue aislado con el método de fenol-ácido caliente. La concentración de RNA fue determinada midiendo la absorbancia a 260 nm. La integridad del RNA fue comprobada con un gel de agarosa al 1.5 % con MOPS y formaldehído al 5%.

Síntesis de cDNA e hibridación de microarreglos

Diez microgramos de RNA total fueron marcados con Cy3-dCTP o Cy5-dCTP utilizando un kit de marcaje de cDNA First-Strand (Amersham Biosciences). Pares de muestras de DNA marcadas con Cy3 y Cy5 fueron mezcladas e hibridadas al arreglo de *Salmonella* provisto por el Instituto de Fisiología Celular (Universidad Nacional Autónoma de México). Tras el lavado, los arreglos fueron escaneados utilizando un tamaño de píxel de 10 µm con un escáner de microarreglos Scan Array Lite (Perkin-Elmer, Boston MA).

Análisis de microarreglos de DNA

Detección de spot, señales medias, intensidad media local de fondo, segmentación de imagen y cuantificación de señal fueron determinadas para las imágenes de los microarreglos utilizando el software Array-Pro Analyzer 4.0 (Media Cybernetics, L.P). El análisis de datos de microarreglos fue realizado con el software genArise desarrollado en la unidad de computo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>). Este software identifica genes diferencialmente expresados, calculando un Z-score dependiente de intensidad. Utiliza un algoritmo de ventana deslizante para calcular las desviaciones media y estándar dentro de una ventana rodeando a cada dato y define un Z-score donde Z mide el número de

desviaciones estándar que un dato dado se aleja de la media. Se realizaron experimentos de microarreglos por duplicado, con RNA aislado de cultivos independientes.

Se tomaron en cuenta genes cuya expresión en DOC tuviera un Z-score >2.0

Se utilizó la función Functional Annotation Tool de DAVID Bioinformatics resources 6.8 (86,87).

5.5 Análisis de extractos de proteínas totales

Obtención de muestra

La cepa *Salmonella* Typhi IMSS-1 proveniente de precultivos fue inoculada en 50 mL de caldo LB o LB DOC 5% y se incubaron a 37 °C, 200 rpm hasta alcanzar O.D.₅₉₅ = 0.6.

Posteriormente, se dividió cada cultivo en alícuotas de 25 mL a las que se adicionaron 20 mL de PBS 1X. Se realizó un lavado, centrifugando a 7,000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Se realizaron dos lavados posteriores con 50 mL de PBS 1X. El paquete celular fue guardado a -80 °C hasta ser transportado al laboratorio de proteómica del Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

2-DGE e identificación de proteínas

El análisis de electroforesis en 2-DGE y el análisis de imágenes se realizaron como se ha reportado previamente. La separación de proteínas en un gradiente de pH se realizó mediante electroforesis bidimensional en un gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (Sigma, USA). Las masas moleculares fueron determinadas por electroforesis de un marcador molecular premezclado que abarca el rango de 14 – 98 kDa (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) en la segunda dimensión.

Spots de proteínas del gel de dos dimensiones fueron digeridos con tripsina (Promega, Madison, WI, USA). Antes de medir las masas de la mezcla peptídica, los péptidos fueron purificados utilizando un C8 ZipTip de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Millipore, Bedford, MA, USA). La solución de péptidos purificados (0.6

mL) fue preparada con volúmenes iguales de ácido α -ciano-4-hidroxi cinámico en 50% ACN- 0.1% TFA para crear un templado de muestra para MALDI-TOF MS. Huellas de masa peptídica fueron analizadas utilizando proyectos de secuenciación de Mascot Software (Matrix Science, London, UK).

5.6 Análisis proteómico de extractos de membrana interna

Extracción de proteínas de membrana interna

La cepa *Salmonella* Typhi IMSS-1 proveniente de precultivos fue inoculada en 1.5 L de caldo LB o LB DOC 5% y se incubaron a 37 °C, a 200 rpm de agitación hasta alcanzar $O.D._{595} = 0.6$.

Posteriormente se centrifugaron 300 mL de cultivo de cada condición a 8,000 rpm durante 20 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante, se vertieron otros 300 mL de cultivo y se centrifugó por segunda ocasión. Este paso se repitió hasta recolectar la pastilla celular de 1.5 L de cultivo. Después, las pastillas se resuspendieron y lavaron dos veces con 300 mL de buffer Tris-HCl 10 mM pH 7.5. Cada pastilla fue resuspendida en 30 mL de Tris-HCl 10 mM pH 7.5 y fueron congeladas a -80 °C overnight.

Al día siguiente las pastillas se descongelaron, resuspendieron en vórtex y fueron lisadas a presión con prensa de French. Posteriormente, el lisado se centrifugó a 8,000 rpm por 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue ultracentrifugado a 108,000 g durante 20 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado tres veces con 30 mL de Tris-HCl 10 mM pH 7.5 ultracentrifugando a las mismas condiciones. La pastilla fue resuspendida en 8 mL de TT (Tris-HCl 10 mM + 2% Triton X-100) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La suspensión se ultracentrifugó a 108,000 g por 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante contiene las proteínas de membrana interna y se recolectó. La pastilla corresponde a las proteínas de membrana externa y se resuspendió en 1 mL de TT.

Se cuantificaron las proteínas por espectrofotometría con el método del ácido bicinónico (BCA). En una placa tipo ELISA, se colocó por duplicado 10 μ L de cada muestra y se adicionaron a cada pozo 200 μ L del reactivo de reacción BCA Protein

Assay Kit Reagent (Pierce). La placa fue incubada a 37 °C durante 30 minutos y la absorbancia fue medida a 562 nm utilizando un lector Ceres 900-C.

Finalmente, 30, 50 y 70 µg de cada muestra de proteína se analizaron en geles de poliacrilamida (12% SDS-PAGE) y se sometieron a electroforesis con un voltage de 12 mA durante 12 horas. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie.

Muestras de extractos de proteínas de membrana interna de ambas condiciones de cultivo fueron enviadas al laboratorio de proteómica del Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, donde se realizó un análisis de electroforesis en 2-DGE como se describió anteriormente.

Una parte de los spots del gel fueron procesadas por el laboratorio de proteómica del Centro de Ciencias Genómicas como ya se describió y otra por el Laboratorio Universitario de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México donde se realizó el siguiente procedimiento:

Optimización del espectrómetro de masas (calibración externa)

El ajuste de los parámetros para asegurar que el instrumento funcione dentro de las especificaciones fue realizado con una solución Calmix (N-butilamina, cafeína, Met-Arg-Phe-Ala (MRFA) y Ultramark 1621 (Pierce LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution). Estas soluciones se utilizan para calibrar el módulo LTQ Velos con trampa de iones y el módulo Orbitrap con detector de masas FT (Fourier Transform) en modo de ionización positiva ESI. La N-butilamina se utiliza para extender la calibración de masas a valores menores de m/z (73.14 Da). Este tipo de calibración permite determinaciones de masas moleculares con variación de exactitudes menores a 5 ppm (partes/millón).

Análisis espectrométrico

Los péptidos producidos por clivaje enzimático fueron desalados con Zip Tip C18 (Millipore; Billerica, MA, USA) y aplicados en un sistema LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) compuesto de una bomba Accela (Thermo-Fisher Co.; San Jose, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap

Velos (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA, USA) con fuente de ionización tipo nano-electrospray (ESI).

En la cromatografía de líquidos de nano flujo en línea se utilizó un sistema gradiente de 5-85 % B (acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico) en 60 minutos utilizando una columna capilar RP-C18 hecha en casa (0.75 μm de diámetro interno y 10cm de largo). El flujo del sistema LC fue de 300 nanolitros/minuto.

El escaneo total de iones (Full Scan) fue realizado en el analizador Orbitrap con un poder de resolución de masas (Resolution Power; $\text{RP}=\text{m}/\text{FWHM}$) de 30,000. Para la fragmentación de los péptidos se aplicaron los métodos de CID (Collision-InducedDissociation) y HCD (High-energyCollisionDissociation) con un poder de resolución de masas (ResolutionPower; $\text{RP}=\text{m}/\text{FWHM}$) de 15,000. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones según las cargas predeterminadas (solamente se fragmentaron iones con carga z^{2+} , z^{3+} y z^{4+}) con un ancho de aislamiento de 2.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 5 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos fue utilizado la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 500 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 30 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 70 segundos.

Búsqueda en Protein Data Bank (PDB) e identificación de proteínas

La identificación de proteínas se realizó con los datos espectrométricos en formato.raw en el programa Proteome Discoverer 1.4. (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA, USA) a través del motor de búsqueda Sequest HT. Para la búsqueda de identidad se utilizó la base de datos invertida (Decoy database) de uniprot-*Salmonella enterica*, con un FDR-False Discovery Rate (Mínimo) de 0.01 y FDR 0.05 (Máximo). La tolerancia máxima de diferencia de masas moleculares del ion precursor cuando se compararon los valores teóricos contra experimentales (precursor mass tolerance) fue de 20 ppm y la tolerancia para los fragmentos obtenidos por disociación del ion precursor (fragment mass tolerance) fue de 0.6 Da. Para la búsqueda automática fueron

establecidas modificaciones constantes carbamidometilación de cisteínas y variables como oxidación de metioninas y deaminación de asparagina y glutamina.

Resumen de los parámetros de búsqueda:

Motor de búsqueda: Sequest HT

Base de datos: uniprot-*Salmonella enterica*.

Modificación constante: Carbamidomethyl (Cisteínas)

Modificaciones variables: Oxidation (M) y Deamidated (N y Q)

Enzima proteolítica: Tripsina

Número máximo de “Missed cleavages”: 2

Precursor mass tolerance: 20 ppm

Fragment mass tolerance: 0.6 Da

5.7 Ensayos de expresión de las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*

Las cepas se crecieron en matraces con 50 mL de caldo LB o LB DOC 5% a 200 rpm y 37 °C. Se tomaron muestras cuando los cultivos alcanzaron O.D.₅₉₅ de 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 y 1.2. Estas muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 2 minutos, el sobrenadante se descartó y el paquete celular se resuspendió y lavó con 0.8 mL de buffer TDTT (Tris-HCl 50 mM pH 7.8, 30 µM de DL-ditriotretol). Posteriormente, las células se resuspendieron en 500 µL de TDTT y fueron sonicadas en hielo en un ciclo de 3 minutos – 9.9 s ON/9.9 s OFF- en un sonicador Vibra Cell (Sonics and Materials, Inc). Al finalizar la sonicación, los restos celulares fueron removidos centrifugando a 13000 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante se transfirió a tubos limpios.

Se realizó una cuantificación de proteínas totales colocando por duplicado 10 µL del sobrenadante en pozos de placa de ELISA y se adicionaron a cada pozo 200 µL de la reacción BCA Protein Assay Kit Reagent (Pierce), la placa se incubó a 37 °C por 30 minutos. Se midió la absorbancia a 562 nm utilizando un lector Ceres 900-C. La

actividad de la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) fue determinada colocando 5 μ L del sobrenadante en pozos de placa de ELISA, adicionando posteriormente 200 μ L solución de acetilcoenzima A (acetil-CoA) 0.1 mM, cloranfenicol 0.1 mM y DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico) 1mM, en Tris-HCl 0.1 M pH 7.8. La enzima CAT transfiere el grupo acetilo de la acetil-CoA al cloranfenicol. La CoA reducida reacciona con el DNTB produciendo CoA-disulfuro, ácido trinitrobenzoico y tionitrobenzoico libre, compuesto que absorbe a 412 nm, longitud de onda a la cual se midió la absorbancia con el lector Ceres 900-C a intervalos de 5 segundos durante 5 minutos. La actividad específica CAT (mol/min/mg) corresponde al cociente entre la actividad CAT y la concentración de proteínas.

5.8 Obtención de cepas mutantes

La generación de las cepas mutantes evaluadas en este trabajo fue llevada a cabo por el método de Datsenko y Wanner (85), que consiste en reemplazar una secuencia cromosómica por un gen de resistencia a antibiótico (kanamicina en este caso). Se genera un product de PCR utilizando oligonucleótidos con extensiones homólogas correspondientes a la region a eliminar. Tales extensiones recombinarán en regiones flanqueadas al gen mediante una reacción catalizada por la recombinasa Red. Las cepas mutantes se verificaron por PCR y secuenciación.

5.9 Evaluación del crecimiento de mutantes en medio LB y LB DOC 5%

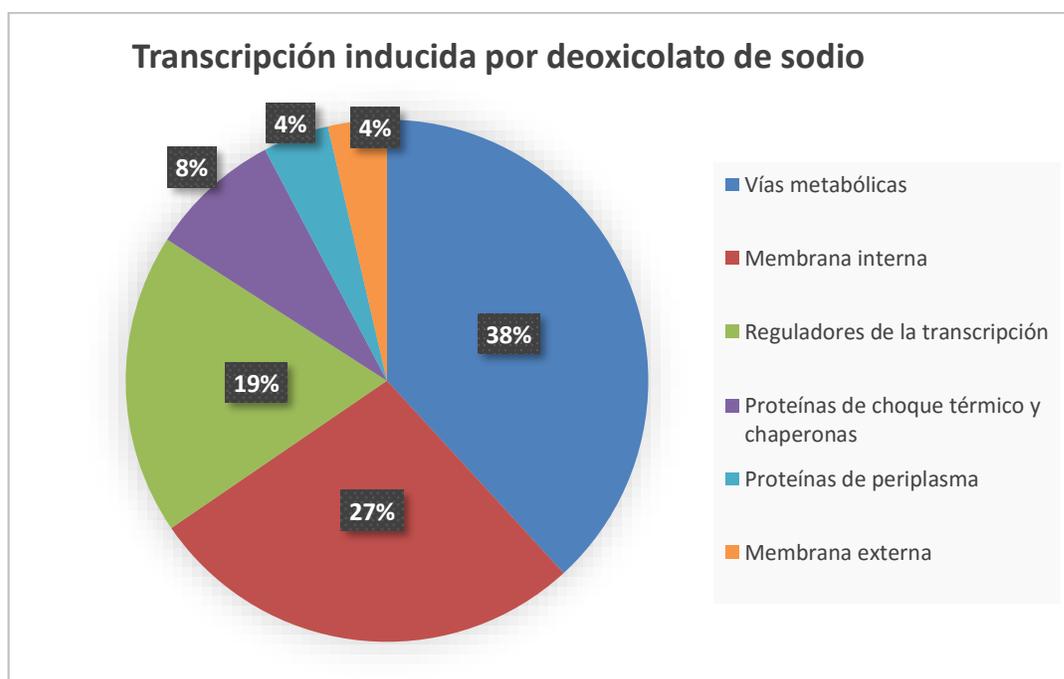
Las cepas criopreservadas de cada una de las mutantes y la cepa silvestre *S. Typhi* IMSS-1 fueron estriadas en placas de agar LB con kanamicina 30 μ g/mL y LB, respectivamente, e incubadas a 37 °C por 24 horas sin agitación. Se tomó una colonia aislada de cada placa y fue inoculada en tubo con 5 mL de caldo LB con kanamicina 30 g/mL (LB sin antibiótico en el caso de la cepa silvestre) y se incubaron por 16 horas. Al finalizar la incubación se midió la absorbancia de cada tubo y se ajustó el volumen de inóculo que fue introducido en matraces con 50 mL de caldo LB y LB

DOC 5%. Los matraces fueron incubados a 37 °C en agitación a 200 rpm, la absorbancia de cada cultivo fue medida en periodos regulares de dos horas

6. Resultados

6.1 El deoxicolato de sodio induce la transcripción de genes con una gran diversidad de funciones en *S. Typhi*

Los resultados de los experimentos de microarreglos realizados con *S. Typhi* indican que la presencia de deoxicolato de sodio al 5% en el medio de cultivo induce la expresión de genes que se pueden agrupar dentro de las siguientes categorías generales: genes de enzimas de vías metabólicas, membrana interna, membrana externa, periplasma, reguladores transcripcionales, chaperonas y proteínas de choque térmico. De estas categorías, las enzimas de vías metabólicas es la más extensa, constituida por 84 genes; 60 genes se clasifican como de membrana interna mientras que solamente 8 en membrana externa; 40 genes corresponden a reguladores transcripcionales; 9 genes que codifican para proteínas de periplasma y 18 que son agrupados como chaperonas y proteínas de choque térmico. La gráfica 1 esquematiza esta información.



