



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS
DE *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium ENTRE
LA CEPA SILVESTRE Y UNA CEPA MUTANTE CON
CAPACIDAD DISMINUIDA EN LA INDUCCIÓN DE
MACROPINOCITOSIS Y FAGOSOMAS GIGANTES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA :

ARACELI PÉREZ LÓPEZ



MÉXICO, D.F.

2006



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.

Jurado asignado:

Presidente: Dr. Rodolfo Pastelín Palacios
Vocal: QFB. Alejandro Camacho Cruz
Secretario: Dra. Celia M. Alpuche Aranda
1er sup. Profa. Ruth Edith Martín Fuentes
2do sup. Prof. Luciano Hernández Gómez

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Infectología, Microbiología e Inmunología Clínicas, Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM-HGM.

Asesor: Dra. Celia M. Alpuche Aranda _____

Sup. técnico: M. en C. M. de la Luz Ramírez Aguilar _____

Sustentante: Araceli Pérez López _____

*A mis padres...
... a Maribel...
... a Edgar*

¡Con todo mi amor!

Dedicatorias:

Quiero dedicar este trabajo a mis padres por haberme dado la vida, gracias por todo el amor que me han dado siempre, por su apoyo y confianza. Mil gracias por su ejemplo de lucha, honestidad y superación; ustedes son mi inspiración para ser una mejor persona y seguir luchando día a día. Los amo.

A mi hermana Maribel, por ser un ejemplo de lucha incansable, gracias por tu cariño, por tus consejos, por los momentos que hemos compartido. Te quiero mucho.

A mi hermano Edgar, por ser mi cómplice en muchas cosas, por todos los momentos compartidos, gracias por alegrarme la vida todos los días. Te quiero mucho.

Agradecimientos:

A la Dra. Celia Alpuche Aranda por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo y de esta manera poder crecer académicamente, gracias por su apoyo y la confianza depositada en mí; por ser un ejemplo a seguir.

Quiero agradecer de una manera muy especial al Dr. Miguel Vargas por su apoyo en el desarrollo de este trabajo, sin su ayuda no hubiera sido posible.

Al Dr. Rodolfo Pastelín por la lectura y revisión de este trabajo. Agradezco su apoyo y disponibilidad.

Al Maestro Alejandro Camacho por la lectura y revisión de este trabajo. Sus comentarios enriquecieron este trabajo.

A Mary, quiero agradecerte todo el tiempo dedicado a este trabajo, sin tu ayuda no hubiera sido posible, te doy las gracias no sólo por tu apoyo académico, sino también por tu apoyo moral, gracias por tener las palabras adecuadas en los momentos más difíciles. Gracias por la revisión y comentarios a este trabajo.

Roberto, quiero agradecerte por ser mi amigo y mi maestro. Muchas gracias por iniciarme en el camino de la ciencia, por tu apoyo, tus consejos, tus enseñanzas, tus comentarios y tu ejemplo de superación, que sin duda me hicieron crecer en el aspecto personal y académico. Gracias por la minuciosa revisión a este trabajo.

A Marcia, amiga, muchas gracias por todos los momentos que hemos compartido dentro y fuera del laboratorio, por tener siempre una palabra de aliento, por tu apoyo y tus consejos. Eres una gran persona y un gran ejemplo en el aspecto personal y en el académico.

A Atziri, gracias por el apoyo que me brindaste cuando llegue al laboratorio, por tu ayuda y por tu amistad.

A mis compañeros del laboratorio: Caty, Miguel, Joanna, Julissa, Lolita, Cristy, Aideé y Gina; por su apoyo.

A mis amigas de la facultad: Dolores, Yolanda y Alba por compartir momentos felices y difíciles en la escuela, por escucharme siempre que lo necesite, por su comprensión y apoyo, por creer en mí.

A mis amigos de la preparatoria: Erika, Amel, Joel, Samuel, Juan Manuel y Oscar, hermanos del alma, gracias por todos estos años de amistad, por todos los increíbles momentos que hemos compartido juntos, son un gran apoyo para mí.

A Blanca, gracias por brindarme tu amistad y tu cariño, por todo tu apoyo y comprensión.

A todas las personas que en algún momento de mi vida me han brindado su ayuda y amistad.

ÍNDICE GENERAL:

Contenido	Página
Resumen	1
Introducción	2
Resultados preliminares	12
Justificación	14
Hipótesis	15
Objetivos	15
Materiales y Métodos	
Cepas y medios de cultivo	16
Condiciones de cultivo	16
Extracción de proteínas	17
Determinación de proteínas	20
Electroforesis discontinua desnaturizante (SDS-PAGE)	20
Electroforesis bidimensional	21
Revelado del gel	24
Determinación del intervalo de pH en el gel de IEF	24
Identificación de proteínas	25
Resultados	26
Discusión de Resultados	30
Conclusiones	35
Perspectivas	36
Figuras	37
Referencias	47

INTRODUCCIÓN:

El género *Salmonella* comprende bacilos Gram-negativos, pertenece a la familia de las Enterobacterias y es de crecimiento intracelular facultativo. Actualmente el género *Salmonella* esta constituido por dos especies denominadas; *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori* (WHO, 2003). *Salmonella enterica* incluye 7 subespecies y cada una, a su vez esta subdividida en serotipos o serovares, de acuerdo al tipo de antígeno H (flagelar) u O (somático). De esta manera se han descrito más de 2,375 serovares de *Salmonella*. Todos los serotipos que afectan a humanos se encuentran dentro de la especie de *Salmonella enterica* (Miller, SI. y Pegues, D. 2000).

Salmonella es una bacteria que habitualmente se aloja en el intestino, en consecuencia es el agente causal de diferentes infecciones intestinales, conocidas como salmonelosis. La salmonelosis humana puede dividirse en dos síndromes:

1. La fiebre entérica, que implica una infección sistémica causada por *Salmonella enterica* Serovar Typhi (*S. typhi*), y la fiebre paratifoidea que es patológica y clínicamente similar a la fiebre tifoidea, causada por *Salmonella enterica* Serovar Paratyphi A, B o C.
2. La gastroenteritis, que es la infección más común y es causada por muchos serotipos, entre los más frecuentes se encuentran *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) y *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis (*S. enteritidis*). Este tipo de infecciones puede ser autolimitada por el hospedero y no implica una infección sistémica (WHO, 2003; Calva, E. 2002).

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad van desde gastroenteritis autolimitada, infecciones localizadas como osteomielitis y meningitis, enfermedad sistémica grave hasta un portador crónico asintomático (Miller y col. 1995).

En el humano, *S. typhimurium* causa gastroenteritis autolimitante; sin embargo, en ratón produce una enfermedad sistémica semejante a la fiebre tifoidea humana, por lo que la fiebre tifoidea murina producida por *S. typhimurium* es considerada el modelo estándar para estudiar la patogenia de la fiebre tifoidea humana (Jones, B. y col. 1994).

La fiebre tifoidea es un problema de salud mundial. El impacto real de la enfermedad es difícil de estimar porque en la clínica puede confundirse con otras infecciones febriles. El impacto económico y social de la enfermedad es alto debido a la hospitalización de pacientes con infección aguda y complicaciones asociadas, además de la pérdida de ingresos atribuidos a la duración de la enfermedad. Adicionalmente se ha reportado aparición de cepas multirresistentes a los antibióticos empleados en la profilaxis y tratamiento de esta infección, incluyendo brotes con gran impacto en morbilidad (WHO, 2003).

En el año 2000 la incidencia de la fiebre tifoidea en zonas endémicas (Ver Fig. 1), ha sido estimada en aproximadamente 17 millones de casos y 600,000 muertes asociadas cada año. En Asia y África la mayoría de los casos ocurren en personas entre los 3 y 19 años de edad, por ejemplo, en Indonesia se reportan aproximadamente 900,000 casos por año con alrededor de 20,000 muertes. En Papua, Nueva Guinea se reporta una situación similar (WHO, 2003). En Sudamérica, la incidencia de la fiebre tifoidea es baja en niños menores de 3 años; en esta área el pico de incidencia ocurre en edad escolar entre los 5 y 19 años y en adultos mayores de 35 años. En México, en los últimos 20 años la tasa de fiebre tifoidea ha disminuido considerablemente, sin embargo, los datos la Dirección General de Epidemiología muestran que la tasa de fiebre tifoidea por cada 100,000 habitantes en el año 2000 fue de 7.59, en el año 2001, de 7.47, en el año 2002 de 7.7, en el 2003 de 19.4 y en el 2004 de 24.63. Estos datos indican claramente que a pesar de todos los esfuerzos, la fiebre tifoidea es una enfermedad que permanece como endémica en nuestro país, y que en cualquier momento puede incrementar el número de casos provocando brotes. En países desarrollados como Estados Unidos (USA), la enfermedad está prácticamente erradicada, sin embargo; las personas que viajan a las zonas endémicas y que

regresan a USA provocan hasta 800 casos al año es decir, son una causa importante de infecciones en viajeros (Miller, SI. y Pegues, D. 2000).



Fig.1 Distribución geográfica de la fiebre tifoidea (WHO. 2003)

Entre el 1 y 5% de los pacientes alrededor del mundo con infección aguda han sido reportados como portadores crónicos de la infección en vesícula biliar, dependiendo de la edad, sexo y régimen de tratamiento. (WHO, 2003).

El diagnóstico de la fiebre tifoidea se da cuando el agente causal se aísla a partir de una muestra de sangre, médula ósea, orina, materia fecal o bilis. Este se puede confirmar mediante la detección de anticuerpos específicos contra la bacteria en el suero del paciente (Bhan, MK. 2005). La prueba de Widal identifica anticuerpos aglutinantes contra los antígenos O (somático) y H (flagelar) de *S. typhi*, los cuales aparecen 7 a 10 días después de iniciada la enfermedad (Widal, FM. 1986). Sin embargo, la sensibilidad y especificidad de esta prueba no es totalmente confiable debido a que existe reacción cruzada con otros epítomos de bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, además en pobladores sanos de zonas endémicas se ha observado la presencia de títulos de anticuerpos contra *Salmonella*, haciendo difícil la diferenciación entre individuos sanos, enfermos y portadores asintomáticos (WHO, 2003; Bhan, MK. 2005)

La estrategia para la prevención de la fiebre tifoidea involucra la limpieza del agua y alimentos, higiene personal y una sanitización apropiada, además de la implementación de vacunas.

Las principales vacunas contra *S. typhi* son la del polisacárido Vi y la Ty21a (Bhan, MK. 2005), sin embargo; existen varios problemas con estas vacunas. La vacuna viva atenuada de la mutante Ty21a es efectiva en áreas endémicas, pero no esta aprobada para su uso en niños menores de 6 años, además requiere de la aplicación de tres a cuatro dosis. Por otra parte, la vacuna Vi esta aprobada para niños mayores de dos años y una dosis de Vi provee una protección similar a la que provee la vacuna Ty21a, pero su protección sólo dura de 2 a 3 años (Klugman, KP. 1996), por lo tanto, la mayor desventaja de estas vacunas es que carecen de la inducción de inmunidad a largo plazo. Además los resultados de protección en zonas endémicas han sido controversiales (Miller, SI.; Pegues, D. 2000). Por otra parte todas las vacunas comercialmente disponibles son contra *S. typhi* y no existen vacunas contra otros serotipos, que de existir, tendría un gran impacto en medicina veterinaria y en la industria avícola. Lo anterior demuestra que estamos lejos de tener una vacuna ideal contra las infecciones por *Salmonella* y que es necesario incrementar el conocimiento sobre los mecanismos de virulencia, patogenicidad e inmunológicos en la interacción de esta bacteria con el hospedero.

La fisiopatogenia de la infección por *Salmonella* se inicia cuando la bacteria entra por vía oral al organismo, por ingestión de agua o alimentos contaminados con la bacteria. Las condiciones ácidas del estómago reducen la dosis infectiva de la bacteria, lo cual sugiere que el pH ácido del estómago representa la primera barrera contra la infección. Sin embargo, *Salmonella* muestra una respuesta de tolerancia al medio ácido (Ohl, M. y col. 2004). *S. typhimurium* emplea varios mecanismos para evadir o reparar daño asociado al estrés ácido, los dos principales han sido denominados respuestas de tolerancia a ácido (RTA), estas son clasificadas en base a la fase de crecimiento en la cual son inducidas. En estudios de RTA en la fase logarítmica se ha observado que cerca de 50 proteínas de choque ácido son producidas durante esta respuesta. Los genes *rpoS* y *fur* son requeridos para la RTA en fase logarítmica y el control de la producción de las proteínas de choque ácido (Foster, JW. 1991).

Posteriormente, la bacteria pasa por duodeno, yeyuno hasta alcanzar el ileón terminal donde invade células M para alcanzar a los folículos de las placas de Peyer, donde infecta células mononucleares para diseminarse a órganos del sistema retículo endotelial (nódulos linfáticos, hígado, bazo y médula ósea) (Jones, B. y col. 1994).

En el modelo murino, utilizando a *Salmonella typhimurium* se ha descrito que esta bacteria invade selectivamente células M. Además, la invasión de *Salmonella* a células M está acompañada por la desaparición de microvellosidades en la zona de contacto entre la bacteria y la célula hospedera (Jones, B. y col. 1994). La entrada de *Salmonella* a enterocitos es diferente a la endocitosis mediada por receptores comúnmente descrita para bacterias como *Yersinia* y *Listeria*, en el caso de *Salmonella* se ha denominado macropinocitosis (MPC). (Ohi, M. y col. 2001; Cossart, P. y col. 2004), caracterizada por una serie de rearrreglos en el citoesqueleto inducidos por proteínas efectoras de la bacteria, evento que es seguido de un ondulado de la membrana celular denominado “*ruffling*” con la consecuente internalización de la bacteria (independiente de endocitosis mediada por receptor), que queda en el interior de una vacuola gigante (macropinosoma).

La macropinocitosis es una forma de endocitosis, y se refiere a la formación de vesículas endocíticas primarias, largas e irregulares debida al cierre de lamelipodios generados por un ondulado de la membrana celular, denominado “*ruffling*” (Nichols, BJ. 2001). La macropinocitosis es distinta de otras vías de entrada previamente caracterizadas como es la micropinocitosis, que incluye endocitosis de moléculas pequeñas dependiente e independiente de receptores y vesículas pequeñas cubiertas con clatrina (Swanson, JA.; Watts, C. 1995). La cascada de señalización que induce macropinocitosis involucra a las GTPasas de la familia Rho, las cuales activan la polimerización de actina en la membrana celular, generando grandes vesículas endocíticas, llamadas macropinosomas, que acarrean grandes volúmenes de medio extracelular (Conner, S.; Schmid, S. 2003).