Gráfica 1. Categorías funcionales de los genes inducidos por la presencia de deoxicolato de sodio al 5% y porcentaje que corresponde a cada una del total de genes revelados en los experimentos de microarreglos.

6.2 *Salmonella Typhi* experimenta un cambio metabólico ante la presencia de deoxicolato de sodio

Las sales biliares representan una condición de estrés en la que posiblemente las células bacterianas requieran regular su actividad metabólica en ciertos procesos y favorecer otros. Después de todo, las sales biliares reducen la tasa de replicación de las bacterias tolerantes, e inducen la expresión y síntesis de proteínas y metabolitos secundarios posiblemente necesarios en los mecanismos de resistencia. Adicionalmente, las bacterias tienen que hacer frente y reparar los daños que infringen estos agentes. Tomando esto en consideración, no es sorprendente que los datos de expresión transcripcional indiquen que hay una clara diferencia en el nivel de expresión de genes de enzimas metabólicas entre células que han sido expuestas a deoxicolato de sodio frente a aquellas que no han sido expuestas.

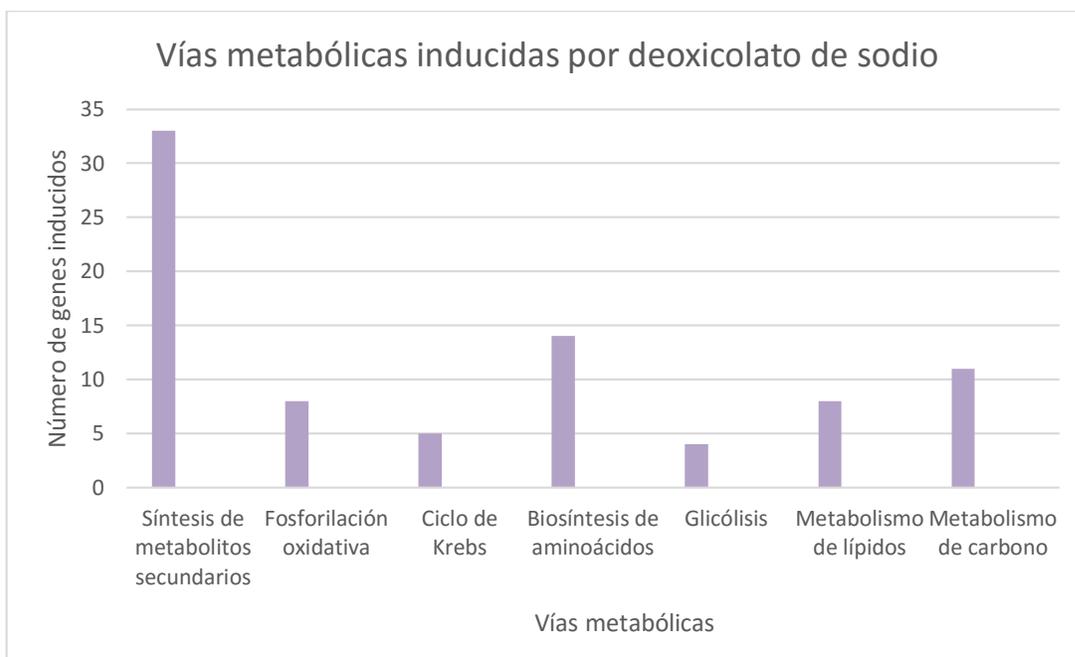
De acuerdo con estos experimentos de microarreglos, el deoxicolato de sodio induce la expresión de alrededor de 33 enzimas que participan en la síntesis de metabolitos secundarios tales como core y lípido A de lipopolisacárido, aminoglicósidos, peptidoglicano, biotina, celulosa, protohemo IX, antígeno común enterobacteriano (ECA) y antibióticos. Un ejemplo notable de esta categoría son los genes *waaB* (*rfaB*), *waaQ* (*rfaQ*), *waaY* (*rfaY*) y *waaG* (*rfaG*) involucrados en catalizar distintos pasos en la biosíntesis de carbohidratos del core de LPS.

Numerosos genes de enzimas de vías del metabolismo central del carbono como glucólisis, ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa se ven inducidos en la exposición a deoxicolato de sodio. Parece notable resaltar la inducción de la expresión del complejo succinato deshidrogenasa, del cual varias subunidades son registradas incluyendo *sdhA*, *sdhH* y *sdhC*. Asimismo, el metabolismo general de carbohidratos se encuentra particularmente activo y como ejemplos podemos citar la expresión de *glgA* y *glgP*, que codifican para glucógeno fosforilasa y glucógeno sintetasa, respectivamente, así como de genes involucrados en el transporte de carbohidratos.

Los genes de enzimas que participan en el metabolismo de aminoácidos son otro grupo funcional transcripcionalmente inducido por el deoxicolato de sodio. En esta lista se

incluyen varias aminotransferasas como la aminotransferasa de aminoácidos ramificados *ilvE*, la aminotransferasa de aminoácidos aromáticos *tyrB*, transaminasa de valina-piruvato *avtA* y aminotransferasa de acetilornitina *argD*.

La gráfica 2 presenta información sobre las vías metabólicas y el número de genes inducidos.

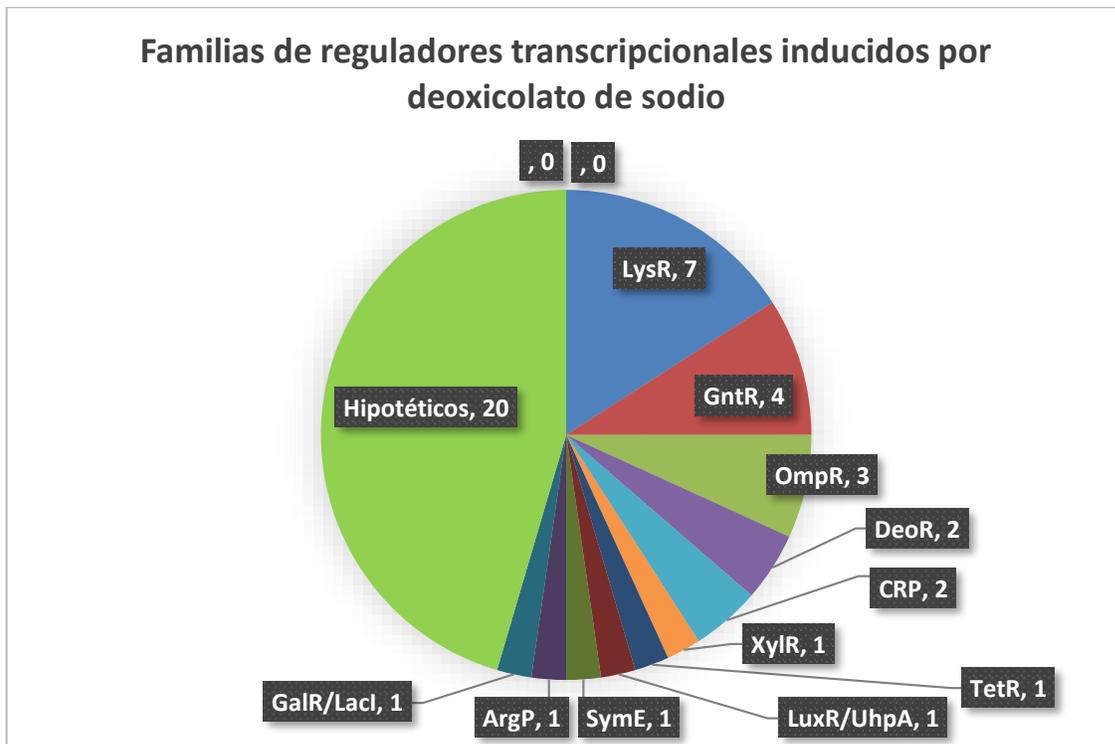


Gráfica 2. Principales vías metabólicas inducidas por deoxicolato de sodio y el número de genes implicados en cada una.

6.3 El deoxicolato de sodio estimula la expresión de decenas de reguladores de la transcripción

Alrededor de cuarenta genes de proteínas reguladoras de la transcripción son expresados a niveles mayores en presencia de deoxicolato de sodio que en ausencia. Como se muestra en la gráfica 3, si se clasifican estos reguladores en familias, al menos siete pertenecen a la familia tipo LysR, convirtiéndose en la familia de reguladores más representada; la familia GntR tiene al menos cuatro genes inducidos; la familia OmpR tiene por lo menos tres miembros en esta lista y las familias GalR/LacI, TetR, LuxR/UhpA, XylR, SymE y

ArgP están representadas con al menos un regulador. Se revelaron también genes de reguladores transcripcionales hipotéticos..La tabla 3 muestra una lista de los genes de factores transcripcionales que en estos experimentos de microarreglos fueron inducidos por el deoxicolato de sodio al 5%.



Gráfica 3. Principales familias de reguladores transcripcionales inducidos por deoxicolato de sodio y el número de reguladores correspondientes a cada una.

Adicionalmente, alrededor de 20 genes son considerados como parte de un sistema de dos componentes. Genes como *basR*, *ompR*, *envZ*, *phoP* son componentes de tales sistemas, estando todos inducidos en la condición evaluada.

Tabla 3. Reguladores transcripcionales inducidos por deoxicolato de sodio al 5%

Gen	Proteína	Familia
<i>ydhB</i>	Regulador transcripcional no caracterizado tipo HTH	LysR
<i>yhjC</i>	Regulador transcripcional no caracterizado tipo HTH	LysR
<i>ynfL</i>	Regulador transcripcional no caracterizado tipo HTH	LysR
<i>yjiE</i>	Regulador transcripcional YjiE	LysR
<i>yifA</i>	Regulador transcripcional HdfR	LysR
<i>yidZ</i>	Regulador transcripcional YidZ	LysR
<i>iciA/argP</i>	Regulador transcripcional tipo HTH ArgP	LysR
<i>lldR</i>	Putativa proteína reguladora del operón L-lactato deshidrogenasa	GntR
<i>dgoR</i>	Represor transcripcional del operón galactonato	GntR
<i>yncC</i>	Regulador transcripcional de ácido colánico/biofilm	GntR
<i>yhcK</i>	Represor transcripcional NanR	GntR
<i>ompR</i>	Regulador transcripcional OmpR	OmpR
<i>arcA</i>	Proteína de control de respiración aerobia	OmpR
<i>basR</i>	Proteína reguladora BasR	OmpR
<i>yihW</i>	Regulador transcripcional YihW	DeoR
<i>yjfQ</i>	Regulador transcripcional UlaR	DeoR
<i>crp</i>	Regulador transcripcional global activado por CAMP CRP	CRP
<i>fnr</i>	Proteína reguladora de la reducción de fumarato y nitrato	CRP
<i>sdiA</i>	Proteína reguladora SdiA	LuxR
<i>hilA</i>	Regulador transcripcional de isla de patogenicidad 1 Hila	TPR
<i>metJ</i>	Represor Met	MetJ
<i>hilC/sprA/sirC</i>	Regulador transcripcional SirC	AraC
<i>zur</i>	Proteína reguladora del uptake de zinc	FUR
<i>fliA</i>	Factor sigma de RNA polimerasa FliA	RNA pol Sigma 70
<i>yccV</i>	Proteína de choque térmico HspQ	
<i>trpR</i>	Represor de operón Trp	
<i>phoP</i>	Regulador transcripcional PhoP	
<i>pgtA</i>	Regulador transcripcional del sistema de transporte de fosfoglicerato PgtA	
<i>glnG</i>	Regulador transcripcional NtrC	
<i>xyIR</i>	Proteína reguladora del operón xilosa	
<i>argR</i>	Represor de arginina	
<i>cytR</i>	Represor transcripcional tipo HTH CytR	
<i>yjiW</i>		

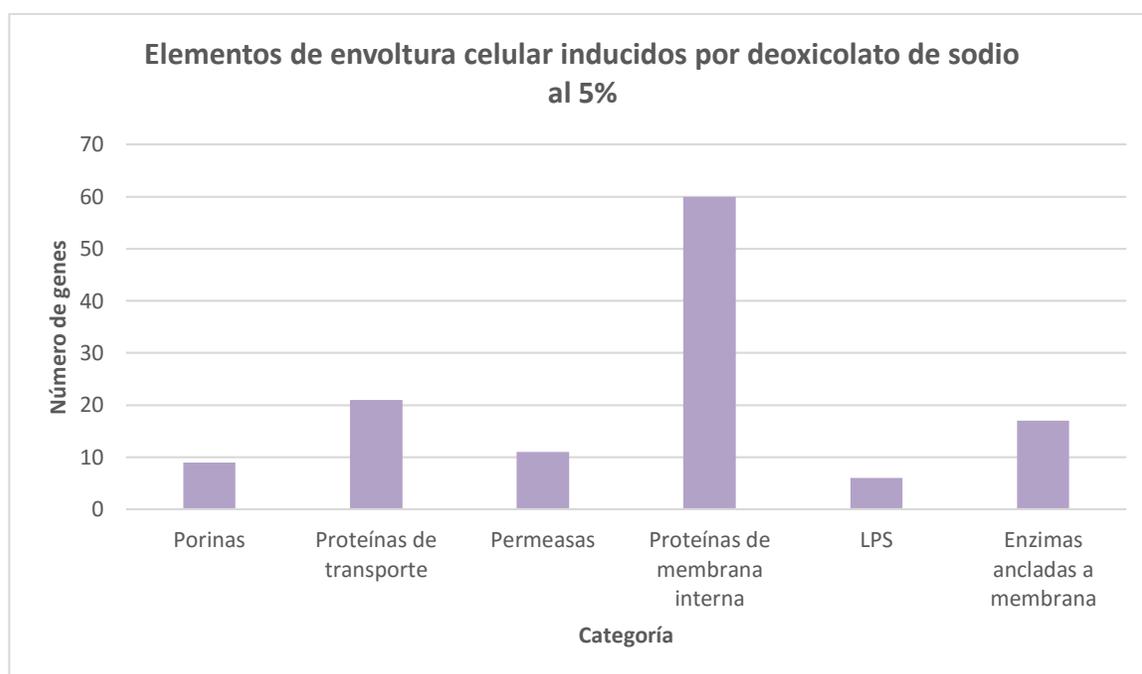
6.4 La envoltura celular responde a la agresión de las sales biliares con una reestructuración de sus cuatronicos – cápsula, LPS, peptidoglicano y membrana interna

Las sales biliares, al igual que cualquier otro agente exógeno, entran en contacto con la célula bacteriana por primera vez a través de la envoltura celular. No resulta sorprendente que las estructuras que la componen sean capaces de responder a este estímulo, sufriendo cambios en su composición y estructura que acondicionen a la bacteria para tolerar las acciones bactericidas de estos agentes. En los ensayos de microarreglos, estos cambios se reflejan en incremento de la actividad transcripcional de genes cuyos productos son elementos estructurales de membranas, o que intervienen en la síntesis de éstos.

En la gráfica 1 se observa que las categorías correspondientes a proteínas de membrana interna, proteínas de periplasma y proteínas de membrana externa representan en conjunto el 35% de todos los genes inducidos por deoxicolato de sodio. Los genes de proteínas membrana interna por sí solos constituyen el 27% de la actividad transcripcional genómica inducida bajo esta condición de cultivo. Esta categoría estructural contempla 60 genes entre los que se encuentran en forma mayoritaria genes de proteínas integrales de membrana interna, además de genes de proteínas asociadas a la membrana interna. De manera interesante, los tres genes con niveles de expresión más altos inducidos por deoxicolato de sodio son codificantes para proteínas de membrana interna: *ytgA*, *yjiN* y *yjcH*. Muchos de los genes de proteínas de membrana interna detectados codifican para productos hipotéticos, de los que se conoce poco y no tienen aún una función elucidada. En contraste, tanto las proteínas de membrana externa como de espacio periplásmico comprenden cada una el 4% de los genes transcripcionalmente activados, con nueve genes de membrana externa y nueve de proteínas del periplasma.

No obstante, los datos reportados en la gráfica 1 para componentes de envoltura celular se refieren únicamente a genes de constituyentes proteicos que en la base de datos DAVID solo hacen *match* con la palabra clave “cell membrane”. Esto deja fuera otros genes de elementos de membrana o de las enzimas que los sintetizan (que hacen *match*

con diferentes palabras clave), y que están clasificados en alguna de las otras categorías de la gráfica 1. Si se toman en cuenta estos datos, la aproximación de genes involucrados con envoltura celular que son activados transcripcionalmente en deoxicolato de sodio pasa de 78 a 124. La gráfica 4 presenta el número de genes de envoltura celular en categoría estructural o funcional, mientras que las tablas 4, 5 y 6 enlistan los genes de porinas, proteínas de transporte y permeasas, así como de enzimas ancladas a membrana.



Gráfica 4. Número de genes por categoría (porinas, proteínas de transporte, permeasas, proteínas de membrana interna, LPS y enzimas de membrana) de elementos involucrados estructural o funcionalmente con la envoltura celular que son inducidos por deoxicolato de sodio al 5%.

Gen	Enzima de membrana
<i>flip</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FlIP
<i>yjcC</i>	Diguanilato ciclasa fosfodiesterasa
<i>cyoC</i>	Subunidad III de citocromo o ubiquinol oxidasa
<i>mrcA</i>	Murein transglicosilasa/transpeptidasa
<i>atpB</i>	Subunidad A ATP sintasa
<i>atpF</i>	Subunidad B ATP sintasa
<i>atpH</i>	Subunidad delta ATP sintasa
<i>hflB</i>	Metaloproteasa ATP dependiente
<i>dgkA</i>	Diacilglicerol cinasa
<i>bcsG</i>	Proteína de biosíntesis de celulosa
<i>wecF</i>	Polimerasa de ECA
<i>yciM</i>	N-acetilglucosaminil transferasa
<i>yebA</i>	Murein DD-endopeptidasa
<i>sdhA</i>	Succinato deshidrogenasa subunidad flavoproteína
<i>sdhD</i>	Succinato deshidrogenasa citocromo b556 subunidad pequeña
<i>sdhC</i>	Succinato deshidrogenasa citocromo b556 subunidad
<i>hemY</i>	Proteína de biogénesis de protohemo IX

Tabla 4. Genes que codifican para enzimas asociadas a membrana inducidos por deoxicolato de sodio al 5%.

Gen	Proteína de membrana externa
<i>ompC</i>	Porina OmpC
<i>ompA</i>	Porina OmpA
<i>ompF</i>	Porina OmpF
<i>lamB</i>	Maltoporina
<i>stcC</i>	Proteína usher fimbrial
<i>ybdG</i>	Proteína de canal mecanosensible
<i>prgK</i>	Lipoproteína de sistema de transporte
<i>yraM</i>	Activador de proteína de unión a penicilina

Tabla 5. Genes que codifican para proteínas de membrana externa inducidos por deoxicolato de sodio al 5%.

Tabla 6. Transportadores y permeasas cuya expresión es incrementada por deoxicolato de sodio al 5%

Gen	Transportador/permeasa
<i>nanT</i>	Transportador de ácido siálico
<i>yedA</i>	Exportador de aminoácidos
<i>yrbE</i>	Permeasa de transportador ABC
<i>nupG</i>	Transportador de nucleósidos
<i>metI</i>	Permeasa de transportador ABC de DL-metionina MetI
<i>cycA</i>	Permeasa de D-alanina/glicina/serina
<i>pstC</i>	Permeasa de transportador ABC de fosfato PstC Simportador de galactósido de sodio
<i>yieG</i>	Permeasa de xantina/uracilo
<i>ygdQ</i>	Proteína transportadora integral de membrana
<i>oppB</i>	Permeasa de transportador ABC de oligopéptidos OppB
<i>ybdA</i>	Exportador de enterobactina EntS
<i>yhjV</i>	Proteína de transporte de familia HAAAP
<i>sbmA</i>	Transportador de superfamilia ABC
<i>yhjE</i>	Proteína de transporte de familia MFS
<i>STM3792</i>	Permeasa de L-fucosa
<i>uhpT</i>	Proteína de transporte de hexosa fosfato
<i>ygiE</i>	Transportador de zinc ZupT
<i>yjiJ</i>	Transportador de azúcares
<i>dcuA</i>	Transportador C-4 dicarboxilato anaerobio

Es posible que el lipopolisacárido enterobacteriano responda al reto de las sales biliares con modificaciones estructurales debido a: la inducción de los genes *waaQ*, *waaG*, *waaB* y *waaY*, involucrados en la biogénesis del core de lipopolisacárido; del gen *lpxB* que sintetiza un precursor del lípido A que ancla el LPS a la membrana celular externa; y el incremento de actividad de *wecF*, involucrado en la biosíntesis del antígeno común enterobacteriano (ECA).

6.5 El deoxicolato de sodio reprime la transcripción de genes capsulares, flagelares, de síntesis de cardiopina y de fagos

Entendiéndose al deoxicolato de sodio como una señal ambiental que influye la expresión genética de *Salmonella Typhi*, hay genes que son reprimidos cuando esta bacteria crece en contacto con esta sal biliar. Es probable que los genes reprimidos por las sales biliares codifiquen para productos prescindibles para la vida en esta condición, o más aún, que representen una desventaja para la supervivencia.

Los genes más reprimidos en estos estudios transcripcionales están enlistados en la tabla 7.

Tabla 7. Loci más reprimidos por deoxicolato de sodio

Locus	Z-score
<i>tviA</i> – proteína de biosíntesis de polisacárido Vi	-4.5
STM2903 – proteína citoplásmica putativa	-3.9
<i>cls</i> – sintetasa de cardiopina	-3.29
STY1068 – proteína putativa de bacteriófago	-3.59
STY1635 –proteína putativa ensambladora de baseplate de bacteriófago	-3.61
STY4666–integrasa de fago	-3.18
<i>fliC</i> – flagelina	-3.04
<i>mogA</i> – proteína de biosíntesis de cofactor de molibdeno	-3.41
STY2057 – proteína hipotética	-3.5
<i>ychM</i> – transportador hipotético de sulfatos YchM	-3.3
STY1057 – proteína putativa de bacteriófago	-3.0
STY1592 – proteína hipotética	-3.5
STY1068 – proteína putativa de bacteriófago	-3.49
<i>stfD</i> – chaperona fimbrial periplásmica putativa	-3.27

El gen más reprimido en 5% deoxicolato de sodio de acuerdo a Z-score es *tviA*, proteína de biosíntesis del polisacárido capsular Vi. De manera notable, cinco de los quince elementos en la tabla 7 corresponden a proteínas originarias de bacteriófago.

6.6 La actividad transcripcional de reguladores esenciales para la tolerancia a deoxicolato de sodio no es necesariamente inducida por la presencia de esta sal biliar

Previamente, en nuestro grupo de trabajo se evaluó el crecimiento en deoxicolato de sodio al 5% de una colección de mutantes de *Salmonella* Typhi deficientes de manera independiente en diversos reguladores transcripcionales, con la finalidad de determinar reguladores implicados en la resistencia de esta bacteria al deoxicolato de sodio.

Los resultados demostraron que *S. Typhi* es incapaz de crecer en medio LB con 5% de deoxicolato de sodio cuando se ha mutado alguno de los genes *luxS*, *soxR*, *fis*, *arcA*, *crpofur*, que son codificantes para reguladores de la transcripción (datos no publicados).

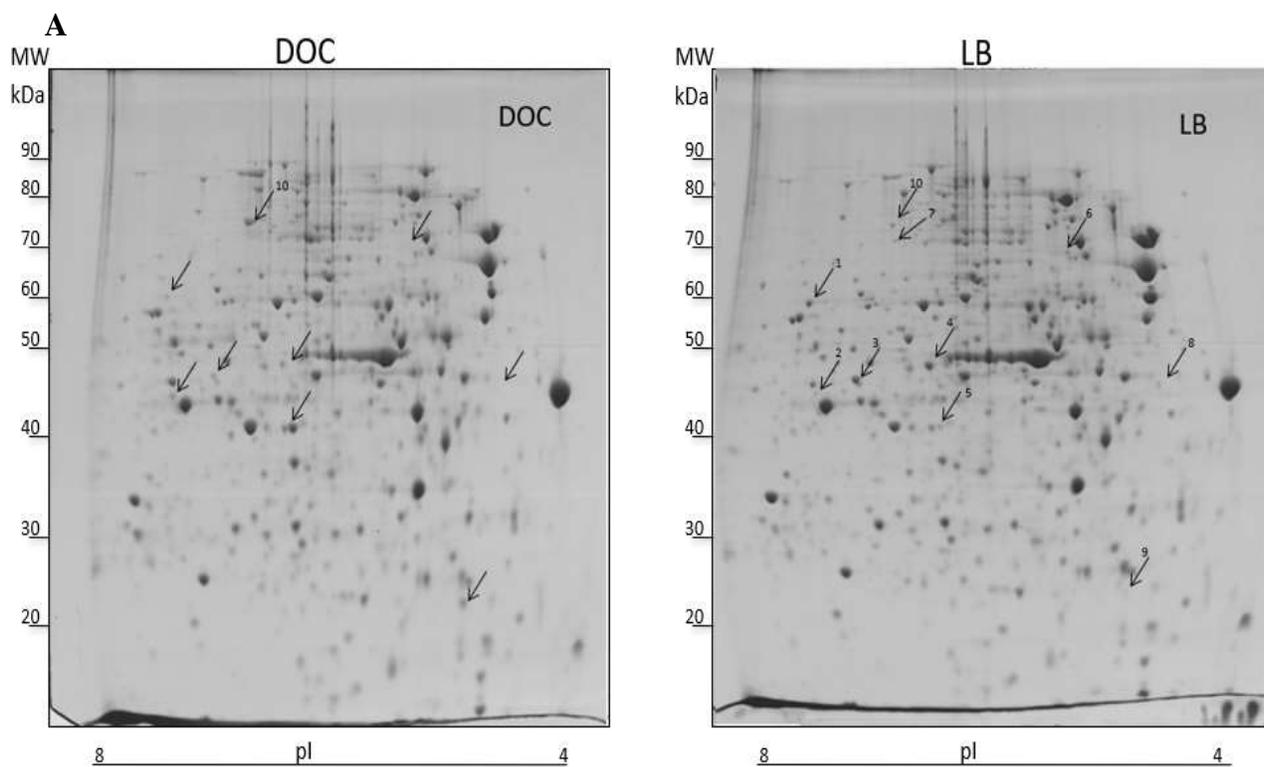
Por lo tanto, se decidió evaluar si la presencia de deoxicolato de sodio inducía la expresión de dichos reguladores de la transcripción. Estos experimentos fueron llevados a cabo clonando la región reguladora de los genes de reguladores de transcripción mencionados a la región codificante del gen reportero cloranfenicol acetil transferasa (CAT) en el vector plasmídico pKK232-8. Las cepas transformadas con estas construcciones (tabla 2) fueron cultivadas en medio LB y LB con 5% deoxicolato de sodio. Las muestras fueron tomadas y procesadas como se describe en la sección 5.7.