Los macropinosomas son estructuras dinámicas que frecuentemente se mueven hacia el interior de la célula, hasta aproximarse al núcleo de la misma, persisten por aproximadamente 5 a 20 minutos, la membrana de este macropinosoma

generalmente se encuentra constituida por componentes similares a los de la membrana plasmática (Nichols, BJ. 2001).

Debido a que los macropinosomas son relativamente grandes (mayores a 2 μm), estos proveen de una ruta de endocitosis no selectiva para macromoléculas, lo cual ha sido aprovechado por algunos patógenos para invadir a la célula, (Swanson, JA y col. 1995), un ejemplo de ello es *Salmonella* (Alpuche-Aranda, CM. 1994).

Salmonella typhimurium induce “ruffling” en el macrófago e ingresa en un macropinosoma para formar posteriormente un fagosoma gigante, que persiste en el citoplasma y constituyen un nicho perfecto para la sobrevivencia de la bacteria dentro del macrófago. Mediante videomicroscopia se ha observado que *S. typhimurium* induce macropinocitosis en los primeros 2 minutos de contacto con la célula, el fagosoma naciente es formado entre 2 y 6 minutos después del contacto bacteria-célula. Así mismo se ha observado que algunos fagosomas se fusionan con otros fagosomas o con macropinosomas (Alpuche-Aranda C. 1994).

En los últimos años muchas investigaciones sobre *Salmonella* se han enfocado principalmente en identificar cuales son los genes y los mecanismos moleculares de esta bacteria involucrados en la entrada, replicación, persistencia e inducción de la respuesta de la célula eucariótica.

El análisis de la estructura genética de patógenos bacterianos revelan que varios genes de virulencia se encuentran frecuentemente agrupados y localizados en regiones del cromosoma denominadas islas de patogenicidad. Las islas de patogenicidad contienen múltiples genes funcionalmente relacionados, que son necesarios para un fenotipo de virulencia específico (Ohl, M. y Miller, SI. 2001). Por ejemplo, la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (Del inglés “*Salmonella* Pathogenicity Island”. SPI-1), codifica genes necesarios para la invasión a células epiteliales.

De este modo numerosos genes de *S. typhimurium* que se han identificado son expresados o requeridos para la entrada de la bacteria a células epiteliales.

Algunos de estos genes de virulencia se encuentran codificados en la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI-1), localizada en el centrisoma 63 de la bacteria. En esta isla se encuentra contenido un sistema de genes reguladores y efectores compuesto por *inv*, *hil*, *prgHIJK* y *syr*. Los genes *invABC* fueron los primeros genes de SPI-1 clonados y se observó que bacterias mutantes que carecían de estos genes fueron atenuadas en su virulencia, debido a su defecto en la invasión a células epiteliales (Galán, JE. y Curtiss, R. 1989).

Las proteínas efectoras de SPI-1 inducen diversos cambios en la célula del huésped, como alteración de funciones de transducción de señales, arquitectura del citoesqueleto, el tránsito intracelular y la expresión de genes que codifican para citocinas. Todas estas alteraciones hacen permisible a la célula para la invasión bacteriana y el establecimiento de un nicho intracelular que le permitirá a la bacteria replicarse (Ohl, M. y Miller, SI. 2001).

Las proteínas SopE y SptP son dos proteínas efectoras codificadas por SPI-1, cuyo blanco son las proteínas Rho que incluye a Cdc42, Rac1 y Rho, las cuales juegan un papel central en la regulación de la polimerización del citoesqueleto de actina; SopE y SptP inducen rearrreglos dramáticos en el citoesqueleto de actina de la célula hospedera (Hardt, WD. 1998). Además, SipA y SipC, otros efectores de la SPI-1, se unen directamente con actina y promueven la formación del “*ruffling*” en la membrana celular (Ohl, M. y Miller, SI. 2001). También se han identificado proteínas efectoras de la SPI-1 involucradas en la inducción de respuestas inflamatorias y de secreción de fluidos en el intestino, una de ellas es SopB, quien además de participar en la inflamación y secreción de fluidos es capaz de estimular el reclutamiento de células polimorfonucleares (PMNs) en el sitio de la infección (Darwin, K. y Miller, V. 1999).

Por otra parte, la isla de patogenicidad 2 de *Salmonella* (SPI-2), contiene genes necesarios para la replicación intracelular en macrófagos, que intervienen en la maduración de la vacuola que contiene a *Salmonella* (SCV), evitando la fusión fagolisosomal (Buchmeier N 1991), y la acción de los efectores microbicidas en macrófagos (Ochman, H. y col. 1996). Además, estos genes están involucrados en el establecimiento de la infección sistémica en el modelo murino de fiebre tifoidea

(Ohl, M. y col. 2001). Los efectores de *Salmonella* codificados en SPI-1 y en SPI-2 son translocados del citoplasma bacteriano a la célula eucariótica a través de un sistema de secreción de tipo tres (SSTIII).

Los serotipos de *Salmonella* que causan fiebre entérica pueden sobrevivir y replicarse en el interior de los macrófagos del hospedero (Alpuche-Aranda, Cm. 1995), y de esta manera establecer una infección sistémica. Durante la residencia de *Salmonella* en el macrófago la bacteria esta expuesta a microambientes adversos tales como deprivación de nutrientes, acidificación del medio y mecanismos microbicidas del macrófago. Estos mecanismos microbicidas incluyen la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, así como péptidos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas. *Salmonella* es capaz de censar el ambiente fagosomal y activar mecanismos de virulencia que le permiten resistir y evadir los mecanismos microbicidas del macrófago (Alpuche-Aranda, CM. 1992; Vázquez-Torres, A. 2000; Bader MW. y col. 2005).

Salmonella es capaz de censar su microambiente mediante un sistema de dos componentes, denominado PhoP/PhoQ que se encuentra codificado en el locus *phoP* y fue primeramente identificado en *S. typhimurium* como regulador de la expresión de una fosfatasa ácida no específica (Miller, SI. y Mekalanos, J. 1989). En este sistema la proteína PhoQ es un sensor de cinasas localizado en la membrana interna, el cual responde a estímulos como concentraciones bajas de Ca^{2+} y Mg^{2+} (García-Vescovi, E. y col. 1996), así como a pH ácido (Alpuche-Aranda, CM. 1992). Por otra parte, PhoP es un activador transcripcional (Ohl, M. y col. 2001). El sistema PhoP/PhoQ controla la expresión de más de 40 genes de *S. typhimurium*, induciendo la expresión de genes llamados genes activados por PhoP (*pags*), y reprimiendo la expresión de otros genes denominados genes reprimidos por PhoP (*prgs*). Los *pags* son expresados cuando la bacteria se encuentra dentro del fagosoma; 3 a 4 horas después de la internalización de la bacteria por el macrófago, y son requeridos para su sobrevivencia dentro del mismo (Alpuche-Aranda, CM. 1992).

Se ha observado que mutantes de *Salmonella* en el sistema PhoP/PhoQ tales como la mutante nula en *phoP* (carente del gen *phoP*: *phoP*⁻), y la mutante

constitutiva en *phoP* (*phoP^c*, en la que la expresión de los genes *pags* esta constitutivamente encendida y los genes *prgs* tienen el máximo de represión), son altamente atenuadas en su virulencia y tienen defecto en su replicación y sobrevivencia dentro de macrófagos (Miller, SI. y Mekalanos J. 1989), lo cual demuestra que la regulación de la expresión de los genes *pags* y *prgs* son importantes para la virulencia de *Salmonella* .

La activación del regulón PhoP desencadena una serie de modificaciones en los componentes proteicos y del lipopolisacárido de la membrana interna y externa de la bacteria (Ohl, M. y Miller, SI. 2001). Estas modificaciones en la superficie de la bacteria promueven que *Salmonella* sobreviva a ambientes estresantes dentro del fagosoma, en parte debido a la adquisición de resistencia a la actividad de los péptidos antimicrobianos. La activación de los genes de PhoP promueven la resistencia a los péptidos antimicrobianos mediante la catálisis de reacciones que hacen modificaciones covalentes del lípido A, un componente del lipopolisacárido. Estas modificaciones impiden la inserción de los péptidos antimicrobianos en la membrana externa de la bacteria por la alteración en la fluidez de la membrana y densidad de carga en la superficie (Guo, L. y col. 1998). Además, estas modificaciones al lípido A resultan en la producción de moléculas de lipopolisacárido con un potencial proinflamatorio significativamente menor (Ohl, M. y Miller, SI. 2001).

Durante el estudio de inducción de macropinocitosis, se observó que la mutante de *Salmonella*, *phoP^c* es capaz de inducir este fenotipo en mucho menor proporción que la cepa silvestre; además de ser defectuosa en la formación de fagosomas gigantes. Debido a que la cepa *phoP^c* sobrevive menos dentro de macrófagos con respecto a la cepa silvestre, se pensó que la formación de fagosomas gigantes es un mecanismo importante para la sobrevivencia de *Salmonella* y en consecuencia de su patogenicidad (Alpuche-Aranda, C. 1994). Dado el fenotipo que presenta la cepa mutante *phoP^c* se podría sugerir que los genes *prgs* están implicados en la inducción de macropinocitosis y la formación de fagosomas gigantes (Alpuche-Aranda, C. 1994). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que la cepa mutante en los genes *prgHIJK* (genes que están relacionados con la invasión a células epiteliales), así como también mutantes en

los genes *hil* e *invA*, codificados dentro de SPI-1, específicamente, inducen macropinocitosis y formación de fagosomas gigantes de igual manera que la cepa silvestre (Alpuche-Aranda, CM. 1995). Estos resultados indican que genes *prgs* diferentes a los *prgHIJK* están implicados en la inducción de macropinocitosis y fagosomas gigantes; o bien, que se trate de otro(s) locus genético(s) diferente(s), que no estén relacionados con el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ. Es decir la inducción de macropinocitosis en macrófagos parece estar regulada genéticamente de manera diferente de lo que ocurre en la invasión a células epiteliales.

A la fecha no hay datos en la literatura que demuestren el descubrimiento de nuevas proteínas efectoras de *Salmonella* involucradas en la inducción de macropinosomas y fagosomas gigantes en macrófagos.

Resultados preliminares:

En trabajos previos hechos en el laboratorio se construyó un banco de 2000 mutantes, realizando mutaciones al azar en genes que codifican para proteínas de membrana externa y proteínas secretadas, utilizando el transposón *TnphoA*. De este banco se tomaron las primeras 500 mutantes y fueron analizadas para identificar aquellas deficientes en la inducción de macropinocitosis y formación de fagosomas gigantes. En este análisis se identificaron 3 cepas denominadas 627::*TnphoA*, 628::*TnphoA* y 1284::*TnphoA* que tenían deficiencia en la inducción del fenotipo ya mencionado comparada con la cepa silvestre; lo cual las hizo candidatas a estudios posteriores de sobrevivencia en macrófagos murinos y ensayos de citotoxicidad. En estas cepas; la disminución de la capacidad de inducción de macropinocitosis y formación de fagosomas gigantes correlaciona con la sobrevivencia intracelular y la citotoxicidad a macrófagos murinos (Ramírez-Aguilar, ML. 2004).

Posteriormente se comprobó la inserción de *TnphoA* por análisis tipo “*Southern Blott*” en el cromosoma de las cepas mutantes seleccionadas, y se encontró que la mutante 1284::*TnphoA* tiene una sola inserción de dicho transposón, por lo que se considero esta mutante para hacer estudios de virulencia (Ramírez-Aguilar, ML. 2004).

Por otra parte, estudios *in vivo* en el modelo murino de fiebre tifoidea mostraron que la cepa 1284::*TnphoA* es menos virulenta que la cepa silvestre y que la cepa mutante coloniza hígado y bazo en menor proporción con respecto a la cepa silvestre (Corona-Romero, A. 2005). Lo anterior sugiere fuertemente que la inducción de macropinocitosis y formación de fagosomas gigantes son fenotipos relacionados con virulencia en el modelo murino ya que la interrupción de un gen involucrado en estos fenotipos disminuye también la virulencia para producir fiebre tifoidea.

Con la secuenciación de 400 pb del gen de *Salmonella* interrumpido por el transposón *TnphoA* se pudo identificar que el gen presenta un 98% de similitud con un gen *phsA* de *S. typhimurium* LT2 (Urbán-Reyes, ML. 2005).

Las proteínas son macromoléculas de suma importancia que pueden funcionar como moléculas efectoras, de señalización o de regulación en todo sistema biológico, por ello; se consideró que el análisis de la expresión de proteínas de la cepa mutante 1281::Tn*phoA* comparada con la cepa silvestre será de suma importancia para conocer más sobre los factores implicados en la inducción de macropinocitosis y formación de fagosomas gigantes, mismos que nos llevarán a un mejor entendimiento de la patogenia de la infección por *Salmonella*.

RESUMEN:

El género *Salmonella* comprende bacilos Gram negativos, de crecimiento intracelular facultativo, que producen un amplio espectro de enfermedades dependiendo de la especificidad de serotipo y su relación con el hospedero. La fiebre tifoidea humana es producida por *Salmonella typhi*, por otra parte *S. typhimurium* solamente causa gastroenteritis autolimitante en humano; sin embargo, en ratón produce una enfermedad sistémica semejante a la fiebre tifoidea humana, por lo que la fiebre tifoidea murina producida por *S. typhimurium* es considerada como el modelo estándar para estudiar la patogenia de fiebre tifoidea humana. La fisiopatogenia de la infección por *Salmonella* se inicia mediante la entrada de la bacteria por vía oral al organismo; posteriormente pasa al lumen del intestino delgado distal, y a través de los enterocitos o células M de la mucosa intestinal, llega a las placas de Peyer donde es fagocitada por los macrófagos y diseminada a bazo, hígado, médula ósea. La entrada de *Salmonella* a enterocitos es diferente a la endocitosis mediada por receptores, debido a que ésta se caracteriza por inducir movimientos de membrana conocidos como "ruffling"; que favorece la formación de vacuolas de considerable tamaño que se denominan macropinosomas (MPC), en consecuencia *Salmonella* puede ser internalizada por medio de estos macropinosomas, mejor conocidos como fagosomas gigantes (FG).