Para la mayoría de estas construcciones, los resultados experimentales no mostraron datos contundentes de que la actividad transcripcional medida por la actividad específica CAT estuviera estimulada por la presencia de deoxicolato de sodio en el medio de cultivo, es decir, el deoxicolato de sodio no estimula la región reguladora de los genes de factores transcripcionales evaluados bajo las condiciones ensayadas.

6.7 Perfil proteómico de *S. Typhi* en deoxicolato de sodio

Para observar el perfil de expresión proteica en condiciones de presencia y ausencia de deoxicolato de sodio, se realizó la extracción de proteínas totales de cultivos correspondientes y se sometieron a electroforesis de dos dimensiones en gel de poliacrilamida.

La examinación del gel en la figura 3 muestra diez spots que son expresados de forma diferenciada entre ambos cultivos. Los spots 1,3,4 y 6 se encontraban ausentes o disminuidas en presencia de deoxicolato de sodio, indicativo de una regulación negativa causada por la sal biliar. Por el contrario, los spots 2,5 y 10 son más abundantes en deoxicolato de sodio, sugiriendo un posible requerimiento de estas proteínas en la tolerancia a este agente. En la tabla 8 se reúne información sobre las proteínas identificadas.



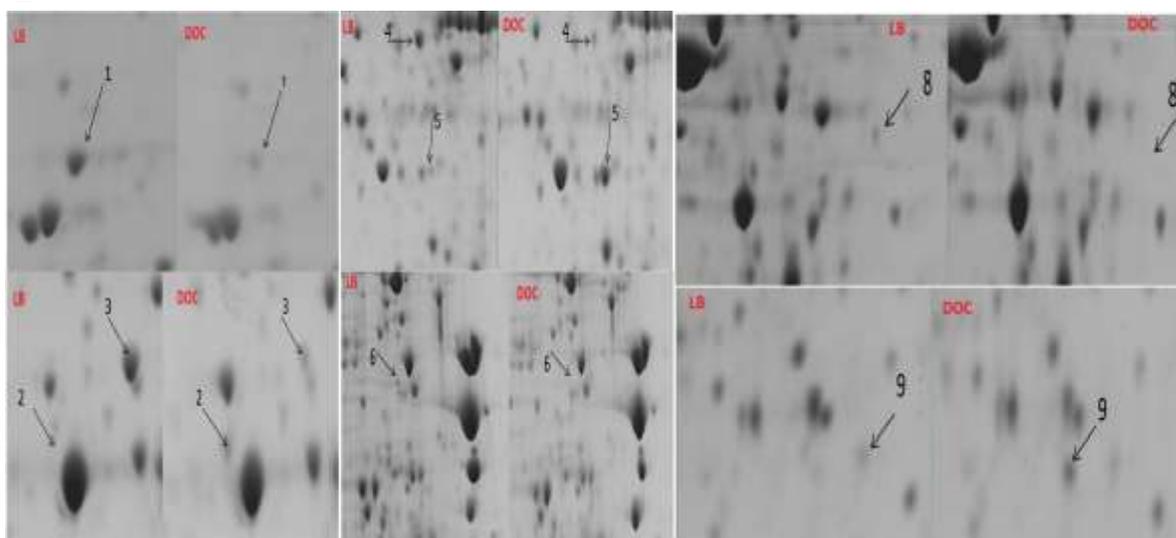
B

Figura 3. Proteínas expresadas diferencialmente en cultivos de *S. Typhi* en LB y LB + 5% DOC. **A)** 2-D PAGE de extracto de proteínas totales de cultivos en DOC (izquierda) y LB (derecha). **B)** Acercamiento de spots con expresión diferencial.

Tabla 8. Proteínas identificadas en extractos totales de cultivos de *S. Typhi* en LB y LB DOC 5%

SPO T	PROTEÍNA	GEN	COBERT URA DE SECUEN CIA (%)	ABUNDA NCIA (LB/DOC)	DO C	ORGANISM O	NÚMERO DE ACCESO	P.I.	MW
1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	<i>glpD</i>	34	242.3/49.1	-	<i>S. Gallinarum</i>	WP_00167500 5	6.37	57104
2	fructose-bisphosphate aldolase	<i>fbaB</i>	67	19.9/151.9	+	<i>S. enterica</i>	WP_07991797 7	5.50	33679
3	alpha-hydroxy-acid oxidizing enzyme	<i>lldD</i>	55	354.7/84.8	-	<i>S. Typhi</i>	WP_00058702 7	6.25	42960
4	acetate kinase, partial	<i>ackA</i>	35	499.6/135.8	-	<i>S. enterica</i>	WP_07995237 1	5.83	39648
5	cysteine synthase A	<i>cysK</i>	54	81.9/733.8	+	<i>S. Onderstepoort</i>	WP_08854615 7	5.82	34601
6	heat shock protein 90	<i>hspG</i>	21	71.3/0	-	<i>S. Typhimurium</i>	CQC73546.1	5.19	71370
7	tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification enzyme GidA	<i>mmmG</i>	24		-	<i>S. Montevideo</i>	EHC73148	5.58	58692
10	Fatty acid oxidation complex subunit alpha	<i>fadB</i>	29	61/267.1	+	<i>S. Typhi</i>	WP_050181376	6.09	79929

Tomando en cuenta la cantidad de genes de enzimas revelados por microarreglos, no resulta sorprendente que la mayoría de las proteínas identificadas en este gel correspondan a esta categoría. Asimismo, tres de estas proteínas son los productos de genes que fueron detectaron en esos experimentos: glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (*glpD*), acetato cinasa (*ackA*), y cistein sintetasa (STY2666).

6.8 La membrana interna es un sitio activo de rearrreglo proteico en la exposición al deoxicolato de sodio

De acuerdo con los experimentos de microarreglos, la membrana interna de *S. Typhi* es de los sitios celulares más activos ante la exposición al deoxicolato de sodio. A esta conclusión se llega considerando el número de genes de proteínas de membrana interna que inducen su expresión ante esta sal biliar (Gráficas 1 y 4), siendo además algunos de estos los genes con z-score más elevado de estos experimentos. Teniendo esto en cuenta, se realizó una extracción de proteínas de membrana interna de cultivos en medio LB y LB adicionado con 5% DOC, los extractos fueron sometidos a electroforesis de dos dimensiones en geles de poliacrilamida. Los geles se muestran en la figura 4.

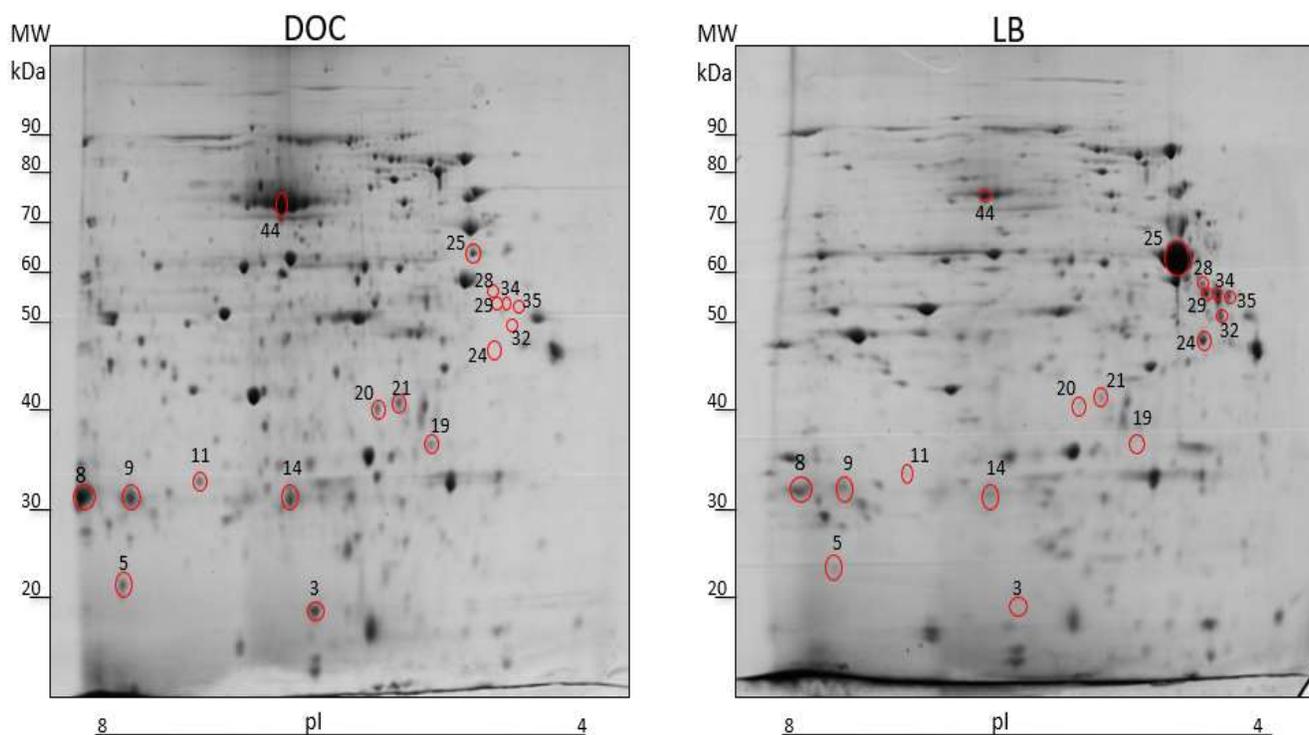


Figura 4. El deoxicolato de sodio al 5% induce expresión diferenciada de proteínas en membrana interna. 2-D PAGE de extractos de membrana interna de cultivos en LB + 5% DOC (izquierda) y LB (derecha).

Se encontraron 59 spots de proteínas en los extractos de membrana interna que se expresan de modo diferencial en función de la presencia o ausencia de deoxicolato de sodio al 5% en el medio de cultivo (Figura 4). De éstas, se seleccionaron 20 spots para identificación. La tabla 9 presenta información sobre las proteínas identificadas seleccionadas.

Tabla 9. Proteínas con expresión diferencial identificadas en extractos de membrana interna de cultivos de *S. Typhi* en LB y LB adicionado con 5% DOC.

Spot	Proteína	Cobertura de secuencia (%)	Abundancia (LB/DOC)	Expresión en DOC	Organismo	Número de Acceso	p.i.	MW (kDa)
3	ATP sintasa subunidad B		0/402.8	+	<i>S. enterica</i>	CDF56136.1	5.3	14.9
5	Terminador/antiterminador NusG		32.1/126.1	+	<i>S. enterica</i>	WP_084543818.1	5.88	20.5
8	F0F1 ATP sintasa subunidad B		430.9/2849.6	+	<i>S. enterica</i>	WP_065311577.1	6	15.7
9	Succinato deshidrogenasa subunidad flavoproteína	34	182.4/630.2	+	<i>S. Anatum</i>	A0A2T8M534_SALAN	5.85	64
11	OmpR	46	27.6/74.6	+	<i>S. enterica</i>	A0A241S875_SALER	5.65	27
12	Proteína no caracterizada YebE	48		+	<i>S. enterica</i>	Q8Z5X6_SALTI		24
14	Deshidrogenasa de cadena corta, parcial		79.1/413.1	+	<i>S. enterica</i>	ELN65997.1	5.37	27.4
17	PhoP	43			<i>S. enterica</i>	PHOP_SALTI		26
19	Oxidoreductasa UcpA		0/24.6	+	<i>S. enterica</i>	WP_079815776.1	4.96	27.9
20	Pirofosfocinasa parcial de ribosafato		93.2/111.8	+	<i>S. enterica</i>	WP_000596756.1	5.05	33.9
21	Acetil-CoA carboxilasa subunidad alfa parcial				<i>S. enterica</i>	KNB36849.1	5.11	29.6
24	Proteína de gancho flagelar FlgE		430.5/0	-	<i>S. enterica</i>	WP_000010563.1	4.75	42.2
25	Flagelina FljC		3350/148.8	-	<i>S. enterica</i>	WP_020438185.1	4.83	53.3
28	Flagelina parcial fase I		179.3/0	-	<i>S. enterica</i>	ABJ99878.1	4.75	47
29	Flagelina familia FljC/FljB		430.8/0	-	<i>S. enterica</i>	WP_000079784.1	4.73	53
32	Transposasa putativa VirE		362.2/0	-	<i>S. enterica</i>	WP_047606251.1	4.68	85.9
34	Flagelina parcial fase I		1110.9/0	-	<i>S. enterica</i>	AAK20804.1	4.69	53
35	Flagelina parcial		288.7/0	-	<i>S. enterica</i>	WP_079916975.1	4.66	41.7
44	Succinato deshidrogenasa subunidad flavoproteína		4391.5/859.7	+	<i>S. enterica</i>	WP_080161761.1	5.4	65
57	Malato deshidrogenasa	54			<i>S. Anatum</i>	A0A2T8MFA1_SALAN		32

6.9 La eliminación de distintos fragmentos del genoma de *S. Typhi* producen diferentes comportamientos ante el deoxicolato de sodio

Con el propósito de determinar qué regiones del genoma de *S. Typhi* contienen genes que son requeridos para la tolerancia y crecimiento en sales biliares, las cepas mutantes con deleciones genómicas enlistadas en la tabla 1 fueron cultivadas en condiciones de deoxicolato de sodio al 5%. Los resultados resumidos en la tabla 10 y las curvas ilustradas en las figuras 5 y 6 indican la existencia de cuatro patrones o grupos de crecimiento. Las cepas clasificadas como “sin fenotipo” crecen de manera paralela con la cepa silvestre (O.D.595 \approx 1.0); las cepas medianamente sensibles alcanzan O.D.595 de hasta 0.6; las cepas sensibles no sobrepasan O.D.595 de 0.2 y la cepa hiperresistente crece a O.D.595 \approx 1.5.

Tabla 10. Grupos de crecimiento en cultivo con DOC al 5% observados en cepas con deleciones de fragmentos genómicos.

Grupo	Cepas
Sin fenotipo	$\Delta F25, \Delta F22, \Delta F41, \Delta F46, \Delta F52, \Delta F55, \Delta F64, \Delta F54$
Medianamente sensible	$\Delta F1, \Delta F31, \Delta F40, \Delta F42, \Delta F43, \Delta F47, \Delta F59$
Sensible	$\Delta F2, \Delta F4, \Delta F14, \Delta F17, \Delta F18, \Delta F19, \Delta F20, \Delta F24, \Delta F28, \Delta F29, \Delta F38, \Delta F73, \Delta F78, \Delta F95, \Delta F107, \Delta F112, \Delta F114$
Hiperresistente	$\Delta F23$

El número de genes contenidos en los fragmentos eliminados en las cepas que son sensibles y medianamente sensibles a deoxicolato de sodio es de 790. Todos estos genes son potencialmente requeridos para contender con las sales biliares hasta que se esclarezca cuáles genes son específicamente responsables del fenotipo descrito para la mutante en el fragmento correspondiente.

De esta observación se sugiere que los elementos genéticos que median la resistencia a sales biliares están ampliamente distribuidos en el genoma y que sus papeles pueden resultar redundantes.

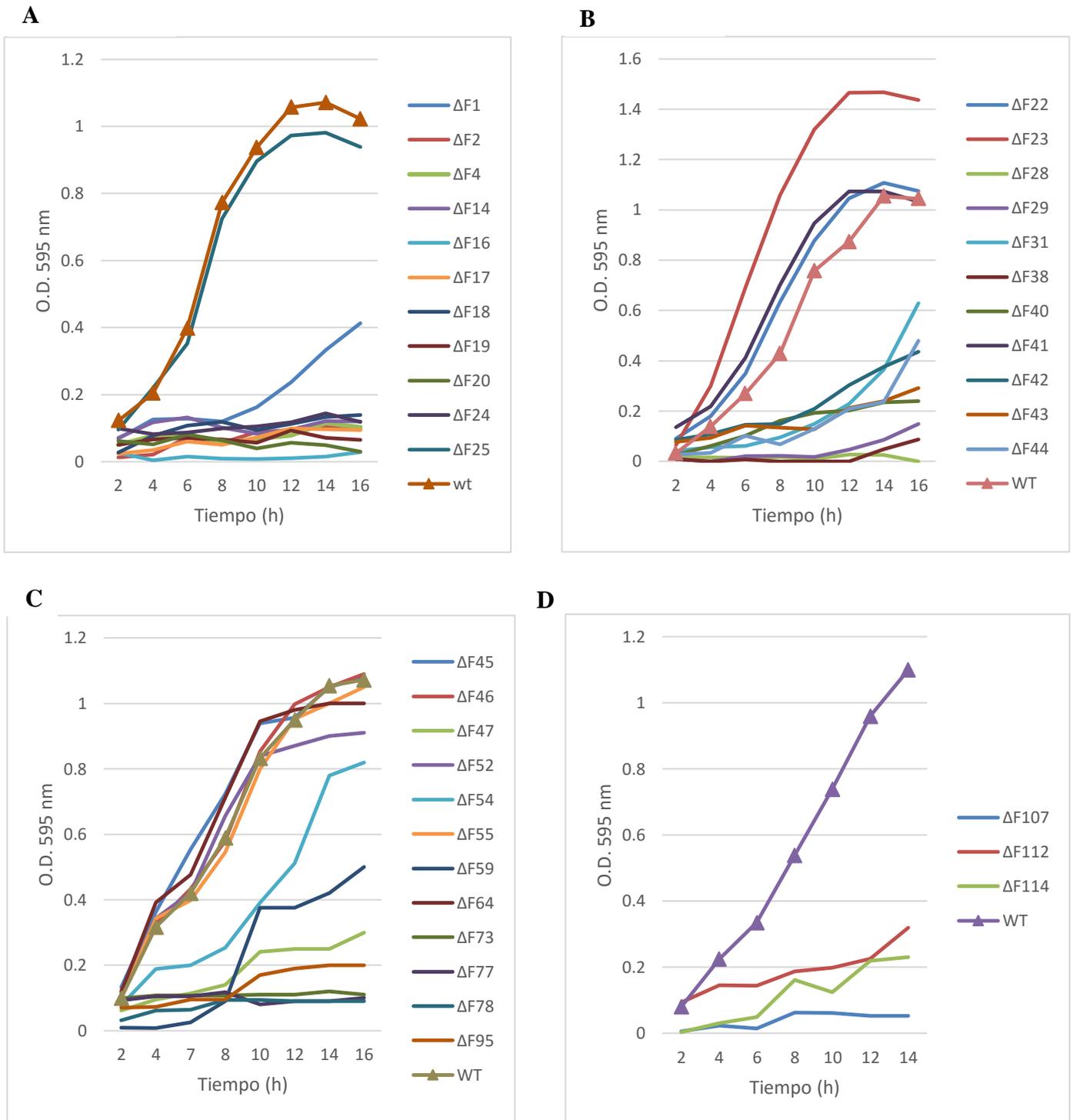


Figura 5. Curvas de crecimiento de cepas mutantes de *S. Typhi* con deleciones de fragmentos genómicos vs la cepa silvestre (WT) **A)** Mutantes en los fragmentos 1-25 menos 22 y 23; **B)** Cepas mutantes en los fragmentos 22, 23, 28-44; **C)** Fragmentos 45-95; **D)** Cepas mutantes en los fragmentos 107, 112 y 114.

6.10 La delección del fragmento 23 produce una cepa de *S. Typhi* hiperresistente a deoxicolato de sodio

La proliferación de la mutante F23 en medio LB con 5% deoxicolato de sodio es superior no solamente a las otras mutantes, sino también a la cepa silvestre (Figura 5, B). Para comprobar que este comportamiento proliferativo sucede solo en presencia de deoxicolato de sodio, se hizo un ensayo de crecimiento de la mutante en medio LB y se comparó con el crecimiento de la cepa silvestre en el mismo medio (Figura 6, B). De esta curva se puede observar que el crecimiento de la mutante F23 en medio LB no es distinto que la cepa WT.

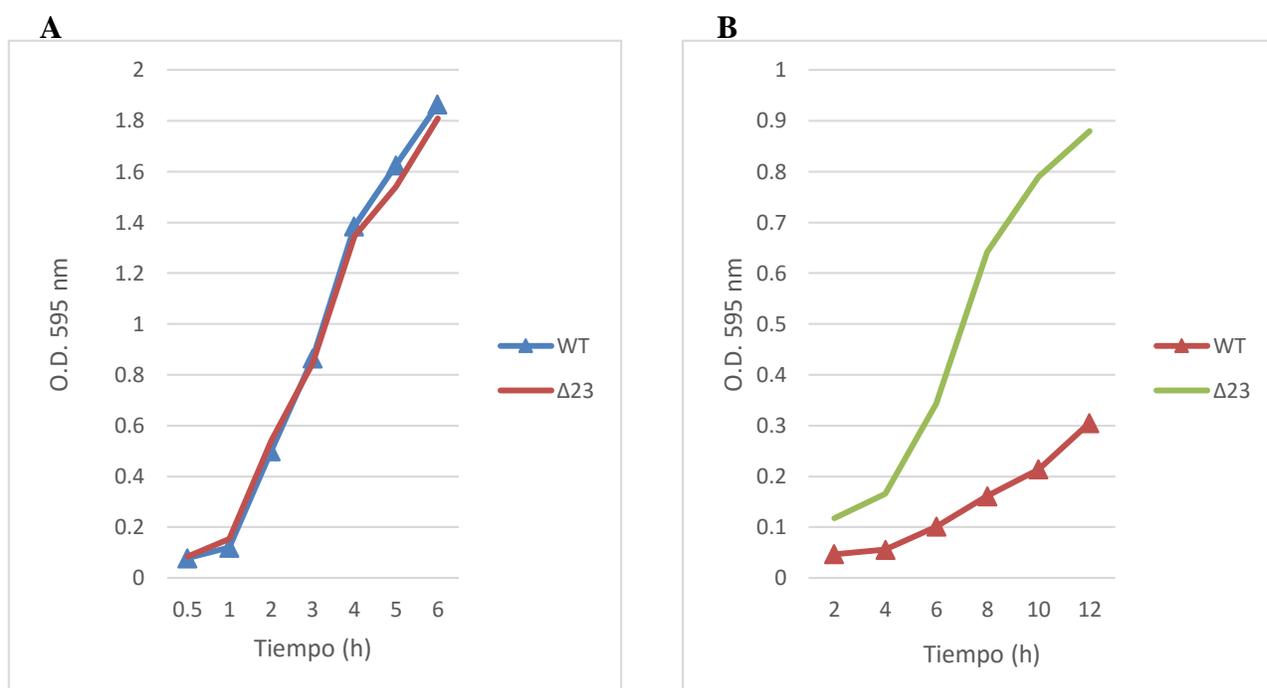


Figura 6. La cepa mutante en el fragmento 23 solamente muestra proliferación acelerada en deoxicolato de sodio y no en medio LB. **A)** Curva de crecimiento de la cepa deficiente en el fragmento 23 vs cepa WT en medio LB, no hay diferencia en el crecimiento; **B)** Curva de crecimiento de la mutante en el fragmento 23 vs cepa WT en medio LB + 7.5% DOC, la mutante tolera mejor la sal biliar y prolifera mejor que la silvestre.

Sin embargo, cuando se ensayó simultáneamente la capacidad de crecimiento de la mutante F23 y la cepa silvestre en medio LB adicionado con deoxicolato de sodio al 7.5% (curva 7 fig B), la cepa $\Delta F23$ resultó ser nuevamente más resistente que la silvestre. A las 12 horas la mutante F23 registró una densidad óptica del cultivo cercana a 0.9, mientras que al mismo tiempo el cultivo de la cepa silvestre estaba a una densidad óptica de 0.3.

El fenotipo hiperresistente observado en la cepa $\Delta F23$ es debido a la remoción del gen *asmA* contenido en este fragmento. Se ha reportado previamente la hiperresistencia a deoxicolato de sodio de mutantes en el gen *asmA*, que codifica para la proteína de membrana externa AsmA, ante el deoxicolato de sodio (101).

7. Discusión

A diferencia de las células de organismos pluricelulares que se encuentran formando parte de tejidos en un medio interno de condiciones fisiológicas reguladas, las células bacterianas están expuestas a cambios bruscos en las condiciones ambientales que las rodean, ya sea en el medio externo o en el interior de un organismo hospedero, donde existen barreras químico-físicas y mecanismos de inmunidad inespecíficos destinados a impedir la colonización por microorganismos patógenos y el establecimiento de infecciones. Para contender con tales hostilidades, las bacterias deben contar con los recursos genéticos que les permitan tolerar, adaptarse y proliferar en estas condiciones. Para *Salmonella Typhi*, agente etiológico de la fiebre tifoidea, una de las presiones de selección más importantes que enfrenta en su ciclo de vida dentro del hospedero humano es la presencia de bilis. En este trabajo se describen elementos genéticos que este patógeno puede tener a su disposición para sobrellevar los efectos bactericidas del deoxicolato de sodio - la sal biliar humana más abundante.

Los estudios transcriptómicos de este trabajo proveen información sobre el tipo de perfil de expresión genómico al que *S. Typhi* puede recurrir cuando es obligada a crecer en la matriz de un ambiente que contiene sales biliares. Los factores de transcripción son una de las categorías más relevantes en las que se observa un cambio de expresión inducible por deoxicolato de sodio (gráfica 1), esto podría justificarse tentativamente con la idea de que la resistencia a bilis es un fenómeno complejo que involucra la respuesta de diversas estructuras celulares, vías de señalización y rutas metabólicas, y que tales cambios deben ser orquestrados por un variado repertorio de reguladores de la transcripción.

Entre aquellos genes de reguladores en los que se observó respuesta transcripcional positiva al deoxicolato de sodio está *ompR*, cuyo producto OmpR es requerido para activar la

transcripción de los genes de las porinas OmpC y OmpF, la primera de las cuales es indispensable para la tolerancia a la sal biliar (83). La inducción de la expresión de los genes *envZ* y *yjgB* (*mzrA*) resulta evidencia complementaria al papel de OmpR en este fenómeno, puesto que MzrA modula la actividad de EnvZ, y a su vez la histidin cinasa EnvZ fosforila OmpR (88), siendo el estado fosforilado de Omp- (OmpR-P) el principal regulador de la expresión de proteínas de membrana externa (89).

Asimismo, se detectó que el gen *phoP* es expresado a nivel transcripcional (tabla 3) y traduccional (tabla 9), corroborando lo descrito en investigaciones anteriores (65,72). Se sabe que la delección del gen *phoP* resulta en un fenotipo sensible a deoxicolato de sodio (65), y se especula que el regulón del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ contribuya a la supervivencia en sales biliares al provocar remodelación del lípido A en el LPS (64, 66). Además, este sistema de dos componentes regula la expresión de ciertos genes de metabolismo central y respiración (65, 70).

Adicionalmente, la observación de que la transcripción de los genes *sarA*, *sdiA*, *crp*, y *fnr* es estimulada por la presencia de deoxicolato de sodio en el medio de cultivo (tabla 3) complementa los resultados obtenidos por nuestro grupo que demuestran que cepas mutantes en estos mismos genes (en adición a *fur*, *soxR* y *fis*) tienen un fenotipo sensible al deoxicolato (datos no publicados). Lo anterior sugiere fuertemente que los reguladores transcripcionales ArcA, SdiA, Crp y fnr son estimulados directa o indirectamente por la sal biliar, y que sus regulones podrían estar implicados en mecanismos que llevan a *Salmonella* Typhi a sobrevivir y replicarse en su presencia. No obstante, la determinación de la actividad transcripcional del gen reportero CAT de fusiones transcripcionales a las regiones reguladoras de *arcA*, *crp*, *fur*, *luxS*, *soxR* y *fis* realizadas en este trabajo no presentan evidencia que sustente la idea de que el deoxicolato de sodio estimule su transcripción.

En este estudio se reportó que BasR es uno de los reguladores que responde a deoxicolato de sodio incrementando su nivel de transcripción (tabla 3), lo cual concuerda con un estudio similar en *Escherichia coli* donde se determinó que también las sales biliares inducen expresión del locus *basR* en ese microorganismo (90). El producto traduccional BasR regula la expresión del operón *amBCADTEFD*, cuyos miembros son responsables de la síntesis y transferencia de 4-amino-4-deoxi L-arabinosa (L-ara4N) al lípido A (91). Esta modificación

resulta en resistencia incrementada a péptidos catiónicos antimicrobianos (CAMPs), como las polimixinas, en particular polimixina B (PMB) (90). Sin embargo, aunque la incorporación de L-ara4N al lípido A es esencial para tolerar PMB en *E. coli* y *Salmonella*, no confiere resistencia a las sales biliares (65).