Previamente se realizó mutagénesis aleatoria en el cromosoma *S. typhimurium* con el transposón *TnphoA* que tiene capacidad de insertarse en genes que codifican para proteínas de membrana externa. Se encontró que la cepa denominada 1284::*TnphoA* tiene una sola inserción de éste transposón y mostró una disminución en su capacidad de inducir MPC y FG, así mismo se observó que dicha mutante fue menos virulenta (DL_{50} 1000 veces mayor) que la cepa silvestre, fue menos tóxica y sobrevivió menos en macrófagos con respecto a la cepa silvestre. Recientemente nuestro grupo de trabajo identificó que el gen interrumpido por el transposón *TnphoA* en el genoma de *S. typhimurium* codifica para la proteína PhsA con función de oxidoreductasa.

En este trabajo nos proponemos comparar la expresión de proteínas entre *S. typhimurium* cepa silvestre y cepa mutante 1284::*TnphoA* para identificar si hay una o más proteínas afectadas por la inserción de *TnphoA* en el gen *phsA*.

Para ello se obtuvieron extractos de proteínas totales, de membrana externa, periplásmicas y secretadas de *S. typhimurium* tanto de la cepa silvestre como de la cepa 1284::*TnphoA*, las proteínas se purificaron y cuantificaron. Los diferentes extractos se sometieron a separación electroforética convencional en geles SDS-PAGE con la finalidad de analizar de manera general el patrón de expresión de proteínas de los diferentes extractos. Para hacer más evidentes los cambios en el patrón de expresión proteico se realizó una electroforesis bidimensional según el método de O'Farrell (1975). Los mapas proteómicos obtenidos muestran una clara diferencia en la expresión de proteínas totales entre *S. typhimurium* cepa silvestre y 1284::*TnphoA* debida a la inserción del transposón *TnphoA* en el gen *phsA*. Son aproximadamente 15 las proteínas que se expresan diferencialmente entre las dos cepas, la mayoría de ellas tienen un peso molecular de entre 20 y 50 KDa. Las diferencias más notables en la expresión de proteínas se encuentran en las proteínas del espacio periplásmico y en las proteínas secretadas, no así en las proteínas de membrana externa. La identificación mediante MALDI-TOF de una de las proteínas periplásmicas que aparece en la cepa mutante indica que se trata de la proteína STM1 499 de *S. typhimurium* LT2, cuya función es de una dimetil sulfóxido reductasa. Las proteínas PhsA y STM1 499 tienen actividad de oxido-reductasa, esto sugiere que estas proteínas pueden jugar un papel importante en la inducción de macropinocitosis y fagosomas gigantes, en consecuencia en la virulencia y patogénesis de *Salmonella*.

JUSTIFICACIÓN:

A la fecha la fiebre tifoidea sigue siendo un problema de salud pública en países en vías de desarrollo, y México no es la excepción. Aún cuando se han diseñado programas de prevención mundiales, estos no han sido suficientes para evitar brotes de fiebre tifoidea y otras salmonelosis. Además se reportan cada vez con más frecuencia cepas de *Salmonella typhi* y no *typhi* resistentes a los antibióticos usados convencionalmente en el tratamiento de esta infección. Por otra parte, las vacunas existentes contra *Salmonella* no proveen de una protección prolongada por lo que hay necesidad de revacunaciones periódicas que han dado resultados controversiales en zonas endémicas de fiebre tifoidea. Debido a estas razones, es muy importante continuar con estudios sobre las bases moleculares de la patogenia de esta infección; lo cual proporcionará nuevo conocimiento, que permitirá elaborar estrategias de prevención, diagnóstico y tratamiento más eficientes.

Los macrófagos son el blanco principal de *Salmonella*; éstos son infectados a través de la inducción de macropinosomas (MP) y fagosomas gigantes (FG), este fenotipo requiere de la participación de proteínas producidas y secretadas por la bacteria. Se sabe que estas no están codificadas dentro de las Islas de Patogenicidad de *Salmonella* 1 y 2, sugiriendo que las proteínas implicadas en la inducción de este fenotipo se encuentran en otra región genética del cromosoma bacteriano.

Estudios preliminares demostraron que una inserción del transposón Tn*phoA* (cepa 1284::Tn*phoA*), disminuye notablemente la inducción de MP y FG así como su virulencia. A la fecha sólo se sabe que el gen interrumpido codifica para la proteína PhsA de *S. typhimurium* LT2, sin embargo su papel en la inducción de MP y FG no es claro, es por ello que consideramos que el estudio de la expresión de proteínas totales, de membrana externa, periplásmicas y secretadas de la cepa 1284::Tn*phoA* en comparación con la cepa silvestre aportará información necesaria para saber si hay otra(s) proteína(s) involucrada(s) en la inducción de MPC y FG, conocimiento que ayudará a comprender mejor los factores implicados en la inducción de este fenotipo, así mismo nos llevará a tener un mejor entendimiento de la patogenia de la infección por *Salmonella*.

HIPÓTESIS:

El análisis de la expresión de diferentes extractos proteicos de la cepa mutante de *Salmonella typhimurium* 1284::*TnphoA* comparado con los extractos proteicos de la cepa silvestre proporcionaran evidencia acerca de la participación de alguna(s) proteína(s) implicada(s) en la inducción de macropinocitosis y formación de fagosomas gigantes.

OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar el perfil de expresión de diferentes extractos de proteínas de la cepa mutante de *S. typhimurium* denominada 1284::*TnphoA* comparando con la cepa silvestre.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.- Describir el perfil de expresión de proteínas totales, periplásmicas, de membrana externa y secretadas de la cepa mutante (1284::*TnphoA*) y la cepa silvestre de *S. typhimurium* mediante electroforesis SDS-PAGE.
- 2.- Describir el perfil de peso molecular y punto isoeléctrico de las proteínas totales, periplásmicas, de membrana externa y secretadas de la cepa mutante (1284::*TnphoA*) y la cepa silvestre de *S. typhimurium*.
- 3.- Identificar una o más proteínas que se expresen de manera diferencial en ambas cepas de *Salmonella*

MATERIALES Y MÉTODOS:

Cepas y medios de cultivo:

Como cepa silvestre (CS), se usó a *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) ATCC 14028 con virulencia completa y la cepa mutante con disminución en la inducción de MPC y formación de FG *S. typhimurium* 1284::Tn*phoA*. Como controles se utilizaron *S. typhimurium* con mutación constitutiva en PhoP (*phoP^c*), donada por el Dr. Samuel I. Miller (University of Washington, Seattle, USA), la mutante en efectores de SPI-2 *S. typhimurium*::*SpIC*, donada por el Dr. Eduardo A. Groisman (University of Washington, San Louis Missouri, USA) y la mutante en la formación en la aguja del SST III codificado en SPI-1 *S. typhimurium* Δ *prgH*, donada por el Dr. Samuel I. Miller (University of Washington, Seattle, USA). .

Condiciones de cultivo:

El crecimiento de las bacterias en medio líquido se realizó en medio Luria Bertani (LB), adicionado con 25 μ g/mL de kanamicina (Kn) (Sigma-Aldrich) para las cepas 1284::Tn*phoA* y *S. typhimurium*::*SpIC*. El crecimiento se realizó a 37°C, con agitación de 40 rpm (aerofilia), en un agitador Roller Bellco Glass Inc. hasta que se alcanzo la fase logarítmica [ajuste de inóculo por espectrofotometría mediante densidad óptica a 600 nm en una dilución 1:10 del crecimiento bacteriano hasta que se obtuvo un valor de 0.3, el cual corresponde a 10³ unidades formadoras de colonia/mL (UFC/mL), o la fase estacionaria, durante toda la noche.

El crecimiento de las bacterias en medio sólido se realizó en agar Luria Bertani a 37°C.

Extracción de proteínas

a) Proteínas totales:

Las proteínas totales se obtuvieron de acuerdo al método modificado descrito por Sampthkumar (2004), brevemente; para poder obtener un extracto de proteínas totales de *Salmonella* CS y 1284::Tn*phoA*, se tomó una colonia fresca y pura de cada cepa y se inocularon en 10 mL de caldo Luria Bertani hasta fase exponencial en las condiciones previamente descritas; posteriormente se obtuvo el paquete celular centrifugando el cultivo a 13,000 rpm (Centrífuga Hettich Universal 32R), a 5 °C durante 10 minutos.

El paquete celular se resuspendió y se dejó reposar durante una hora a temperatura ambiente en 1 mL de amortiguador de lisis (40 mM Tris [pH 7.0], 0.1 mg de lisozima por mL, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1.5mM, urea 9M, CHAPS 2 % p/v). El extracto se centrifugó a 13,000 rpm por 15 minutos (Centrífuga Hettich Universal 32R), para remover los restos celulares. El sobrenadante resultante se trató con 0.1 volúmenes de un amortiguador que contenía MgCl₂ 50mM, 1 mg por mL de DNasa, y 0.25 mg por mL de RNasa. La reacción fue detenida después de 15 minutos a 4°C con 3 volúmenes de acetona fría. A partir de este extracto se obtuvieron las proteínas mediante precipitación con acetona por 2 horas a -20 °C. El precipitado fue recuperado por centrifugación a 3,500 rpm (Centrífuga Sorval RT7), por 15 minutos y resuspendido en una solución que contenía urea 9M y CHAPS 1% p/v; dejándose reposar por una hora a temperatura ambiente.

Finalmente el contenido proteico fue cuantificado mediante el método de Bradford en microplaca (Bradford, MM. 1976).

b) Proteínas de membrana externa:

Las proteínas de membrana externa se obtuvieron de acuerdo al método descrito por Rosales-Reyes R. (2004); brevemente; las bacterias (CS y 1284::Tn*phoA*) se crecieron en 50 mL de caldo LB hasta fase exponencial en las condiciones

previamente descritas. Las células bacterianas fueron cosechadas mediante centrifugación a 13,000 rpm durante 10 minutos a 5 °C. El botón celular fue lavado dos veces con PBS 1X y resuspendido en HEPES 0.01M (N-2-hidroxietilpiperacina-N-2-ácido etanosulfónico), hasta obtener una densidad óptica de 0.6 a 540 nm medida en un espectrofotómetro (Spectronic Genesys 5). Posteriormente la bacteria fue sonicada hasta obtener una densidad óptica de 0.1 a 540 nm (Spectronic Genesys 5).

El sonicado fue centrifugado a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante fue tratado con 1 mg/mL de DNasa, 0.25 mg/mL de RNasa (Roche), y MgCl₂ 50mM durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente este sobrenadante fue ultracentrifugado a 45,000 rpm (Beckman L7-80 Ultracentrifuge), durante 45 minutos a 4°C para obtener las envolturas celulares. El botón fue resuspendido en una solución de tritón X-100 2% y HEPES 10 mM y se centrifugó 45,000 rpm durante 45 minutos. El botón resultante fue resuspendido en una solución que contenía Tris 0.05M, EDTA 5 mM, Tritón X-100 al 2% pH 8.0 y se centrifugó a 45,000 rpm por 45 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y se le adicionó una mezcla de inhibidores de proteasas (antipaina, bestatina, quimostatina, leupeptina y aprotinina), (Roche), manteniéndose a temperatura ambiente durante una hora. Posteriormente se dializó con agua desionizada durante 24 horas realizando cambio de agua cada 4 horas. Las proteínas fueron obtenidas mediante precipitación con 3 volúmenes de acetona fría durante 18 horas a -20°C y fueron recuperadas mediante centrifugación a 8,000 rpm durante 10 minutos y resuspendidas en el amortiguador de muestra que contenía Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8, glicerol al 20%, dodecil sulfato de sodio (SDS), al 2%, y β-Mercapto etanol al 5% (Laemmli, 1970). Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford en microplaca (Bradford, MM. 1976).

c) Proteínas periplásmicas:

Las proteínas periplásmicas se obtuvieron de acuerdo al método descrito por Ames (1984), brevemente; *S. typhimurium* (CS y 1284), se crecieron a partir de

una colonia fresca y pura en 2 mL de caldo LB hasta alcanzar la fase estacionaria en las condiciones previamente mencionadas. Las células bacterianas fueron colectadas por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos a 5 °C y el sobrenadante fue decantado rápidamente; el botón celular fue resuspendido en el medio residual y se adicionaron 20 µL de cloroformo (CHCl₃), se agitaron y se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente se adicionaron 0.2 mL de Tris-HCl 0.01M, pH 8.0. Las células fueron separadas por centrifugación a 13,000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante fue extraído con micropipeta. Las proteínas fueron precipitadas con tres volúmenes de acetona fría durante 18 horas a -20°C, se recuperaron mediante centrifugación a 8,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. y se resuspendieron en buffer de muestra. Finalmente fueron cuantificadas por el método de Bradford en microplaca (Bradford, MM. 1976).

d) Proteínas secretadas:

Las proteínas secretadas fueron obtenidas bajo inducción de SPI-1 brevemente; *S. typhimurium* (CS, 1284::Tn*phoA*, ::*spiC* y Δ *prgH*), se crecieron en 2 mL de caldo LB suplementado con NaCl 0.3M a 37°C, en microaerofilia, se hizo una dilución 1:20 en 10 mL de medio fresco y se crecieron hasta fase logarítmica a 37°C en microaerofilia (Ehrbar, K. 2006). Las proteínas secretadas se purificaron de acuerdo al método descrito por Lamonica (2005), brevemente; microaerofilia en 10 mL de caldo LB hasta alcanzar una fase exponencial a 37°C. Posteriormente el cultivo bacteriano fue centrifugando a 10,000 rpm durante 10 minutos a 5 °C para obtener el sobrenadante el cual, fue filtrado utilizando una membrana con un poro de 0.45 µm de diámetro para remover a las células muertas o no rotas; después se adicionó ácido tricloroacético (TCA), hasta obtener una concentración final de TCA del 12%. El sobrenadante fue enfriado en hielo durante 45 minutos obteniendo un precipitado que fue recuperado mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 45 minutos a 4°C. El botón resultante se lavó con 700 µL de acetona e incubado durante 15 minutos a 4°C. La acetona fue evaporada y el botón resultante se resuspendió en 50 µL de un amortiguador que contenía SDS al 1%, β Mercapto etanol 0.4M y Tris-HCl 50mM pH 8.0. Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford en microplaca (BIO-RAD).