Se puede argumentar, entonces, que a pesar de que *basR* es activado por el deoxicolato de sodio, no es transcrito con la finalidad de contender con éste sino con otra presión de selección que coexiste junto a la bilis en el mismo ambiente en el tracto digestivo del hospedero: la polimixina B. De esta forma, *S. Typhi* podría utilizar a las sales biliares como señales ambientales que le permiten echar a activar mecanismos para contender con retos que encuentra de manera simultánea a la bilis.

Es probable que los elementos de envoltura celular sean los que tengan un papel mejor esclarecido en la tolerancia a sales biliares. Después de todo, las estructuras que la componen entran en contacto directo con la bilis y sirven de barrera directa ante sus componentes. El daño a las membranas es uno de los principales efectos perniciosos de las sales biliares (49), y mantener su integridad es crítica para la supervivencia. En este trabajo se presenta evidencia de que ante la exposición a deoxicolato de sodio la envoltura celular de *S. Typhi* experimenta cambios en sus componentes estructurales que resultan en un estado adaptado y resistente a este agente.

Los ensayos de microarreglos muestran que entre las proteínas de membrana externa que son expresadas por deoxicolato de sodio al 5% se encuentran las porinas OmpC y OmpF (tabla 5). Esto podría resultar contradictorio con reportes previos, en los que se determinó que OmpC y OmpF son reprimidas por deoxicolato de sodio a la misma concentración (64) o en presencia de bilis (92). La justificación que plantean estos autores consiste en que una menor expresión de estas porinas resultaría en una disminución de la cantidad de sales biliares que son internalizadas hacia el citosol (64). No obstante, OmpC juega un papel fundamental en la tolerancia a deoxicolato de sodio; se sabe que cepas de *S. Typhi* mutantes en *ompC* son sensibles a esta sal biliar (83). Respaldando a esta afirmación, estudios de la cascada de regulación de *ompC* en *S. Typhi* han demostrado que la perturbación de genes de elementos reguladores de *ompC* producen fenotipos intolerantes a deoxicolato de sodio, acompañados de perfiles de porinas modificados. Tal es el caso del regulador maestro de

las porinas OmpR, que es regulado a su vez por el regulador tipo LysR LtrR (STY0036); las cepas mutantes $\Delta ompR$ $\Delta ltrR$ no crecen en medio LB suplementado con deoxicolato de sodio al 5% y sus perfiles de porinas en medio LB muestran ausencia de OmpC y OmpF (83). LtrR es necesario para la correcta síntesis de todas las isoformas de OmpC en cantidades adecuadas.

La regulación de las porinas, sin embargo, es aún más fina. El sistema CRISPR-Cas, que originalmente es asociado con función inmunológica en bacterias frente a invasiones por bacteriófagos, funge como regulador de proteínas de membrana externa en *Salmonella Typhi*. Se trata de una regulación indirecta a través de OmpR, que culmina con la expresión de OmpC y OmpF. Por lo tanto, las mutantes en el sistema CRISPR-Cas son sensibles al deoxicolato de sodio al 5% y no exhiben las porinas OmpC y OmpF en su membrana (datos no publicados).

El lipopolisacárido (LPS) enterobacteriano es un prominente componente de la envoltura celular. Es un glicolípido complejo que puede dividirse estructuralmente en tres porciones: el lípido A es el componente hidrofóbico que ancla el resto de la estructura a la membrana externa y que a su vez está ligado al oligosacárido *core* compuesto de residuos de azúcar no repetitivos. La parte más distal del LPS está constituida por el antígeno O, una cadena polisacárida compuesta de unidades de oligosacárido repetidas (93). El empaquetamiento estrecho entre moléculas de LPS en la superficie celular sirve como una efectiva barrera física impermeable a muchos compuestos tóxicos (93).

En relación a la interacción con sales biliares, el papel protector del LPS queda demostrado en *E. coli*, donde mutantes en el gen *waaQ* son hipersensibles a agentes hidrofóbicos, incluyendo bilis, dodecil sulfato de sodio (SDS) y novobiocina (94). Los genes del clúster *waa* codifican enzimas que sintetizan los constituyentes del oligosacárido *core* que típicamente contiene residuos de ácido 3-deoxi-D-mano-octulosónico (Kdo), heptosa (Hep), glucosa (Glc), galactosa (Gal) y sustituyentes fosfato. WaaF y WaaC adicionan de manera secuencial Hep a Kdo₂-Lípido A; WaaP y WaaY adicionan grupos fosfato al primer y segundo residuos de Hep. Mientras, WaaQ añade la tercer Hep al segundo residuo Hep, mismo residuo al que WaaG le adhiere el primer residuo Glc; WaaB adiciona un residuo Gal al primer residuo Glc, mientras que WaaO y WaaR añaden el segundo y tercer residuo

Glc al primero y finalmente WaaU adiciona el cuarto residuo Hep al tercer residuo Glc (94). En nuestros estudios transcripcionales se registra que varios genes de este clúster muestran un incremento en actividad transcripcional cuando *S. Typhi* es cultivada en presencia de deoxicolato de sodio al 5% - *waaQ*, *waaG*, *waaB* y *waaY*. Análogamente, en un ensayo donde se evaluó la esencialidad de cada gen del genoma de *S. Typhi* de un banco de mutantes por inserción transposómicase reportó que de los diez genes *waap* presentes en *S. Typhi*, ocho fueron requeridos para el crecimiento en presencia de hiel de buey y los dos restantes fueron esenciales. Sus mutantes desprovistas de *waaL*, *waaK* y *waaI* mostraron la diferencia más grande en el número de inserciones entre cultivos en presencia y ausencia de bilis (72).

La esencialidad de los genes *waa* en la supervivencia en sales biliares puede sugerir que el LPS podría encontrarse un estado dinámico de constante renovación mientras la exposición a estas sustancias continúe, y que por lo tanto la célula necesite de niveles de expresión elevados en estos genes.

Adicionalmente, en este trabajo se reporta que el gen *lpxB* que codifica para sintetasa de disacárido de lípido A -un intermediario en la síntesis de lípido A del lipopolisacárido- es transcripcionalmente activado por deoxicolato de sodio al 5%. Nuevamente, esta actividad transcripcional podría interpretarse como un mecanismo de reparación del LPS ante los efectos perniciosos del deoxicolato de sodio. Sin embargo, también se registra el mismo efecto para el gen *yciM* (tabla 4), que modula la producción de LPS a través de la inhibición de LpxC, otra enzima de la vía biosintética de lípido A. Inactivación de *yciM* resulta una sobreproducción de LPS y muerte celular de *E. coli* (95), esto nos puede llevar a hipotetizar que aún en un estado de estrés de envoltura celular en el que se necesita un acelerado recambio de estructuras expuestas a daño, se requiere de mecanismos que regulen la biosíntesis de los mismos.

Otro componente de la membrana externa que está implicado en mediar la tolerancia a la bilis es el antígeno común enterobacteriano (ECA), que es un glicolípidido presente en la capa externa de la membrana cuyas cadenas de polisacárido consisten en unidades lineales repetitivas de un trisacárido compuesto de 4-acetamido-4,6-dideoxi-D-galactosa (Fuc4NAc), ácido N-acetil-D-manosaminurónico (ManNAcA) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc)

(96). El ECA está presente en todas las membranas de bacterias Gram-negativas y tiene una estrecha relación estructural con el LPS (95, 96) y cuya síntesis está mediada por los genes del clúster *wec* (96).

Se ha demostrado que en *Salmonella Typhimurium* mutantes en los genes *wecD* y *wecA* no crecen en deoxicolato de sodio como consecuencia de la ausencia de ECA (69). Nuestros ensayos de microarreglos en *S. Typhi* informan que el gen *wecF*, miembro de este clúster de biosíntesis de ECA es activado transcripcionalmente en presencia de deoxicolato de sodio al 5% (tabla 4), sugiriendo que la integridad de ECA puede verse afectada por deoxicolato, y que su reparación podría ser requerida para mantener la integridad de la membrana externa ante las sales biliares.

El daño a ECA provocado por las sales biliares puede ofrecer una explicación a otro fenómeno observado en *Salmonella Typhi* cuando es crecida en un medio con sales biliares, ya que en este estudio mostramos que el deoxicolato de sodio ejerce un efecto negativo en la síntesis de proteínas flagelares, al estar considerablemente reducidas en LB adicionado con 5% DOC en comparación con el extracto proveniente de medio LB (Figura 5, Tabla 9). La regulación negativa de flagelos y la pérdida de motilidad en *Salmonella* spp. como consecuencia de la interacción con sales biliares se ha documentado anteriormente (97). En *Serratia marcescens* se identificó una relación directa entre alteraciones estructurales de ECA y la pérdida de estructuras flagelares como consecuencia de la represión de *flhDC*, el operón que codifica para el regulador maestro de la cascada de biogénesis flagelar. Esta represión es mediada través del sistema Rcs (regulator of capsule synthesis) (96).

Sin embargo, el ECA no es el único elemento de envoltura celular que induce un arresto a la síntesis flagelar vía activación de Rcs cuando es dañado Spöri *et al* (98) comprobaron que mutantes de *S. Typhimurium* con LPS truncado exhiben defectos de motilidad originados por represión de genes flagelares por el sistema Rcs. Las mutaciones que generaron el fenotipo de LPS truncado en ese estudio corresponden a $\Delta waaL$, $\Delta waaG$ y $\Delta waaD$, del clúster *waa* discutido anteriormente. De esta manera, el fenotipo aflagelar que se observa en *S. Typhi* cuando ha sido expuesta a las sales biliares parece ser la consecuencia de señales desencadenadas por estrés en la envoltura celular, probablemente bajo la lógica de conservación energética en ambientes hostiles donde la bacteria debe centrar sus esfuerzos

en adaptarse y sobrevivir. Sin embargo, también puede concebirse como una estrategia para pasar desapercibida por el sistema inmunológico del hospedero, en cuyo caso constituiría un ejemplo más del uso de sales biliares como señales que desencadenan reacciones fisiológicas destinadas a la adaptación de la bacteria al ambiente dentro de su hospedero (97).

Una proporción considerable de los genes que son activados por deoxicolato de sodio son codificantes para proteínas que se ubican en una localización celular específica: la membrana interna (Gráfica 1). Considerando que las proteínas embebidas en la membrana interna pueden constituir ~20-30% del proteoma de las bacterias Gram-negativas (99), esta proporción tiene sentido. Esto se puede traducir en un gran potencial de respuesta y plasticidad ante fenómenos que comprometan el equilibrio entre la célula y su entorno.

No resulta sorprendente que durante un proceso de agresión a la envoltura celular como es la exposición a sales biliares se requiera de la participación activa de elementos proteicos en las membranas, de los cuales la membrana interna posee mayor número y diversidad en comparación con la membrana externa (100). Algunas de las proteínas de membrana interna que revelan los análisis transcripcionales en este estudio tienen funciones predichas, entre las que dominan los transportadores como *yrbE* (transportador de fosfolípidos), o *nupG* (transportador de nucleósidos). Estos transportadores de membrana interna pueden proveer información sobre el estado de la actividad metabólica en el cultivo con deoxicolato de sodio y sobre posibles mecanismos involucrados en la tolerancia a la sal biliar, según el tipo de especies químicas que transporten. Por ejemplo, *yrbE* (*mIaE*) está involucrado en el transporte retrógrado de fosfolípidos desde la membrana externa hacia la membrana interna con la finalidad de mantener la asimetría entre las membranas. La expresión incrementada de este gen en cultivo con deoxicolato de sodio podría sugerir que se requiere de mecanismos que aseguren que durante el recambio de moléculas dañadas de LPS se mantenga esta asimetría y que no incremente la proporción de moléculas de fosfolípidos en la hoja externa, manteniendo una barrera continua de LPS.

Sin embargo, la mayoría de estos genes de membrana interna son considerados como codificantes para proteínas hipotéticas, que no están caracterizadas y cuya función es aún desconocida. Dentro de este contexto resulta relevante mencionar que la membrana interna

es un sitio crítico para la mediación de la respuesta celular de las bacterias a estímulos del ambiente. En ella se localizan proteínas involucradas en la transducción de señales como las histidin cinasas de sistemas de respuesta de dos componentes, que detectan cambios en el ambiente e inician mecanismos de relevo de señales, que culminan con una respuesta fisiológica normalmente adaptativa ante la señal externa. Suponer que algunas de las proteínas hipotéticas y no caracterizadas de membrana citoplásmica que se expresan en función de la presencia de deoxicolato de sodio puedan tener un papel en la transducción de señales desencadenadas por el contacto de las sales biliares con la membrana es posible, y establecer tales funciones podría resultar de utilidad en la comprensión de este fenómeno.

Con la intención de observar el patrón diferencial de expresión proteica ocasionado por deoxicolato de sodio a nivel de membrana interna predicho por los análisis transcripcionales, se llevó a cabo un protocolo de purificación de proteínas que permita obtener algunas proteínas de la membrana citosólica. Este estudio reveló cerca de 60 proteínas cuya expresión está condicionada por deoxicolato de sodio a la concentración de 5%, visibles en la figura 5. La identificación de las proteínas seleccionadas (tabla 9) muestra que algunos de los casos de regulación por deoxicolato de sodio más contundentes corresponden por un lado a proteínas flagelares – que como ya se ha mencionado son reprimidas por esta sal biliar – y por otro, a enzimas de metabolismo central como subunidades de los complejos succinato deshidrogenasa y ATP sintasa, malato deshidrogenasa y acetil-CoA carboxilasa, de expresión inducida por deoxicolato de sodio.