Determinación de proteínas (Método de Bradford, 1976):

El método de cuantificación de proteínas de Bradford se utiliza para determinar proteínas solubles (Bradford, MM. 1976). Esto involucra la adición de un colorante ácido a la solución de proteínas para formar un color en respuesta a las diferentes concentraciones de proteínas. En este caso se usa el azul de Coomassie R-50, el cual se une principalmente a residuos de arginina.

Para la determinación de proteínas por este método se utilizó el estuche "B Protein Assay kit" (BIO-RAD, Hercules, CA), como se describe a continuación. Se preparó una solución estándar de albúmina sérica bovina (ASB), a una concentración de 1 mg/mL. Posteriormente se construyó una curva estándar de ASB con concentraciones de 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{g/mL}$.

Por otra parte se prepararon diluciones 1:1, 1:2 y 1:4 de las diferentes muestras, y se hizo una dilución 1:5 del reactivo de Bradford. En una microplaca se adicionaron 150 μL del reactivo de Bradford y 20 μL de las soluciones de la curva estándar o de muestra problema y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió a hacer la determinación espectrofotométrica a 650 nm mediante un lector de ELISA (Molecular Devices, Mod. UVT 06520). La concentración de proteínas se determinó graficando la curva patrón y traspolando las absorbancias obtenidas para las muestras problema en dicha curva.

Electroforesis discontinua desnaturizante SDS-PAGE (Laemmli, 1970):

Las proteínas totales, secretadas, periplásmicas y de membrana externa se separaron en geles de poliacrilamida al 10% (acrilamida-bis-acrilamida) en regulador de Tris-HCl 1.5M pH 8.8. Se utilizó la cámara de electroforesis Mini-Protean II (BIO-RAD, Hercules, CA), con separadores de 1.0 mm de grosor en condiciones desnaturizantes empleando dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% (Gibco BRL, NY., USA.). Se tomaron 5 μg de cada una de las fracciones proteicas, se mezclaron con un volumen de 5 μL de regulador de muestra 2X (Tris

0.25 M pH 6.8, glicerol al 10%, SDS al 2%), se calentaron a ebullición durante 5 minutos. Posteriormente se sometieron a separación electroforética. Se utilizó un marcador de peso molecular preteñido, de amplio rango (BIO-RAD, Hercules, CA) de 194, 115, 97, 53, 37, 29, 20 y 7 kDa. El corrimiento electroforético se llevó a cabo aplicando una corriente de 30 mA durante 45 minutos aproximadamente, con una fuente de poder EPS 301 (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH). El regulador de corrimiento que se utilizó fue Tris 25 mM, glicina 182 mM, SDS al 1%. Terminada la separación electroforética el gel fue revelado con el estuche "kit Silver Stain Plus" (BIO-RAD) (Gottlieb, M. 1987).

Electroforesis bidimensional (O'Farrel, 1974):

Esta técnica ha sido desarrollada para la separación de proteínas utilizando un gel de poliacrilamida en dos dimensiones; tiene una alta resolución y sensibilidad, con esta técnica se puede analizar y detectar proteínas a partir de un sistema biológico complejo. Las proteínas son separadas en la primera dimensión por punto isoeléctrico (isoelectroenfoque), y por peso molecular en la segunda dimensión.

a) Primera dimensión (isoelectroenfoque -IEF-):

El isoelectroenfoque se llevó a cabo en tubos de vidrio (130 X 2.5 mm de diámetro interno) y fue sellado con Parafilm en la parte inferior. Se preparó la mezcla del gel (aproximadamente 0.5 mL para cada tubo), que contenía 5.5 g de urea ultra pura (BIO-RAD), 1.33 mL de acrilamida –bis-acrilamida al 30%, 2 mL de Nonidet P-40 (NP-40), al 10 % p/v, 1.97 mL de agua desionizada, 0.4 mL de Amfolinas, con un rango de pH de 5 a 7 (BIO-RAD) y 0.1 mL de Amfolinas, con un rango de pH de 3 a 10 (BIO-RAD), (concentración final 2% de Amfolinas). Esta mezcla fue agitada hasta la total disolución de la urea y se hizo pasar a través de un filtro con un poro de 0.45 μm de diámetro. Posteriormente se adicionaron 10 μL de persulfato de amonio (PSA) al 10 %, e inmediatamente después se

adicionaron 7 μL de *N, N, N', N'*- tetrametilendiamina (TEMED). Los tubos fueron cargados con la mezcla del gel hasta una longitud de 11 cm con ayuda de una jeringa hipodérmica y una manguera de venoclisis. Una vez llenado el tubo, en la parte superior de la mezcla del gel se colocaron 200 μL de agua desionizada y se dejó reposar a temperatura ambiente durante una hora. Una vez transcurrido ese tiempo el agua fue retirada y se colocaron 50 μL de un amortiguador de lisis que contenía urea 9.5 M, NP-40 al 2% p/v, Amfolinas con un rango de pH 5 a 7 al 1.6%, Amfolinas con un rango de pH 3 a 10 al 0.4% y β -Mercapto etanol al 5%. Se dejó reposar durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente el Parafilm fue removido de la parte inferior del tubo. Los tubos con el gel ya polimerizado se colocaron en la cámara de electroforesis Protean II xi cell (BIO-RAD, Hercules, CA). El amortiguador de lisis fue retirado del tubo que contenía el gel de IEF, enseguida se colocaron otros 50 μL de amortiguador de lisis fresco y se llenaron los tubos que contenían el gel de IEF por la parte superior, así como la parte superior de la cámara con NaOH 0.02 M (Backer), preparado en el momento, previamente filtrado y desgasificado. En la parte inferior de la cámara se colocó H_3PO_4 0.01 M (Backer), preparado en el momento, previamente filtrado. Los geles se pre-corrieron como se muestra en la tabla 1.

Tabla No. 1

Tiempo	Voltaje
a) 15 min.	200 V
b) 30 min.	300 V
c) 30 min.	400 V

Posteriormente el NaOH 0.02 M y el amortiguador de lisis fueron retirados y nuevamente se colocaron 40 μL de amortiguador de lisis fresco y enseguida se colocó un volumen equivalente a 50 μg de proteínas totales, secretadas, periplásmicas y de membrana externa (según fuera el caso) de cada cepa; los tubos así como la parte superior de la cámara se llenaron con NaOH 0.02 M fresco. El corrimiento se hizo a 400 volts durante 15 horas, utilizando la fuente de poder modelo EPS 301 (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH).

Transcurrido el tiempo de corrimiento el NaOH fue retirado de la parte superior de la cámara y se procedió a extraer los geles de IEF de los tubos de vidrio que los contenían haciendo presión con una jeringa por la parte superior del tubo. Una vez que se obtuvieron los geles de IEF, estos fueron colocados en una solución para ser equilibrados durante un lapso de dos a cuatro horas a temperatura ambiente. Posteriormente los geles de IEF fueron corridos en la segunda dimensión (electroforesis SDS-PAGE) ó colocados en un tubo con rosca con 5 mL de amortiguador de lisis para ser almacenados a -20°C hasta su uso. Las dimensiones finales del gel de IEF fueron de 2.5 mm de diámetro X 11 cm de longitud.

b) Segunda dimensión (Electroforesis SDS-PAGE):

La segunda dimensión consiste en un gel discontinuo SDS, descrito por Laemmli (1970). Brevemente; la placas de vidrio internas utilizadas fueron de 200 mm X 160 mm con bisel y fueron ensambladas con las placas externas (200 X 180 mm) como se muestra en la figura 2.

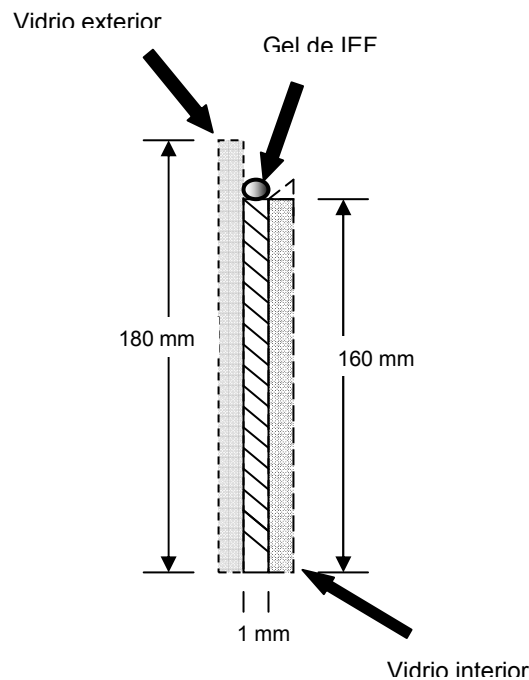


FIG. 2 Esquema que ilustra como fueron ensambladas las placas de vidrio para la segunda dimensión (vista lateral).

El gel de la segunda dimensión consistió en un gel de acrilamida-bis acrilamida al 10%, de 1 mm de grosor; que se preparó como se describió previamente. Por otra parte, el gel de IEF una vez equilibrado fue colocado en la parte superior del gel de acrilamida como se muestra en la figura 2.

En el gel de acrilamida se hizo un pozo para colocar 8 μ L de un marcador de peso molecular preteñido de amplio rango (BIO-RAD, Hercules, CA) de 194, 115, 97, 53, 37, 29, 20 y 7 kDa.

El corrimiento electroforético se llevó a cabo aplicando una corriente de 30 mA durante 4.5 horas, con una fuente de poder EPS 301 (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH). El regulador de corrimiento que se utilizó fue Tris 25 mM, glicina 182 mM, SDS al 1%.

Revelado del gel (Gottlieb M. 1987):

Una vez terminado corrimiento electroforético el gel fue fijado durante 20 minutos con una solución que contenía ácido acético al 10%, metanol al 40% y una solución fijadora al 10%. Transcurrido el tiempo de fijado el gel fue lavado con agua desionizada durante 2 horas. Posteriormente el gel fue colocado en la mezcla de revelado preparada como lo indica el estuche "Silver Stain Plus" (BIO-RAD, Hercules, CA), se dejó en agitación hasta que fueron visibles las proteínas. La reacción fue detenida colocando el gel en ácido acético al 4%.

Determinación del intervalo de pH en el gel de IEF (Ames, FL. 1976):

El rango de pH a lo largo del gel de IEF se obtuvo preparando 3 geles de IEF en las condiciones descritas previamente, excepto que no fue cargada la muestra en el gel, cuando terminó el corrimiento electroforético se removió el gel del tubo de vidrio y fue cortado transversalmente en secciones de 1 cm de longitud y se colocaron en 4 mL de agua desionizada y desgasificada, posteriormente fueron dejados en reposo durante 18 horas a temperatura ambiente y después se

procedió a determinar el pH con un pH-metro (Oakton 510, No. serie 223358). La determinación se hizo por triplicado. Con los valores de pH obtenidos se construyó una curva longitud-pH y para determinar los puntos isoeléctricos (pI) de las proteínas de las diferentes muestras se correlacionó la longitud a la cual migraron las proteínas en el gel de IEF con dicha curva para así obtener el pI.

Además, se hizo un gel bidimensional utilizando como marcadores de punto isoeléctrico (BIO-RAD), a la hemoglobina humana A (PM de 64.5 KDa y pI de 7.1), y a la hemoglobina humana B (PM de 64.5 y pI de 7.5). Estas se separaron en una primera dimensión utilizando un gel de IEF, y en una segunda dimensión utilizando un gel de SDS-PAGE al 10%. Las longitudes recorridas por la hemoglobina humana A y B se correlacionaron con la curva previamente elaborada.

Identificación de proteínas:

Para identificar a la proteína de interés se procedió a escindir de un gel de proteínas periplásmicas de *S. typhimurium* 1284::TnphoA teñido con azul de Coomassie el punto que correspondía a la proteína cuyo peso molecular es de 100 KDa y pI de 6.3, la cual se envió a la Unidad de Proteómica, del Instituto de Biotecnología de la UNAM para su análisis mediante la técnica de MALDI-TOF (Renesto, P. 2005).

RESULTADOS:

La inserción del transposón *TnphoA* en el genoma de *Salmonella typhimurium* en la cepa 1284::*TnphoA* afecta el patrón de expresión de proteínas totales comparado con la cepa silvestre:

Con el fin de identificar las diferencias en la expresión de proteínas totales entre la cepa silvestre (CS), y la mutante 1284::*TnphoA* de *S. typhimurium*, se procedió a obtener un extracto de proteínas totales y separarlas mediante electroforesis SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10%. Se encontró que existe una banda de aproximadamente 50 kDa que está presente en la cepa 1284::*TnphoA*, no así en la CS como se observa en la Figura 3.

Para hacer un análisis más profundo acerca de esta diferencia en el patrón de expresión de proteínas totales se decidió llevar a cabo una electroforesis bidimensional, es decir separarlas por punto isoeléctrico y peso molecular. Primero se realizó la determinación del rango de punto isoeléctrico (pI), mediante una curva longitud-pH (Fig, 4).

Los pI obtenidos de los estándares se muestran en el gel de la figura 5, en donde se observa una correlación entre el pI teórico de estándares de pI y la longitud recorrida por los mismos con la curva elaborada en el laboratorio.

Los resultados obtenidos mediante la electroforesis de dos dimensiones de los extractos de proteínas totales muestran que hay diferencia en la expresión de aproximadamente 15 proteínas (aparecen o desaparecen) entre las cepas silvestre y mutante de *S. typhimurium* (ver Figura 6). La mayoría de las proteínas que se expresan diferencialmente tienen un peso molecular entre 20 y 50 KDa. En verde se muestran las proteínas que aparecen en la cepa mutante 1284::*TnphoA* con respecto a la cepa silvestre, en rojo las proteínas que desaparecen en la cepa mutante 1284::*TnphoA* con respecto a la cepa silvestre. Dadas las diferencias encontradas en la expresión de proteínas totales entre CS y 1284::*TnphoA* se decidió obtener los extractos de proteínas de membrana externa

(Rosales, RR. 1994), periplásmicas (Ames, FL. 1984), y secretadas (Lamonica, JM. 2005). Estos extractos se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE y electroforesis bidimensional, con la finalidad de identificar la localización de las proteínas afectadas por la inserción del transposón *TnphoA*.

El gen interrumpido por el transposón *TnphoA* en *S. typhimurium* afecta notablemente la expresión de proteínas periplásmicas.

Una de las características del transposón utilizado es que tiene como blanco genes de proteínas periplásmicas o secretadas por lo tanto el análisis más detallado de extractos periplásmicos o secretados nos debe dar con más detalle el cambio del perfil de proteínas en esta mutante. Siguiendo con el análisis de los diferentes extractos proteicos se realizó electroforesis SDS-PAGE a un extracto de proteínas periplásmicas obtenidas mediante extracción con cloroformo y posterior precipitación con acetona en frío como reporta Ames (1984). En la Figura 7 se observa que este tipo de geles solo nos demuestra una diferencia en una proteína de aproximadamente 50 kDa entre las proteínas periplásmicas de 1284::*TnphoA*, y las de la cepa silvestre. Sin embargo el análisis del perfil de proteínas en geles de dos dimensiones, como se observa en la figura 8 demuestra que son más las proteínas periplásmicas afectadas ya que algunas aparecen y otras desaparecen en la mutante con respecto de la cepa silvestre. Algunas de las proteínas periplásmicas que aparecen o desaparecen en los proteomas de ambas cepas de *S. typhimurium* mostradas en la figura 8 correlacionan con las proteínas totales (Fig. 6), que aparecen o desaparecen. Las diferencias más notables son una proteína de 30 kDa con un punto isoeléctrico de 6.3 aproximadamente que se encuentra expresada por la cepa silvestre pero ausente en la cepa 1284::*TnphoA*, y una proteína de 100 kDa con punto isoeléctrico de 6.3 presente en la cepa mutante 1284::*TnphoA*, ausente en la cepa silvestre.

Las proteínas de membrana externa no son afectadas en su expresión por la inserción del transposón *TnphoA* en el genoma de *S. typhimurium*.

Con el extracto de proteínas de membrana externa (PME), (Rosales, RR 1994), se procedió a realizar un análisis de la expresión diferencial mediante electroforesis SDS-PAGE observándose que no hay diferencia en la expresión de estas proteínas entre las cepas silvestre y 1284::*TnphoA* (Fig. 9). Para confirmar que no hay diferencias en la expresión de proteínas de membrana externa entre las cepas silvestre y 1284::*TnphoA* de *S. typhimurium* se procedió a realizar un estudio más detallado a través de electroforesis bidimensional. Los resultados mostrados en la figura 10 confirman que no hay diferencia en la expresión de proteínas de membrana externa entre las cepas silvestre y 1284::*TnphoA* de *S. typhimurium*.

El gen interrumpido por el transposón *TnphoA* en *S. typhimurium* no está relacionado con el sistema de secreción tipo III (SSTIII), codificado por la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI-1).

Siguiendo con el análisis de los diferentes extractos se realizó electroforesis SDS-PAGE las proteínas secretadas por *S. typhimurium* CS y 1284::*TnphoA* obtenidas del sobrenadante de un cultivo bacteriano mediante precipitación con ácido tricloroacético y posterior precipitación con acetona, en frío como se reporta el método de Lamonica (2005). Además, para determinar si el gen afectado por la inserción del transposón *TnphoA* en el genoma de *Salmonella* estaba relacionado con el sistema de secreción tipo III de *Salmonella* (SSTIII), codificado en la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI-1), se analizaron las proteínas secretadas de *S. typhimurium* Δ *prgH* (defectuosa en la formación de la aguja del SSTIII codificado en SPI-1).

Los resultados obtenidos mostrados en la figura 11 indican que el SSTIII codificado en SPI-1 no está relacionado con la inserción del transposón *TnphoA* en el genoma de *Salmonella*.

Las proteínas secretadas por *S. typhimurium* también se ven afectadas en por la inserción del transposón *TnphoA* en el genoma de la bacteria.

Como se puede observar en la figura 11, hay cambios evidentes en las proteínas secretadas por *S. typhimurium* cepa silvestre y 1284::*TnphoA*, se puede observar que no se secretan varias proteínas (de aproximadamente 97, 80, 53 y 45 kDa), por la cepa 1284::*TnphoA* además que hay una banda de aproximadamente 30 kDa que esta presente en las proteínas secretadas de la cepa mutante, no así en la cepa silvestre. Para confirmar este dato se realizó el análisis de los extractos de proteínas secretadas de la CS y 1284::*TnphoA* mediante electroforesis bidimensional; en este caso no se pudo confirmar las diferencias con esta técnica, dado que se perdió sensibilidad (Fig. 12), por esta razón se repetirá este ensayo posteriormente.

Una de las proteínas que incrementa su expresión en la mutante de *S. typhimurium* 1284::*TnphoA*, es una probable dimetil sulfóxido reductasa.

La identificación de la proteína (MALDI-TOF) (indicada con un asterisco rojo en la Fig. 8 B), con peso molecular de 100 kDa y pI de 6.3 presente en el periplasma de *S. typhimurium* 1284::*TnphoA*, que no se encuentra en la cepa silvestre indica que se trata de la cadena A de una probable dimetil sulfóxido reductasa, denominada STM1 499 presente en *Salmonella typhimurium* LT2. En la figura 13 se muestra la secuencia de aminoácidos de esta proteína. La figura 14 muestra la localización del gen que codifica para STM1 199 en el genoma de *Salmonella typhimurium* (obtenida en el banco de genes de NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), esta proteína se encuentra entre el gen que codifica para la proteína STM1 198, otra probable dimetil sulfóxido reductasa y el gen *ynfD*, que codifica para una probable proteína de membrana externa de *Salmonella typhimurium*.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

Mediante la secuenciación de 400 pb del gen de *Salmonella* interrumpido por un transposón *TnphoA* se pudo inferir que el gen presenta un 98% de similitud con un gen *phsA* de *S. typhimurium* LT2 (Urbán-Reyes, ML. 2005), este gen que se encuentra formando parte del operón *phs ABC*, integrado por *phsA*, *phsB* y *phsC*. El gen *phsA* codifica para la proteína PhsA, que es una proteína de anclaje a la membrana, con función de oxidoreductasa relacionada con el metabolismo energético de la bacteria (Heinzinger, NK. 1995). A la fecha no existe ningún reporte en el que se involucre a PhsA en la inducción de MPC y FG.

De manera interesante se observó que sólo aquellos serotipos de *Salmonella* que son capaces de inducir macropinocitosis y fagosomas gigantes presentaron similitud con el gen *phsA* (Urbán-Reyes, ML. 2005).

A la fecha, la función de PhsA en la inducción de MPC y FG no es clara, sin embargo; la relación que existe entre la mutante de *S. typhimurium* 1284::*TnphoA*, cuyo gen *phsA* se encuentra interrumpido, y su disminución en la inducción macropinocitosis y formación de fagosomas gigantes (factores de virulencia importantes), nos conduce a pensar que el gen o la proteína codificada por *phsA* participa en la inducción de MPC y FG así como en la virulencia de *Salmonella typhimurium* en el modelo murino.

De esta manera, analizamos la expresión de proteínas de *S. typhimurium* tanto de la cepa silvestre como de la cepa mutante 1284::*TnphoA*. Primeramente se analizaron las proteínas totales y se encontró que hay proteínas presentes en la cepa silvestre que no están en la cepa mutante, además, en el mapa proteómico de *S. typhimurium* 1284::*TnphoA* se encontraron varias proteínas que no estaban en el mapa proteómico de la cepa silvestre (ver Fig. 6 proteínas indicadas círculos verdes y rojos). Aproximadamente son 15 proteínas expresadas diferencialmente entre la cepa silvestre y la cepa mutante; de las cuales la mayoría se encuentran en un intervalo de peso molecular entre 20 y 50 KDa. Esta expresión diferencial de proteínas entre la cepa silvestre y la cepa mutante nos sugirió como primera posibilidad que el gen *phsA* del genoma de *Salmonella*

podría actuar como un regulador genético, como es el caso de PhoP/PhoQ (Miller, SI. y col. 1989) ya que más de una proteína se ve afectada en su expresión en la cepa mutante 1284::*TnphoA*. Este hallazgo nos pareció interesante, por lo que decidimos obtener extractos proteicos de diferentes fracciones de la bacteria para determinar si las proteínas afectadas en su expresión se localizan en un sitio en específico de la bacteria.

Una segunda posibilidad acerca del papel de PhsA en la inducción de MPC y FG es que esta tenga un papel en la modificación de proteínas efectoras como es el paso de SptP. SptP es una proteína efectora del SSTIII codificado en SPI-1, la cual es desdoblada por InvC para poder traslocarse al exterior bacteriano a través del SSTIII (Akeda, Y. y Galán, JE. 2005). Proteínas como InvC tienen una función paralela a las proteínas denominadas AAA (ATPasas Asociadas a diversas Actividades celulares), que se caracterizan por tener una organización hexamérica, éstas proteínas desensamblan complejos proteicos y desdoblan proteínas, además; estas proteínas tienen un peso molecular entre 70 y 80 kDa y se encuentran ancladas a la membrana externa (Langer, T. 2005; Schmidt, M. 1999).

Correlacionando la localización de la proteína PhsA (anclaje a la membrana), y su peso molecular de aproximadamente 80 kDa se podría pensar que la proteína PhsA puede actuar como proteína modificadora de alguna(s) proteína(s) efectoras(s) en la inducción de macropinocitosis y formación de fagosomas gigantes; al estar interrumpido su gen con el transposón *TnphoA*, la proteína pierde su función o no se expresa, y con ello se evita la modificación de alguna(s) proteína(s) necesaria(s) para la inducción de MPC y FG.

Al efectuar el análisis de las proteínas periplásmicas, se pudo observar que existe una proteína de aproximadamente 45 kDa que esta presente en la cepa 1284::*TnphoA*, no así en la cepa silvestre. El análisis mediante electroforesis bidimensional reveló que la expresión diferencial de proteínas entre *Salmonella typhimurium* cepa silvestre y cepa 1284::*TnphoA* se da principalmente en el espacio periplásmico de la bacteria (Fig. 8). La diferencia más notable es una proteína de 30 kDa y punto isoeléctrico de 6.3 que se encuentra expresada por la

cepa silvestre pero ausente en la cepa 1284::Tn*phoA*, y una proteína de 100 KDa con punto isoeléctrico de 6.3 presente en la cepa mutante 1284::Tn*phoA*, ausente en la cepa silvestre. La identificación de la proteína de 100 KDa con punto isoeléctrico de 6.3 de mediante MALDI-TOF indica que se trata de la cadena A de una dimetil sulfóxido reductasa de *Salmonella typhimurium* LT2, denominada STM1 499, que se localiza en el espacio periplásmico. Una proteína homóloga a STM1 499 en *Escherichia coli*, es la proteína DmsA que esta involucrada en el metabolismo anaeróbico de la bacteria, esta dimetil sulfóxido reductasa de *E. coli* es un heterodímero formado por las subunidades A y B (Sambasivarao, D. y col. 1991).

La localización de STM1 499 en el genoma de *S. typhimurium* (Fig. 12), indica que río arriba del gen que codifica a STM1 499 se encuentra codificada la proteína STM1 498, otra probable dimetil sulfóxido reductasa, que bien podría funcionar como la otra subunidad de la dimetil sulfóxido reductasa de *S. typhimurium* comparándolo con lo que ocurre en *E. coli*.

La tercera posibilidad del papel de PhsA es que esta proteína participa de alguna manera en la formación o función del heterodímero de la dimetil sulfóxido reductasa. Agudo y col. (2004), demostraron que cepas de *Salmonella typhi* que son mutantes nulas en el gen *dsbA*, que no expresan a la proteína DsbA muestran diferencias marcadas en el proteoma periplásmico con respecto a la cepa silvestre. La proteína DsbA funciona como una disulfuro oxidoreductasa, que juega un papel central en la actividad oxido-reducción de varias proteínas en el espacio periplásmico. Además las proteínas del tipo de la DsbA contienen dominios conservados C-X-X-C en su secuencia de aminoácidos. Estos cambios en el proteoma periplásmico entre la cepa silvestre y la cepa nula en el gen *dsbA* de *S. typhi* se deben a formación incorrecta de enlaces disulfuro intramolecular e intermolecularmente. Analizando la secuencia de aminoácidos de PhsA encontramos que esta proteína tiene el dominio C-X-X-X, de esta manera podemos pensar que PhsA puede funcionar haciendo cambios intramoleculares o intermoleculares de otras proteínas, lo cual puede modificar el estado o localización de las mismas. Si PhsA no esta presente estos cambios intra- o intermoleculares de otras proteínas no se llevan a cabo lo que da como

consecuencia que estas proteínas cambien su localización, siendo que la(s) proteína(s) que se tenga(n) que modificar por PhsA pase(n) del espacio periplásmico a otra fracción celular de la bacteria y si no esta PhsA se queden atrapadas ahí o bien que, las proteínas tengan que ser modificadas para formar complejos funcionales, al no ser modificadas, estos complejos proteicos no se ensamblan y por lo tanto no son funcionales. Entonces, de forma general se puede decir que PhsA funciona modificando a proteínas involucradas en la cascada que desencadena la inducción de macropinocitosis y fagosomas gigantes.

Tanto PhsA como STM1 499 son proteínas con función de oxidoreductasas hasta ahora relacionadas únicamente con el metabolismo anaeróbico de *Salmonella*, además la correlación entre la presencia del gen *phsA* en los serotipos de *Salmonella* capaces de inducir macropinocitosis nos lleva a pensar que muy probablemente estas proteínas juegan un papel importante en la inducción de MPC y FG lo cual es el primer indicio de la participación de estas proteínas en la patogenia de *Salmonella*.

Por otra parte, el análisis de las proteínas de membrana externa de las cepas silvestre y 1284::Tn*phoA* de *Salmonella typhimurium* mostraron que estas no se ven afectadas en su expresión (Fig. 10), por la interrupción del gen *phsA*. El análisis de la secreción de proteínas de la cepa silvestre y 1284::Tn*phoA* en condiciones de inducción de SPI-1, utilizando también a la cepa de *S. typhimurium* Δ *prgH* indican que la SPI-1 no esta relacionado con la disminución de MPC y FG de la cepa mutante 1284::Tn*phoA*, sin embargo; el perfil electroforético muestra claras diferencias en la secreción de proteínas entre la cepa mutante y la cepa silvestre (Fig. 11), lo que indica que además de las proteínas periplásmicas, las proteínas secretadas también se ven afectadas por la interrupción del gen *phsA*, pero la SPI-1 no esta implicada en este fenómeno. Además, en ensayos de adherencia e invasión de la cepa silvestre y mutante con células HeLa efectuados en el laboratorio se ha demostroado que no hay diferencia significativa en la adherencia e invasión entre ambas cepas, lo que confirma que

SPI-1 no está relacionado con la disminución de MPC y FG de la cepa mutante
(Comunicación personal Urbán-Reyes, ML.)