Parece conveniente resaltar que la incrementada expresión de subunidades del complejo succinato deshidrogenasa por la presencia de deoxicolato de sodio fue detectada también por los experimentos de microarreglos (*sdhA*, *sdhH* y *sdhC*) y que la identificación de subunidades de este complejo enzimático en el extracto de membrana interna confirma que los genes se expresan y traducen. Paralelamente, los genes de las subunidades de ATP sintasa (*atpB*, *atpF*, *atpH*, *atpA*) también experimentan actividad transcripcional incrementada por deoxicolato de sodio de acuerdo con los datos de microarreglos. Los productos de estos genes fueron también hallados en el extracto proteico. Este cambio en la expresión de ATP sintasa puede explicarse como un esfuerzo de *S. Typhi* para producir una mayor cantidad de energía en forma de ATP que pueda ser invertida en el

acondicionamiento de la célula en estas condiciones, y cubrir el gasto energético que representa sintetizar porinas, bombas de expulsión, LPS, ECA y mecanismos de reparación de material genético.

Otras proteínas identificadas en el extracto fueron PhoP, OmpR, y YebE. La inducción de las primeras dos confirmó datos transcripcionales de este trabajo. Evidencia experimental de otros estudios demuestran que mutantes de fenotipos sensibles a deoxicolato de sodio son reguladores de respuesta de sistemas de dos componentes, mientras que YebE es una proteína de membrana interna de función aún no esclarecida.

En *Salmonella Typhi*, la red de elementos genéticos responsables de la reacción celular al deoxicolato de sodio es amplia y compleja. Esta afirmación queda ilustrada al analizar el número, tipo y distribución de genes potencialmente involucrados en este fenómeno biológico, que sugieren los resultados de la evaluación de crecimiento de las cepas mutantes enlistadas en la tabla 1 en medio adicionado con 5% deoxicolato de sodio. El crecimiento en este experimento puede clasificarse de manera general en tres categorías: aquellos fragmentos genómicos cuya delección produce un fenotipo sensible a deoxicolato de sodio; aquellos cuya delección no tiene efecto o es de influencia muy leve en la capacidad para crecer en deoxicolato de sodio y fragmentos en los que la delección respectiva resulta en un fenotipo hiperresistente. De éstos, los fragmentos responsables de cepas sensibles son los más abundantes, seguidos de las mutantes neutras, mientras que sólo hubo un fragmento que ocasiona hiperresistencia cuando es mutado.

A partir de estos datos se puede inferir que los elementos genéticos con posibles papeles en la resistencia a las sales biliares pueden ser muy numerosos y encontrarse ampliamente distribuidos en el genoma. En efecto, los fragmentos deletados que produjeron mutantes sensibles suman 727,846 pares de bases que contienen aproximadamente 608 genes, la gran mayoría de los cuales no habían sido relacionados con el fenómeno de tolerancia a sales biliares.

La mutación del fragmento 23 da lugar a una cepa con la particularidad de ser notablemente más resistente a los efectos bactericidas del deoxicolato de sodio que la cepa silvestre (figura 6). El fragmento 23 contiene el gen *asmA*. En *Salmonella Typhimurium* el gen

asmA codifica para la proteína de membrana externa AsmA; las cepas mutantes en *asmA* tienen una resistencia incrementada a deoxicolato de sodio (101). Los autores de ese estudio determinaron que la falta de AsmA ocasiona la activación transcripcional del operón *marRAB*, que a su vez controla el llamado “regulón Mar” el cual ha sido previamente ligado con la tolerancia a bilis (92, 101, 102). Además, se ha observado que la transcripción del operón *marRAB* es activada por bilis de manera dosis-dependiente en *S. Typhimurium* (97). Asimismo, la falta de AsmA suprime la sensibilidad a deoxicolato de sodio de mutantes de *phoP*, *wec* y *dam* (DNA adenina metiltransferasa). Por lo tanto, el efecto hiperresistente a deoxicolato de sodio que produce la mutación de AsmA es capaz de restaurar la resistencia de mutantes sensibles.

De manera interesante, las causas de intolerancia biliar de las mutantes de *phoP*, *wec* y *dam* son diversas y no guardan relación aparente (61, 69, 103). Otro caso vagamente similar es descrito por Prieto (61): mutantes de los genes *mutH*, *mutL* y *mutS* del sistema de reparación de apareamiento erróneo MutHSL que son capaces de reestablecer la resistencia a bilis de mutantes en *dam*. No obstante, fuera del fondo genético Δdam las mutantes de sistema MutHSL no confieren mayor resistencia a sales biliares.

A partir de estas observaciones se sugiere que ningún sistema molecular ha evolucionado con el propósito específico de conferir resistencia a las sales biliares. Más bien, la resistencia a sales biliares consiste en un conjunto interconectado de respuestas celulares que llevan a la célula a adquirir cierto estado o condición de *fitness* que aminora el daño inflingido por estos agentes, y que requiere mantener una constante inversión energética mientras la exposición continúe.

En la figura 7 se resumen las principales respuestas celulares de *S. Typhi* ante el deoxicolato de sodio al 5% observadas en este estudio.

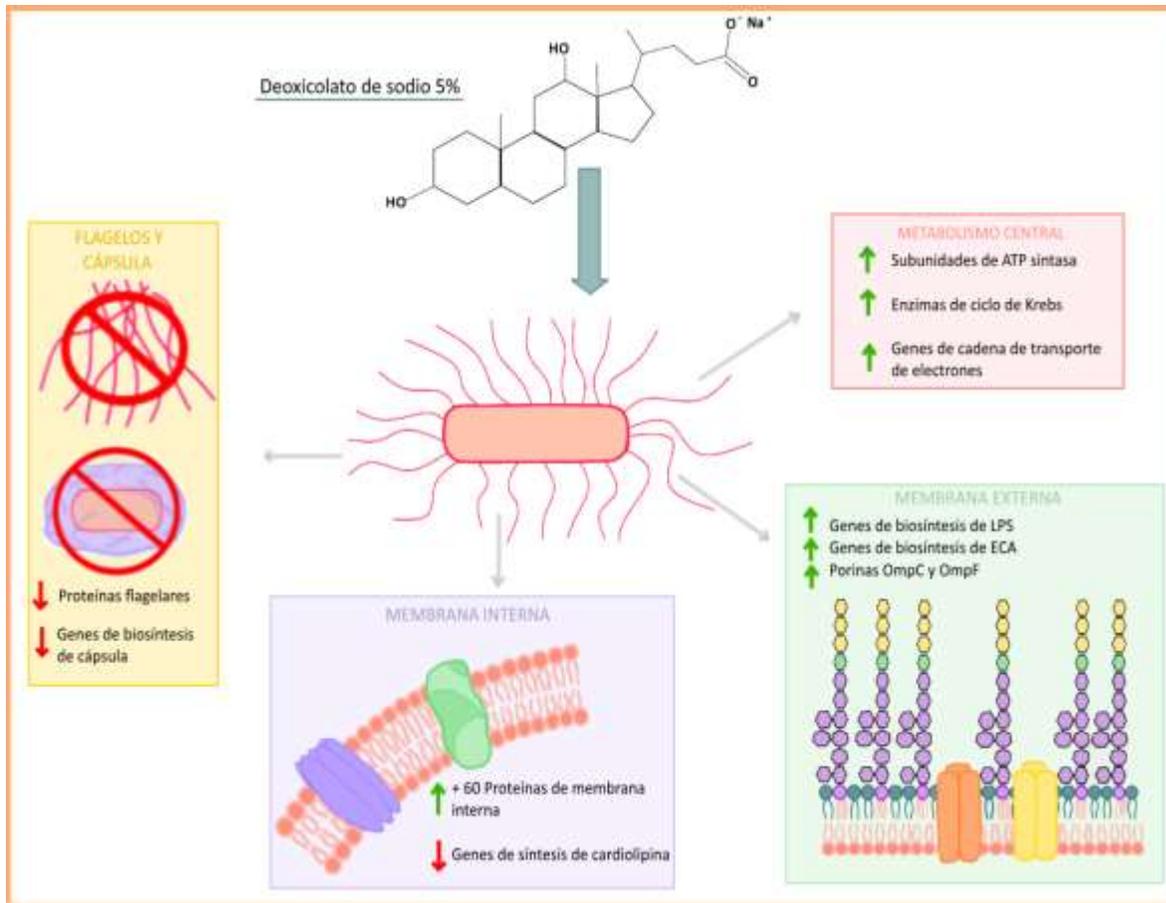


Figura 7. Principales respuestas celulares en *S. Typhi* ante la presencia de 5% de deoxicolato de sodio. El deoxicolato de sodio reprime la síntesis de proteínas flagelares, produciendo un fenotipo deficiente en flagelos. Asimismo la expresión de genes de biosíntesis de cápsula, notablemente *tviA*, son reprimidos. El perfil proteico de la membrana interna experimenta un cambio que se hace evidente en la síntesis de más de 60 proteínas, que incluyen transportadores, enzimas, elementos de transducción de señales y proteínas hipotéticas. Además, la composición lipídica de la membrana interna parece ser afectada con la represión de genes de síntesis de cardiolipina. Genes de elementos estructurales de membrana externa como LPS y ECA son inducidos por el deoxicolato de sodio, como es el caso de los genes del clúster *waa*. La síntesis de porinas es también inducida. La síntesis de enzimas involucradas en procesos centrales de metabolismo se ve inducida por deoxicolato de sodio. Creación propia.

8. Conclusiones

- 1) La composición proteica de la membrana interna se ve afectada por el deoxicolato de sodio y constituye un sitio dinámico que le brinda a la célula plasticidad para contender ante condiciones del medio externo; la membrana interna es un sitio de primera importancia para mediar la interacción entre las sales biliares y la célula.
- 2) En presencia de deoxicolato de sodio, *S. Typhi* suprime gastos energéticos prescindibles, como la síntesis de flagelos, para dar prioridad a procesos metabólicamente costosos que sustentan el estado competente ante el reto de las sales biliares.
- 3) El deoxicolato de sodio constituye una señal ambiental que ocasiona que todas las principales estructuras celulares, vías metabólicas y procesos fisiológicos en *S. Typhi* sean sujetos a ajustes y adaptación, dando lugar a un estilo de vida y estado celular competente frente a este agente.
- 4) Los genes que intervienen en los procesos de adaptación, tolerancia y supervivencia en sales biliares en *S. Typhi* están distribuidos ampliamente por el genoma, tienen distintos niveles de relevancia y juegan papeles redundantes en este fenómeno.
- 5) La eliminación de determinados genes mejora la capacidad de *S. Typhi* para crecer en deoxicolato de sodio.

9. Perspectivas

A pesar de que en *E. coli* *S. Typhimurium* se ha establecido la importancia de los genes *waa* en la resistencia a sales biliares, no existen estudios equivalentes en *S. Typhi*. Generar mutantes de este clúster y estudiar el perfil de LPS, lípidos de membrana, flagelos y porinas, así como determinar la actividad transcripcional de elementos del sistema *rcs* podría ser de interés. Caracterizar el clúster y definir si es regulado y transcrito como operón, además de explorar posibles reguladores transcripcionales junto con la medición de la actividad transcripcional de fusiones de estos genes en deoxicolato de sodio podría generar información útil adicional.

Determinar cuáles son los genes que son indispensables para la supervivencia en deoxicolato de sodio dentro de los 600 candidatos contenidos en los fragmentos del banco de mutantes es otra tarea que posiblemente rinda pistas interesantes, aunque abrumadora y de utilidad cuestionable.

Generar mutantes de los reguladores y genes de proteínas de membrana interna identificados en este estudio y evaluar la capacidad de crecimiento en deoxicolato de sodio, así como otros estudios relacionados es una buena aproximación para confirmar la esencialidad de éstos.

10. Referencias

1. Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F (2013) The Prokaryotes. Springer Science & Business Media. 375-391
2. Oldach DW, Richard RE, Borza EN, Benitez RM (1998) A mysterious death. *N Engl J Med* 338:1764–1769
3. Halliday, S (2001) Death and miasma in Victorian London: an obstinate belief. *BMJ*. 323:1469
4. Louis PCA (1836) Anatomical, pathological and therapeutic researches upon the disease known under the name of gastro-enterite putrid, adynamic, ataxic, or typhoid fever, etc.; Compared with the most common acute diseases. Issac R. Butts, Boston
5. Gaffky G (1884) Zur Ätiologie des Abdominaltyphus. *Mitteilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt* 2:372–420
6. Grunbaum AS (1904) Report LXXXIII: some experiments on enterica, scarlet fever, and measles in the chimpanzee: A preliminary communication. *Br Med J* 1:817–819
7. Achard C, Bensaude R (1896) Infections paratyphoidiques. *Bulletin et Memoires de la Societe de Medicine des Hotitaux de Paris* 13:820–833
8. Drigalski V (1904) Ueber Ergebnisse bei der Bekämpfung des Typhus nach Robert Koch. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten* 35:776–798
9. Scallan E, *et al* (2011) Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg Infect Dis* 17:7–15
10. Paul UK, Bandyopadhyay A (2017) Typhoid fever: a review. *Int J Adv Med* 4:300-306
11. Crump JA, Luby SP, Mintz ED (2004) The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Organ* 82:346–353

12. Crump JA, Ram PK, Gupta SK, Miller MA, Mintz ED (2008) Part I. Analysis of data gaps pertaining to *Salmonella enterica* serotype Typhi infections in low and medium human development index countries, 1984-2005. *Epidemiol Infect* 136:436–448
13. Koneman E, Allen V, Dowel V, Sommers H (1998) *Diagnóstico Microbiológico*. Editorial Médica Panamericana. 359-360.
14. Bhunia AK (2007) *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*. Springer Science & Business Media. 201-2016
15. Le Minor L, Popoff MY (1987) Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom.rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Bacteriol* 37:465–468
16. Reeves MW, Evins GM, Heiba AA, Plikaytis BD, Farmer JJ III (1989) Clonal nature of *Salmonella* Typhi and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J Clin Microbiol* 27:313–320
17. Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B (2000) *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol* 38:2465–2467
18. Tindall BJ, Grimont PA, Garrity GM, Euzéby JP (2005) Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:521–524
19. Khoureih M, Schlesinger M, Tabachnik E, Bibi H, Armoni M, Pollak S (1989) Typhoid fever diagnosed by isolation of *S. Typhi* from gastric aspirate. *Acta Paediatr Scand* 78:653–655
20. Gilman RH, Hornick RB (1976) Duodenal isolation of *Salmonella* Typhi by string capsule in acute typhoid fever. *J Clin Microbiol* 3:456–457
21. Benavente L, Gotuzzo E, Guerra J, Grados O, Guerra H, Bravo N (1984) Diagnosis of typhoid fever using a string capsule device. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78:404–406
22. Farooqui BJ, Khurshid M, Ashfaq MK, Khan MA (1991) Comparative yield of *Salmonella* Typhi from blood and bone marrow cultures in patients with fever of unknown origin. *J Clin Pathol* 44:258–259