Los estudios aquí presentados muestran el primer indicio de la participación de proteínas con función oxidoreductasa como la PhsA y SMT1 499 en la inducción de macropinocitosis y fagosomas gigantes, lo cual amplía el panorama del estudio de las bases moleculares de la patogenicidad de *Salmonella*. Los resultados obtenidos generan otras preguntas acerca de la afectación de otras proteínas por la interrupción del gen *phsA*, como es el identificar el mecanismo de acción de la proteína PhsA en la inducción de MPC y FG o de la interacción de PhsA con otras proteínas.

Conclusiones:

- 1.- PhsA juega un papel importante en la inducción de macropinocitosis y fagosomas gigantes en el macrófago.
- 2.- Una de las proteínas que esta presente en la cepa 1284::*TnphoA* y no en la cepa silvestre es STM1 499 con función de dimetil sulfóxido reductasa y se localiza en el espacio periplásmico.
- 3.- El gen *phsA* interrumpido por el transposón *TnphoA* en *S. typhimurium* afecta notablemente la expresión de proteínas del espacio periplásmico de la cepa mutante.

Perspectivas:

- 1.- Identificar otras proteínas que se expresan diferencialmente entre *S. typhimurium* cepas silvestre y 1284::Tn*phoA*.
- 2.- Analizar la secreción de proteínas de *S. typhimurium* cepas silvestre y 1284::Tn*phoA* bajo condiciones de inducción de la isla de patogenicidad 1 mediante electroforesis bidimensional.
- 3.- Determinar con que proteína(s) interacciona la proteína PhsA.
- 4.- Restaurar el gen *phsA* en la cepa 1284::Tn*phoA* y realizar los estudios de inducción de macropinocitosis y fagosomas gigantes.
- 5.- Analizar el perfil de expresión de proteínas de la cepa 1284::Tn*phoA* con el gen *phsA* complementado (por plásmido).
- 6.- Realizar ensayos de competencia *in vivo* entre *S. typhimurium* cepas silvestre, 1284::Tn*phoA* y 1284::Tn*phoA* con el gen *phsA* complementado (por plásmido).

Análisis de la expresión de proteínas totales de *S. typhimurium* CS y *S. typhimurium* 1284::*TnphoA*.

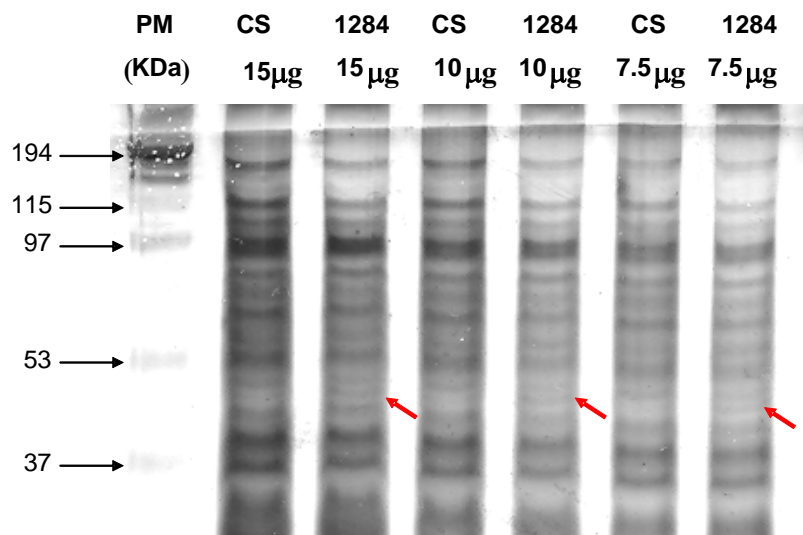


Fig. 3. Análisis de la expresión de proteínas totales de *S. typhimurium* 14028 (CS) y *S. typhimurium* 1284::*TnphoA*. Las proteínas totales de ambas cepas de *S. typhimurium* se extrajeron de acuerdo al método de Sampthkumar (2004), se separaron a través de electroforesis en gel de SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes al 10%. En cada carril se colocaron 15, 10 y 7.5 µg de proteínas totales de *S. typhimurium* CS y 1284::*TnphoA* respectivamente. Una vez realizado el corrimiento electroforético, el gel fue teñido y revelado con plata (Gottlieb, M. 1987). En la figura se indica con una flecha roja una banda de aproximadamente 50 kDa presente en la cepa 1284::*TnphoA*, que no se encuentra en la cepa silvestre.

Determinación del intervalo de punto isoeléctrico (pI).

Tabla No. 2

Longitud (cm.)	pH
1	4.5
2	4.93
3	5.52
4	5.9
5	6.26
6	6.67
7	7.03
8	7.3
9	7.7
10	7.97

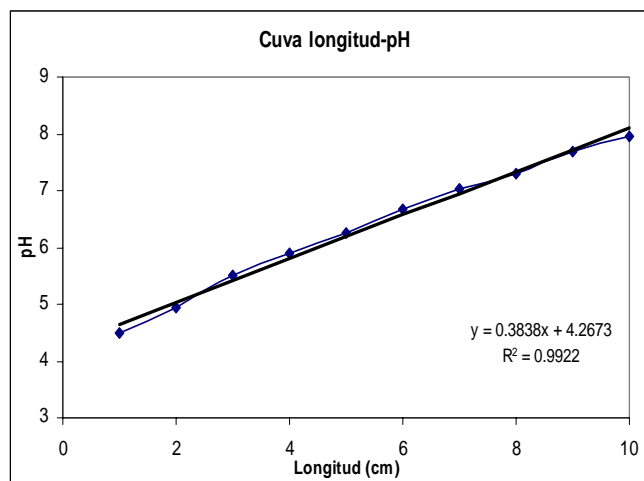


Fig. 4. Determinación del rango de pI mediante una curva longitud-pH. La determinación de la curva longitud-pH se realizó según el método descrito por Ames (1976). Se preparó en un gel de IEF. El gel se cortó en fragmentos de un centímetro (cm) de longitud y se midió su pH con la ayuda de un potenciómetro. En la tabla 2 se indica el valor de pH de cada fragmento del gel, y en figura 4 se indica la correlación entre la longitud y pH. Los resultados corresponden a 1 de 3 experimentos realizados independientemente.

Electroforesis bidimensional de los estándares de punto isoeléctrico (pI).

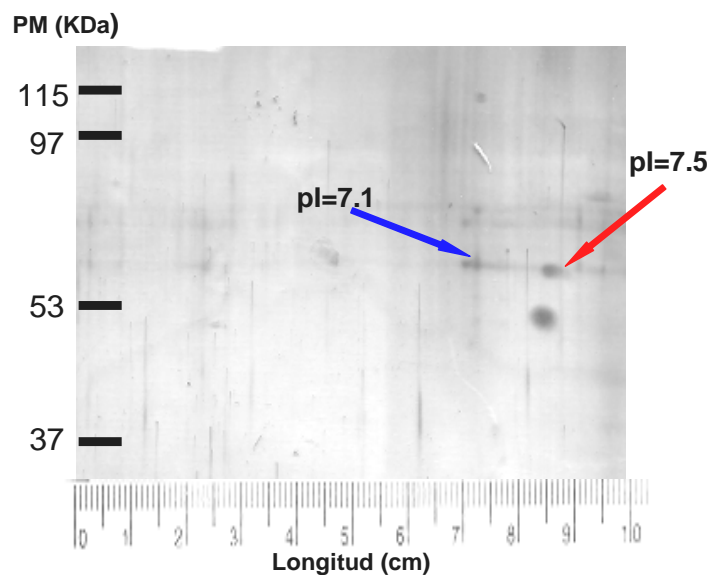


Fig. 5. Electroforesis bidimensional de estándares de pI. La electroforesis bidimensional se realizó según el método descrito por O'Farrel (1975). Se utilizaron como marcadores de punto isoeléctrico hemoglobina humana A (PM de 64.5 KDa y pI de 7.1), y a la hemoglobina humana B (PM de 64.5 y pI de 7.5). Las muestras se separaron en una primera dimensión utilizando un gel de IEF, y en una segunda dimensión utilizando un gel de SDS-PAGE al 10%. El gel se tiñó con plata (Gottlieb, M. 1987). La flecha en azul muestra a la hemoglobina humana A y la flecha en rojo a hemoglobina humana B.

Análisis de la expresión de proteínas totales de *S. typhimurium* CS y *S. typhimurium* 1284::*TnphoA*.

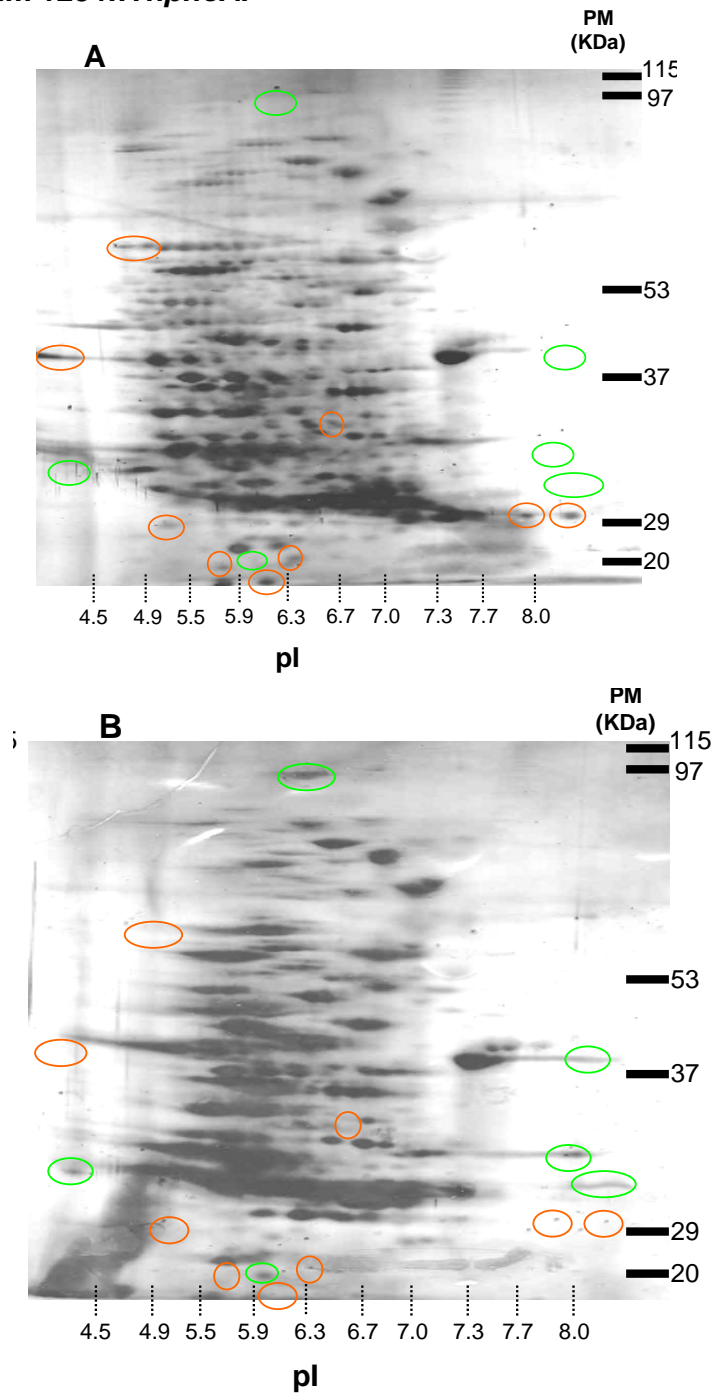


Fig. 6. Análisis de la expresión de proteínas totales de *S. typhimurium* 14028 (CS) y *S. typhimurium* 1284::*TnphoA* mediante electroforesis bidimensional. Se colocaron 50 μ g de un extracto de proteínas totales de cada cepa (CS y 1284::*TnphoA*) para ser separadas a través de isoelectroenfoque con anfolinas al 2 % de rango 5-7 y 8-10 en la primera dimensión, y por peso molecular en SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 10 % en la segunda dimensión. **(A)** *S. typhimurium* (CS). **(B)** *S. typhimurium* 1284::*TnphoA*. En círculos verdes se indican las proteínas que aparecen en la cepa mutante 1284 con respecto a la cepa silvestre y en círculos rojos las proteínas que desaparecen en la cepa mutante 1284::*TnphoA* con respecto a la cepa silvestre.

Análisis de la expresión de proteínas periplásmicas de *S. typhimurium* 14028 CS y *S. typhimurium* 1284::Tn*phoA*.

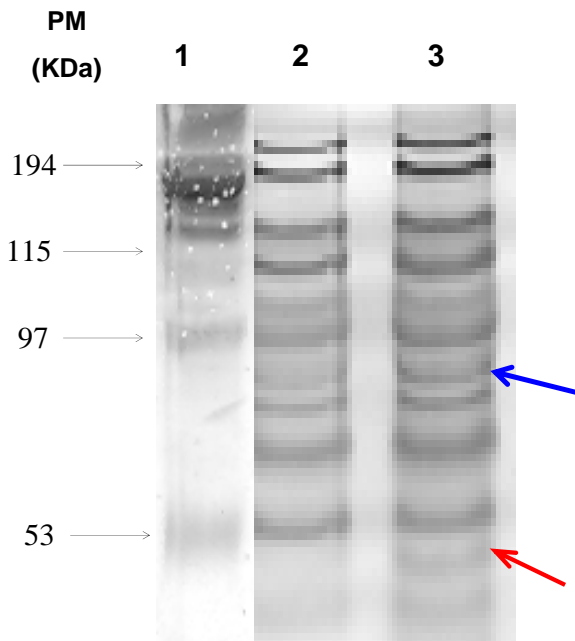


Fig. 7. Análisis de la expresión de proteínas periplásmicas de *S. typhimurium* 14028 (CS) y *S. typhimurium* 1284::Tn*phoA*. Se obtuvo el extracto de proteínas periplásmicas mediante extracción con cloroformo, se separaron 10 μ g de proteínas periplásmicas de *S. typhimurium* CS y 1284 mediante electroforesis SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10 %. El gel fue revelado con azul de Coomessie. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, en el carril 2 las proteínas periplásmicas de la cepa silvestre (CS), y en el carril 3 a las proteínas periplásmicas de la cepa 1284::Tn*phoA*. La flecha azul indica una banda de una proteína de aproximadamente 90 kDa que es expresada en mayor cantidad en 1284::Tn*phoA* que en la CS. La flecha en rojo indica la presencia de una proteína de aproximadamente 50 kDa la cepa 1284::Tn*phoA* que no esta en la CS.

Análisis mediante electroforesis bidimensional de la expresión de proteínas periplásmicas de *S. typhimurium* (CS) 14028 y *S. typhimurium* 1284::*TnphoA*.

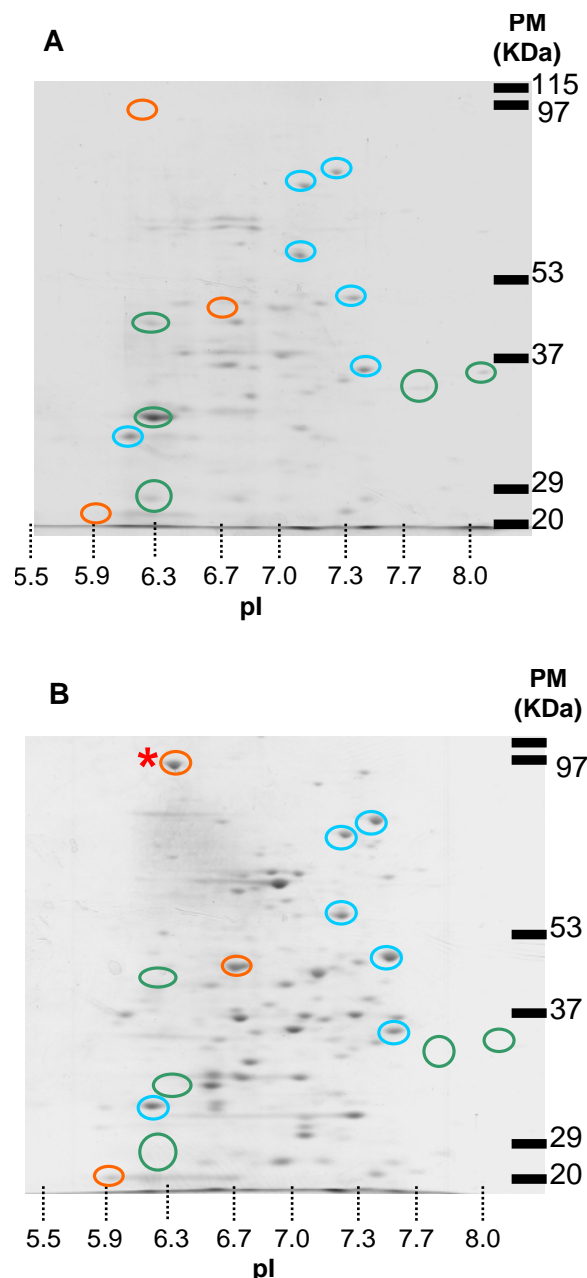


Fig. 8. Análisis mediante electroforesis bidimensional de la expresión de proteínas periplásmicas de *S. typhimurium* (CS) y *S. typhimurium* 1284::*TnphoA*. Se colocaron 50 µg de un extracto de proteínas totales de cada cepa, se separaron por isoelectroenfoque con anfólinas al 2 % de rango 5-7 y 8-10 en la primera dimensión y por peso molecular en SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 10 % en la segunda dimensión. **(A)** *S. typhimurium* 14028 (CS). **(B)** *S. typhimurium* 1284::*TnphoA*. En círculos rojos se indican proteínas que aparecen en la cepa mutante 1284::*TnphoA* con respecto a la cepa silvestre, en círculos verdes las proteínas que desaparecen en la cepa mutante 1284::*TnphoA* con respecto a la cepa silvestre, en círculos azules se muestran algunas proteínas expresadas en ambas cepas como referencia de comparación. Con un asterisco rojo se indica la proteína que fue identificada mediante MALDI-TOF.

Análisis de la expresión de proteínas de membrana externa de *S. typhimurium* CS y *S. typhimurium* 1284::*TnphoA*.

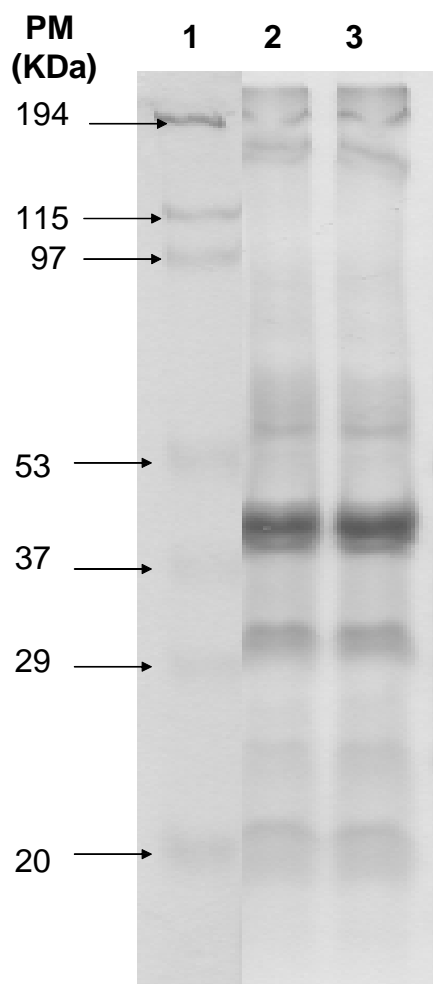


Fig. 9. Análisis de la expresión de proteínas de membrana externa (PME) de *S. typhimurium* 14028 (CS) y *S. typhimurium* 1284::*TnphoA*. Se obtuvo el extracto de proteínas de membrana externa como se detalla en *Materiales y Métodos*. Se colocaron 10 μ g de proteínas de *S. typhimurium* CS y 1284::*TnphoA* respectivamente; las proteínas fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10 %. El gel fue revelado con azul de Coomessie. En el carril 1 se indica el marcador de peso molecular, en el carril 2 PME de la CS y en el carril 3 PME de la cepa 1284::*TnphoA*.

Análisis en gel de dos dimensiones de la expresión de proteínas de membrana externa de *S. typhimurium* CS y *S. typhimurium* 1284::*TnphoA*.

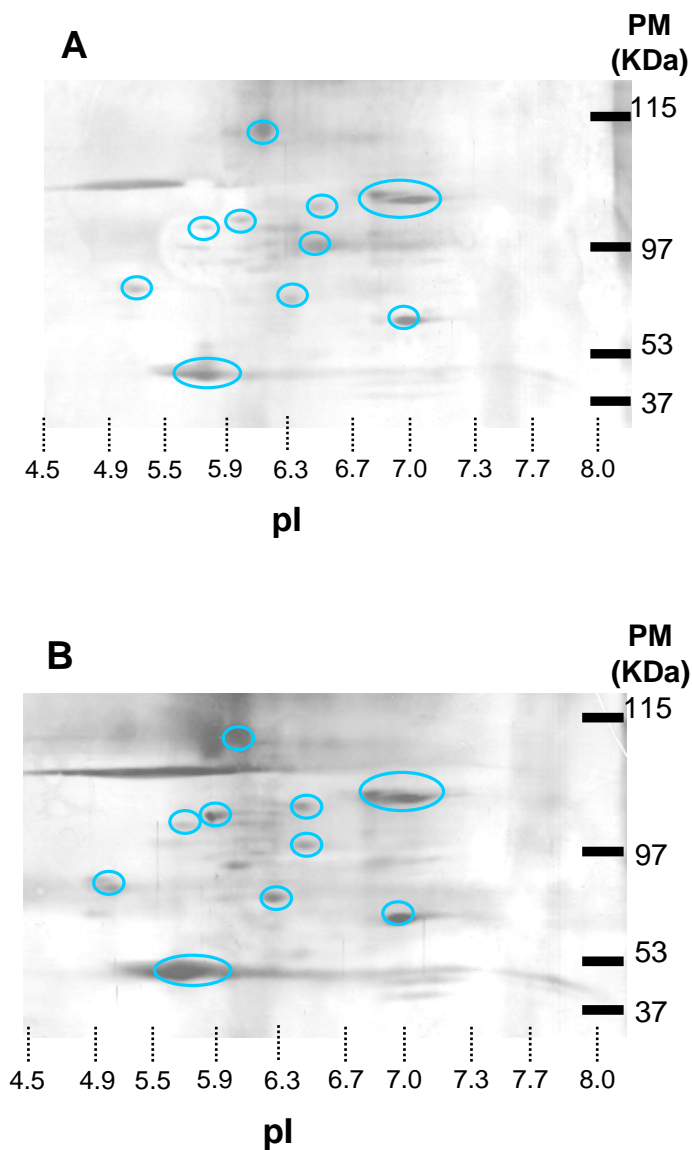


Fig. 10. Análisis de la expresión de proteínas de membrana externa (PME) de *S. typhimurium* (CS) y *S. typhimurium* 1284::*TnphoA* mediante electroforesis bidimensional. Se obtuvo el extracto de proteínas y se colocaron 50 μ g de PME de *S. typhimurium* CS y 1284::*TnphoA* respectivamente; las proteínas fueron separadas mediante electroforesis bidimensional. El gel fue revelado con plata. En (A) se muestra el patrón de PME de *S. typhimurium* (CS). En (B) se muestra el patrón electroforético de las PME de *S. typhimurium* 1284::*TnphoA*. En círculos azules se muestran algunas proteínas de membrana externa presentes tanto de *S. typhimurium* CS como de la cepa de *S. typhimurium* 1284::*TnphoA* como referencia de comparación.

Análisis de la expresión de proteínas secretadas de *S. typhimurium* CS y *S. typhimurium* 1284::*TnphoA*.

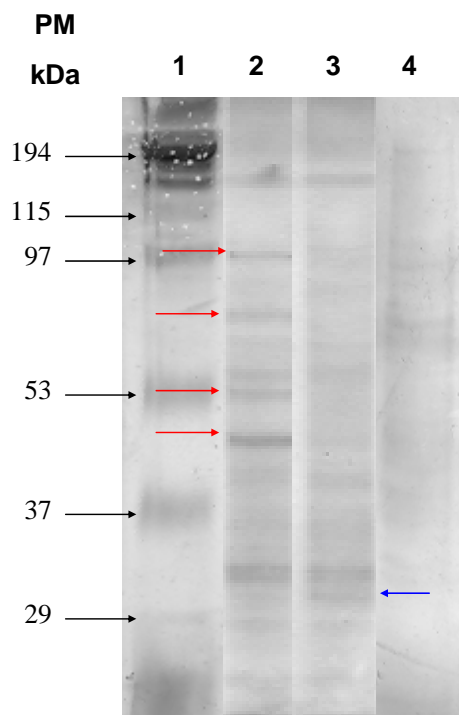


Fig. 11. Análisis de la expresión de proteínas secretadas (PS) de *S. typhimurium* 14028 (CS), 1284::*TnphoA*, Δ *prgH* y *::spiC*. Se obtuvo el extracto de proteínas secretadas como se detalla en *Materiales y Métodos*. Se colocaron 5 μ g de proteínas de *S. typhimurium* CS y 1284::*TnphoA*, Δ *prgH* y *::spiC* respectivamente; las proteínas fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10 %. El gel fue revelado con plata. En el carril 1 se indica el corrimiento electroforético de las PS de la CS PS, en el carril 2 de la cepa 1284::*TnphoA*, en el carril 3 PS de la cepa Δ *prgH* y en el carril 4 el marcador de peso molecular. En flechas rojas se indican las proteínas secretadas por CS y no así por la cepa 1284::*TnphoA*. En flecha azul se indica una proteína que es secretadas por 1284::*TnphoA* y no por la CS.

Análisis mediante electroforesis en dos dimensiones de las proteínas secretadas por *S. typhimurium* CS y *S. typhimurium* 1284::TnphoA.

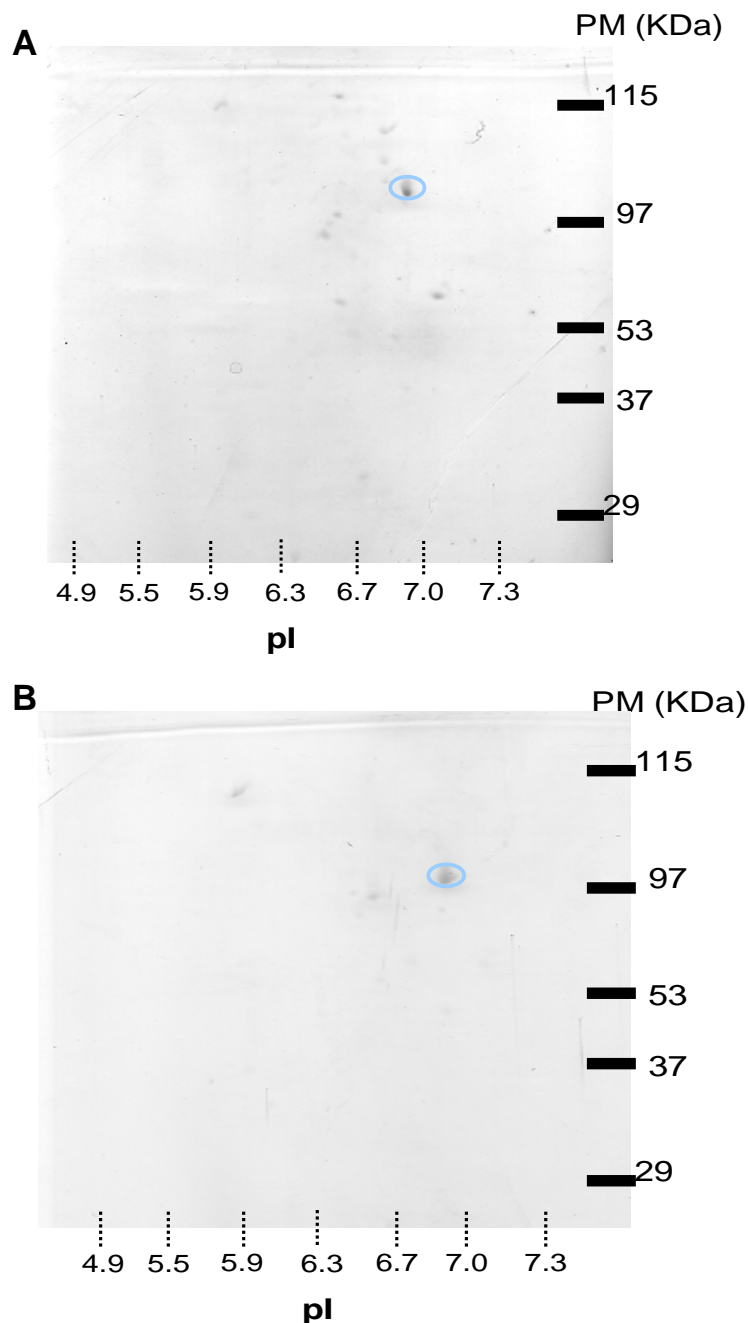


Fig. 12. Análisis de la secreción de proteínas de *S. typhimurium* (CS) y *S. typhimurium* 1284::TnphoA mediante electroforesis bidimensional. Se obtuvo el extracto de proteínas secretadas como se detalla en *Materiales y Métodos*. Se colocaron 15 μ g de proteínas de *S. typhimurium* CS y 10 μ g 1284::TnphoA respectivamente; las proteínas fueron separadas mediante electroforesis bidimensional. El gel fue revelado con plata. En (A) se muestra el patrón de las proteínas secretadas por *S. typhimurium* (CS). En (B) se muestra el patrón electroforético de las proteínas secretadas por *S. typhimurium* 1284::TnphoA. En círculos azules se muestra una proteína secretada tanto por *S. typhimurium* CS como por *S. typhimurium* 1284::TnphoA como referencia de comparación.