23. Hoffman SL, Punjabi NH, Rockhill RC, Sutomo A, Rivai AR, Pulungsih SP(1984) Duodenal string-capsule culture compared with bone-marrow, blood, and rectal-swab cultures for diagnosing typhoid and paratyphoid fever. *J Infect Dis* 149:157–161
24. Heinzinger NK, Fujimoto SY, Clark MA, Moreno MS, Barrett EL (1995) Sequence analysis of the *phs* operon in *Salmonella* Typhimurium and the contribution of thiosulfate reduction to anaerobic energy metabolism. *J Bacteriol* 177:2813–2820
25. Huang CJ, Barrett EL (1991) Sequence analysis and expression of the *Salmonella* Typhimurium *asr* operon encoding production of hydrogen sulfide from sulfite. *J Bacteriol* 173:1544–1553
26. Selander RK, Beltran P, Smith NH, Helmuth R, Rubin FA, Kopecko DJ, Ferris K, Tall BD, Cravioto A, Musser JM (1990) Evolutionary genetic relationships of clones of *Salmonella* serovars that cause human typhoid and other enteric fevers. *Infect Immun* 58:2262–2275
27. Tsolis RM, Young GM, Solnick JV, Baumler AJ (2008) From bench to bedside: stealth of enteroinvasive pathogens. *Nat Rev Microbiol* 6:883–892
28. Glynn JR, Palmer SR (1992) Incubation period, severity of disease, and infecting dose: evidence from a *Salmonella* outbreak. *Am J Epidemiol* 136:1369–1377
29. Murphy TF, Gorbach SL (1982) *Salmonella* colitis. *N Y State J Med* 82:1236–1238
30. Alvarado T (1983) Faecal leucocytes in patients with infectious diarrhoea. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77:316–320
31. Khosla SN, Anand A, Singh U, Khosla A (1995) Haematological profile in typhoid fever. *Trop Doct* 25:156–158
32. Abdool Gaffar MS, Seedat YK, Coovadia YM, Khan Q (1992) The white cell count in typhoid fever. *Trop Geogr Med* 44:23–27
33. Dougan B, Baker S (2014) *Salmonella enterica* serovar Typhi and the pathogenesis of typhoid fever. *Annu Rev Microbiol* 68:317–336

34. Karkey A, *et al* (2013) Differentialepidemiology of *Salmonella* Typhi and Paratyphi A in Kathmandu, Nepal: a matched case control investigation in a highly endemic enteric fever setting. PLoS Negl. Trop. Dis. 7(8):e2391
35. Glynn JR, Hornick RB, Levine MM, Bradley DJ (1995) Infecting dose and severityof typhoid: analysisof volunteer data and examination of the influence of the definition of illness used. Epidemiol. Infect. 115:23–30
36. Snyder MJ, Hornick RB, McCrumb FR, Morse LJ, Woodward TE (1963) Asymptomatic typhoidal bacteremia in volunteers. Antimicrob. Agents Chemother. 161:604–7
37. Olsen SJ, *et al* (2003) Outbreaks of typhoid fever in the United States, 1960-99. Epidemiol Infect 130:13–21
38. Nasrallah SM, Nassar VH (1978) Enteric fever: a clinicopathologic study of 104cases. Am J Gastroenterol 69:63–69
39. Parry CM, Hien TT, Dougan G, White NJ, Farrar JJ (2002) Typhoid fever. New Eng J Med347:1770–1782.
40. Gilman RH, Terminel M, Levine MM, Hernandez P, Hornick RB(1975) Relative efficacy of blood, urine, rectal swab, bone-marrow, and rose-spot cultures for recovery of *Salmonella typhi* in typhoid fever. Lancet 1:1211–1213
41. Chow CB, Wang PS, Leung NK (1989) Typhoid fever in Hong Kong children. Aust Paediatr J 25:147–150
42. Yap YF, Puthuchear SD (1998) Typhoid fever in children—a retrospective study of54 cases from Malaysia. Singapore Med J 39:260–262
43. Eng SK, *et al* (2015) *Salmonella*: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. Frontiers in Life Science 8:(3) 284-293
44. Butler T, Knight J, Nath SK, Speelman P, Roy SK, Azad MA (1985) Typhoid fevercomplicated by intestinal perforation: a persisting fatal disease requiring surgical management. Rev Infect Dis 7:244–256
45. Bitar R, Tarpley J (1985) Intestinal perforation in typhoid fever: a historical andstate-of-the-art review. Rev Infect Dis 7:257–271

46. Uba AF, Chirdan LB, Ituen AM, Mohammed AM (2007) Typhoid intestinal perforation in children: a continuing scourge in a developing country. *Pediatr Surg Int* 23:33–39
47. Hofmann AF, Hagey LR (2008) Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 65:2461–83
48. Sarenac TM, Mikov M (2018) Bile acid synthesis: from nature to the chemical modification and synthesis and their application as drugs and nutrients. *Front Pharmacol* <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00939>
49. Urdaneta V, Casadesús J (2017) Interactions between bacteria and bile salts in the gastrointestinal and hepatobiliary tracts. *Front. Med.* 4:163
50. Ridlon JM, Harris SC, Bhowmik S, Kang DJ, Hylemon PB (2016) Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. *Gut Microbes* 7:22–39
51. Ren J, Sun K, Wu Z, Yao J, Guo B (2011) All 4 bile salt hydrolase proteins are responsible for the hydrolysis activity in *Lactobacillus plantarum* ST-III. *J Food Sci* 76:622–8
52. Wijaya A, *et al* (2004) Cloning of the bile salt hydrolase (*bsh*) gene from *Enterococcus faecium* FAIR-E 345 and chromosomal location of *bsh* genes in food enterococci. *J Food Prot* 67:2772–8
53. Kim GB, Yi SH, Lee BH (2004) Purification and characterization of three different types of bile salt hydrolases from *Bifidobacterium* strains. *J Dairy Sci* 87:258–66
54. Mallonee DH, Hylemon PB (1996) Sequencing and expression of a gene encoding a bile acid transporter from *Eubacterium* sp. strain VPI 12708. *J Bacteriol* 178:7053–8
55. Ridlon JM, Hylemon PB (2012) Identification and characterization of two bile acid coenzyme A transferases from *Clostridium scindens*, a bile acid 7-dehydroxylating intestinal bacterium. *J Lipid Res* 53:66–76
56. Ridlon JM, Kang D-J, Hylemon PB (2006) Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* 47:241–59
57. Fukui H (2015) Gut microbiota and host reaction in liver diseases. *Microorganisms* 3:759–91

58. Coleman R, Lowe PJ, Billington D (1980) Membrane lipid composition and susceptibility to bile salt damage. *Biochim Biophys Acta* 599:294–300
59. Fujisawa T, Mori M (1996) Influence of bile salts on β -glucuronidase activity of intestinal bacteria. *Lett Appl Microbiol* 22:271–4
60. Gómez Zavaglia A, Kociubinski G, Pérez P, Disalvo E, De Antoni G (2002) Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria. *J Appl Microbiol* 93:794–9
61. Prieto AI, Ramos-Morales F, Casadesús J (2004) Bile-induced DNA damage in *Salmonella enterica*. *Genetics* 168:1787–94
62. Sanyal AJ, Hirsch JI, Moore EW (1994) Premicellar taurocholate enhances calcium uptake from all regions of rat small intestine. *Gastroenterology* 106:866–74
63. Symeonidis A, Marangos M (2012) Iron and microbial growth. *Insight Control Infect Dis Glob Scenar* 16:289–330.
64. Hernández S, Cota I, Ducret A, Aussel L, Casadesús J (2012) Adaptation and preadaptation of *Salmonella enterica* to bile. *PLoS Genet* 8:e1002459
65. van Velkinburgh JC, Gunn JS (1999) PhoP-PhoQ-regulated loci are required for enhanced bile resistance in *Salmonella* spp. *Infect Immun* 67:1614–22
66. Gunn JS (2012) Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microbes Infect* 2:907–13
67. Picken R, Beacham I (1997) Bacteriophage-resistant mutants of *Escherichia coli* K12 Location of receptors within the lipopolysaccharide. *J Gen Microbiol* 102:305–18
68. Prouty AM, Van Velkinburgh JC, Gunn JS (2002) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium resistance to bile: Identification and characterization of the tolQRA cluster. *J Bacteriol* 184:1270–6
69. Ramos-Morales F, Prieto AI, Beuzon CR, Holden DW, Casadesús J (2003) Role for *Salmonella enterica* enterobacterial common antigen in bile resistance and virulence. *J Bacteriol* 185:5328–32

70. Hernández SB, Ayala JA, Rico-Pérez G, García-del Portillo F, Casadesús J (2013) Increased bile resistance in *Salmonella enterica* mutants lacking Prc periplasmic protease. *Int Microbiol* 16:87–92
71. Hernández SB, Cava F, Pucciarelli MG, García-del Portillo F, de Pedro MA, Casadesús J (2015) Bile-induced peptidoglycan remodelling in *Salmonella enterica*. *Environ Microbiol* 17:1081–9
72. Langridge GC, *et al* (2009) Simultaneous assay of every *Salmonella* Typhi gene using one million transposon mutants. *Genome Res* 19:2308–16
73. Prieto AI, Ramos-Morales F, Casadesús J (2006) Repair of DNA damage induced by bile salts in *Salmonella enterica*. *Genetics* 174:575–84
74. Papenfort K, Espinosa E, Casadesús J, Vogel J (2015) Small RNA-based feedforward loop with AND-gate logic regulates extrachromosomal DNA transfer in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: E4772–81.
75. Fang FC, *et al* (1992) The alternative sigma factor KatF (RpoS) regulates *Salmonella* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11978–82
76. Chen C, Buchmeier NA, Libby S, Fang FC, Krause M, Guiney DG (1995) Central regulatory role for the RpoS sigma factor in expression of *Salmonella dublin* plasmid virulence genes. *J Bacteriol* 177:5303–9
77. Heithoff DM, Enioutina EY, Daynes RA, Sinsheimer RL, Low DA, Mahan MJ (2001) *Salmonella* DNA adenine methylase mutants confer cross-protective immunity. *Infect Immun* 69:6725–30
78. Cano DA, Pucciarelli MG, Garcia-Del Portillo F, Casadesús J (2002) Role of the RecBCD recombination pathway in *Salmonella* virulence. *J Bacteriol* 184:592–5
79. Thanassi DG, Cheng LW, Nikaido H (1997) Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179:2512–8
80. Ma D, Cook DN, Alberti M, Pon NG, Nikaido H, Hearst JE (1995) Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 16:45–55

81. Pos KM (2009) Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump. *Biochim Biophys Acta* 1794:782–93
82. Nikaido E, Yamaguchi A, Nishino K (2008) AcrAB multidrug efflux pump regulation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by RamA in response to environmental signals. *J Biol Chem* 283:24245–53
83. Villarreal J, *et al* (2014) The *Salmonella enterica* serovar Typhi ltrR-ompR-ompC-ompF genes are involved in resistance to the bile salt sodium deoxycholate and in bacterial transformation. *Mol Microbiol.* 925:1005-1024
84. Puente J, Flores V, Fernández M, Fuchs Y, Calva E (1987) Isolation of an ompC-like outer membrane protein gene from *Salmonella* Typhi. *Gene.* 61:75-83
85. Datsenko K, Wanner, B (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:6640-6645
86. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc* 204(1):44-57
87. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 37(1):1-13
88. Forst S, Inouye M (1988) Environmentally regulated gene expression for membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu Rev Cell Biol.* 4:21-42
89. De la Cruz M, Merino E, Oropeza R, Tellez J, Calva E (2009) The DNA static curvature has a role in the regulation of the *ompSI* porin gene in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Microbiology.* 155:2127-2136
90. Kus JV, *et al* (2011) Bile salts induce resistance to polymyxin in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bac* 193:4509-4515
91. Raetz CR, Reynolds CM, Trent MS, Bishop RE (2007) Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem.* 76:295–329
92. Begley M, Sleator RD, Gahan CG, Hill C (2005) Contribution of the three bile-associated loci, *bsh*, *pva*, and *bilB*, to gastrointestinal persistence and bile tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 73:894–904

93. Yethon JA, Vinogradov E, Perry MB, Whitfield C (2000) Mutation of the lipopolysaccharide core glycosyltransferase encoded by *waaG* destabilizes the outer membrane of *Escherichia coli* by interfering with core phosphorylation. *J Bac* 182:5620-5623
94. Møller AK, *et al* (2003) An *Escherichia coli* MG1655 lipopolysaccharide deep-rough core mutant grows and survives in mouse cecal mucus but fails to colonize the mouse large intestine. *Inf Imm* 71:2142-2152
95. Mahalakshmi S, Sunayana MR, Salsree L, Reddy M (2014) *yciM* is an essential gene required for regulation of lipopolysaccharide synthesis in *Escherichia coli*. *Mol Microb* 91:145-157
96. Castelli ME, García-Véscovi E (2011) The rcs signal transduction pathway is triggered by enterobacterial common antigen structure alterations in *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* 193:63-74
97. Prouty AM, Brodsky IE, Falkow S, Gunn JS (2004) Bile-salt-mediated induction of antimicrobial and bile resistance in *Salmonella* Typhimurium. *Microbiology* 150:775–83
98. Spörig I, *et al* (2018) Regulation of flagellum biosynthesis in response to cell envelope stress in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *mBio* e900736-17
99. Krogh A, *et al* (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol.* 305:567–580
100. Bernsel A, Daley DO (2009) Exploring the inner membrane proteome of *Escherichia coli*: which proteins are eluding detection and why? *Trends in microbiol* 17:444-449
101. Prieto AI, *et al* (2009) Roles of the outer membrane protein AsmA in *Salmonella enterica* in the control of *marRAB* expression and invasion of epithelial cells. *J Bacteriol* 191:3615-3622
102. Alekshum MN, Levy SB (1999) The *mar* regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends Microbiol* 7:410-413

103. Murata T, *et al* (2007) PhoPQ-mediated regulation produces a more robust permeability barrier in the outer membrane of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 189:7213-7222
104. El-Khoury M, *et al* (2017) Targeting bacterial cardiolipin enriched microdomains: an antimicrobial strategy used by amphiphilic aminoglycoside antibiotics. *Nature Sci Reports* 7: 10697