Secuencia de aminoácidos de la proteína STM1 499:

```

1 mmpgekqqtg vsrrtlvksa algslalaag gvslpfgmrt aaaavqqamr needkivwga
61 csvncgsrca lrlhvkdnv wvvetdntgd dvygnhqvra clrgrsirrr inhpdrlnyp
121 mkrvgrrgeg kferiswgea ldtisaslkk tvetygneav yihyssgivg gnitrsspaa
181 spvkrlmncy ggslnqygsy staqiscamp ytygsndgns tsdiensklv vmfgnnpaet
241 rmsgggitwf leqarersna rmividpryt dtaagredew ipirpgtdaa lvagiawvli
301 nenlvdqpfl dnycigydek tlpadappng hykayilggg edgiaktpqw ashitgipad
361 riiklareig svkpayicqg wgpqrqange qtaraiamp iltgnvgihg gnsaresty
421 titierlpvl enpvktaisc fswtdaiarg pentalrdgv rgdkkldvpi kflwnyagnt
481 linqhsdink theilqdeak cemivvidnf mtssakyadi llpdlmtveq ediipndyag
541 nmgylifigp attpkferkp iywvlseiar rlgddvyqrf tegrtqaqwl qylyakmqar
601 dpalpayddl kkmgiykrkd pnghfvaykk fredpqnpl ktpsgkieiy ssklahiast
661 welaegdvis plpiytpfte gwddpkrstf plqlfgfhyk srthssygni dvlqaacrqe
721 vwinpldaqk rgiangdkvr vfndrgevrl pakvtprilp gvsamgggaw hnadmagdki
781 dhgacintlt tlrpsplakg npqhtnlvei eki

```

Fig. 13. Secuencia de aminoácidos de la proteína STM1 499. Se escindió del gel bidimensional la proteína de peso molecular de 100 KDa y pI de 6.3 presente en el periplasma de *S. typhimurium* 1284::TnphoA (Ver Fig. 8B), y se identificó mediante MALDI-TOF. Esta proteína es una dimetil sulfóxido reductasa presente en *Salmonella typhimurium* LT2. En la figura se muestra la secuencia de aminoácidos de STM1 499.

Localización de STM1 499 en el genoma de *Salmonella typhimurium*:

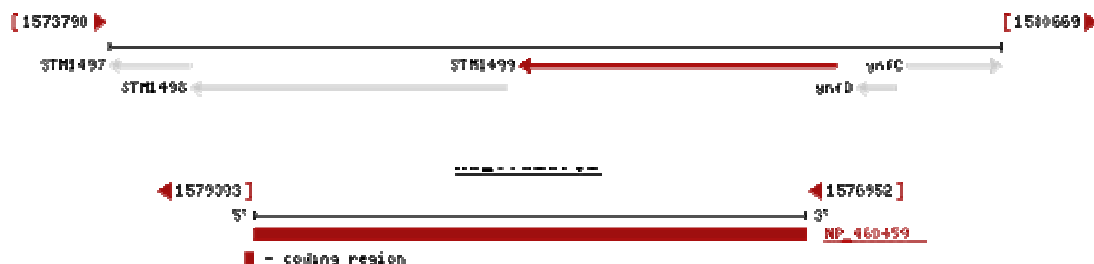


Fig. 14. Localización de STM1 499 en el genoma de *Salmonella typhimurium*. La localización de STM1 en el genoma de *S. typhimurium* se obtuvo el banco de genes de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). En rojo se muestra la localización del gen que codifica para la proteína STM1 499, en gris genes vecinos al gen que codifica a STM1 499.

Referencias:

1. Agudo D., Mendoza MT., Castañares C., Nombela C., Rotger R. 2004. A proteomic approach to study *Salmonella typhi* periplasmic proteins altered by a lack of the DsbA thiol: Disulfide isomerase. *Proteomics*. **4**:355-366.
2. Akeda Y. Galán JE. 2005. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature*. **437**: 911-915.
3. Alpuche-Aranda CM, Berthiaume EP, Mock B, Swanson JA, Miller SI. 1995. Spacious phagosome formation within mouse macrophages correlates with *Salmonella* serotype pathogenicity and host susceptibility. *Infect Immun*. **63**(11):4456-62.
4. Alpuche-Aranda CM., Racoosin EL., Swanson JA., Miller SI. 1994. Salmonellae stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J. Exp. Med.* **179**:601-608.
5. Alpuche-Aranda CM., Swanson JA., Loomis WP., Miller SI. 1992. *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. **89**:10079-10083
6. Ames FL., Nikaido K. 1976. Two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins. *Biochem*. **15** (3):616-623.
7. Ames FL. 1984. Simple, rapid, and quantitative release of periplasmic proteins by chloroform. *J. Bacteriol*. **160** (3):1181-1183.
8. Bader MW, Sanowar S, Daley ME, Schneider AR, Cho U, Xu W, Klevit RE, Le Moual H, Miller SI. 2005. Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell*. **122**(3):461-72
9. Bhan MK., Bahi R., Bathnagar S. 2005. Typhoid and paratyphoid fever. *The Lancet*. **366**:749-762.
10. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. **72**:248-254.
11. Buchmeier N., Heffron F. 1991. Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun*. **59**:2232-2238.
12. Calva E. 2002. *Salmonella typhi* y la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud pública. Instituto de Biotecnología, UNAM.

13. Corona-Romero A. 2005. Tesis. Comparación entre la virulencia de una mutante en la formación de fagosomas gigantes de *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium y la cepa silvestre en el modelo de fiebre tifoidea murino.
14. Conner S., Schmid S. 2003. Regulated portal of entry into cell. *Nature* **422**(6): 37-44
15. Cossart P., Sansonetti P. 2004. Bacterial invasion: The paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* **304**:242-248.
16. Crump J., Luby S. 2004. *Bulletin of the World Health Organization*. **82**(5):346-353.
17. Darwin K., Miller V. 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:405-428.
18. Ehrbar K., Winnen B., Hardt WD. 2006. The chaperone binding domain of SopE inhibits transport via flagellar and SPI-1 TTSS in the absence of InvB. *Mol. Microbiol.* **59**(1): 248–264
19. Foster, JW. 1991. *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response. *J. Bacteriol.* **173**:6896-6902
20. Galán JE., Curtiss R. 1989. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. **86**:6383-6387.
21. García-Vescovi E., Soncini FC., Groisman EA. 1996. Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell*. **84**:165-174.
22. Guo L., Lim KB., Poduje CM., Daniel M., Gunn JS., Hackett M., Miller SI. 1998. Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell*. **95**(2):189-98.
23. Gottlieb M., Chavko M. 1987. Silver staining of native and denatured eucaryotic DNA in agarose gels. *Anal Biochem.* **165**:33-37
24. Hardt WD., Chen LM., Schuebel K., Bustelo X., Galán JE., 1998. *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* **93**:815-826.
25. Holden., DW. 2002. Trafficking of the *Salmonella* vacuole in macrophages. *Traffic* **3**:161-169.
26. <http://www.dgepi.salud.gob.mx>

27. Jones B., Ghorri N., Falkow S. 1994. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J. Exp. Med.* **180**:15-23.
28. Klugman KP, Koornhof HJ, Robbins JB, Le Cam NN. 1996. Immunogenicity, efficacy and serological correlate of protection of *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccine three years after immunization. *Vaccine.* **14**:435–8.
29. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (5259):680-685.
30. Lamonica JM. 2005. Comparative secretome analysis of three *Bacillus anthracis* strains with variant plasmid contents. *Infect. Immun.* **36** (16):3646-3658.
31. Langer T. 2005. AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins. *TIBS* **25**:247-251.
32. Levine MM, Ferreccio C, Abrego P, Martin OS, Ortiz E, Cryz S. 1999. Duration of efficacy of Ty21a, attenuated *Salmonella typhi* live oral vaccine. *Vaccine* **17**(Suppl 2):S22–7.
33. Miller SI., Krukal A., Mekalanos J. 1989. A two component regulatory system (phoP/phoQ) controls *Salmonella* virulence and survival withing macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:5054-5058.
34. Miller SI. , Pegues D. 2000. *Salmonella* species including *Salmonella typhi*. In *Principles and Practices of Infectious Diseases*, ed GL Mandell, Je Bennet, R. Dolin **2**: 2344-2363. Livingstone, Philadelphia, USA. 5th ed.
35. Nichols BJ., Lippincott-Schwartz J. 2001. Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol.* **11** (10):406-12.
36. Ochman H., Soncini FC., Solomon F., Groisman EA. 1996. Identification of a pathogenecity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:7800-7804
37. O'Farrell PH. 1975. High resolution Two-Dimensional Electrophoreis proteins. *J. Biol.. Chem.* **193**:265-275.
38. Ohl M., Miller SI. 2001. *Salmonella*: A model for bacterial pathogenesis. *Ann. Rev. Med.* **52**:239-274.
39. Pegues D., Miller SI. 2000. *Salmonella* species including *Salmonella typhi* in *Principles and Practices of Infectious Diseases*. Livingstone, Philadelphia, USA. Vol. pp. 2344-2363

40. Ramírez-Aguilar ML. 2004. Tesis. La fagocitosis de *Salmonella* por macrófagos mediante macropinocitosis es esencial para la inducción de infección sistémica.
41. Renesto P., Azza S., Dolla A., Fourquet P., Vestris G., Gorvel JP., Raoult D. 2005. Proteome analysis of *Rickettsia conorii* by two-dimensional gel electrophoresis coupled with mass spectrometry. *FEMS Microbiol Lett.* **245** (2):231-8.
42. Rosales-Reyes R. 1998. Tesis. Inducción de linfocitos T CD 8⁺ citotóxicos por *Salmonella typhi* 9:12:Vi:d que expresa la Listeriolisina O de *Listeria monocytogens*.
43. Sampthkumar B. 2004. Treatment of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis with a sublethal concentration of trisodium phosphate or alkaline pH induces thermotolerance. *Appl. Env. Microbiol.* **70**(8): 4613-4620.
44. Sambasivarao D, Weiner JH. 1991. Dimethyl sulfoxide reductase of *Escherichia coli*: an investigation of function and assembly by use of in vivo complementation. *J Bacteriol.* **173**(19):5935-5943.
45. Schmidt M., Lupas A., Finley D. 1999. Structure and mechanism of ATP-dependent proteases. *Curr. Op. Chem. Biol.* **3**:584–591
46. Swanson JA, Watts C. 1995. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* **5**(11):424-428.
47. Urbán-Reyes ML. 2005. Tesis. Caracterización de un locus genético implicado en macropinocitosis, virulencia y sobrevivencia de *Salmonella typhimurium* en macrófagos.
48. Vázquez-Torres A, Jones-Carson J, Mastroeni P, Ischiropoulos H, Fang FC. 2000. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. *J Exp Med.* **192**(2):227-36.
49. Widal FM. 1896. Serodiagnostic de la fièvre typhoïde a-propos d'une modification par MMC Nicolle et al. Halipie. *Bull Soc Med Hop Paris.* **13**:561-566.
50. World Health Organization. 2003. Background document: The diagnosis, treatment and prevention of typhoid fever.

LISTA DE ABREVIATURAS:

CS	Cepa silvestre
FG	Fagosomas Gigantes
IEF	Isoelectroenfoque
kDa	Kilo Daltones
Kn	Kanamicina
LB	Luria Bertani
MALDI-TOF	Matrix Assited Lasser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (Espectrometría de masas asistida por una matriz láser de desorción/ionización)
MP	Macropinosomas
MPC	Macropinocitosis
<i>pags</i>	PhoP Activated Genes (Genes Activados por PhoP)
<i>phoPc</i>	Gen <i>phoP</i> expresado constitutivamete
pl	Punto Isoeléctrico
PMNs	Polimorfonucleares
<i>prgs</i>	PhoP Repressed Genes (Genes Reprimidos por PhoP)
rpm	Revoluciones por minuto
RTA	Respuesta de tolerancia al Ácido
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>S. typhi</i>	<i>Salmonella typhi</i>
SCV	<i>Salmonella</i> containing vacuole (Vacuola que Contiene a <i>Salmonella</i>)
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Poliacrylamide Gel Electrophoresis (Electroforesis en gel de poliacriamida-dodecil sulfato de sodio)
SPI	<i>Salmonella</i> Pathogenicity Island (Isla de Patogenicidad de <i>Salmonella</i>)
SSTIII	Secretion System Type III (Sistema de Secreción Tipo III)
Tn <i>phoA</i>	Transposón <i>phoA</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
USA	United States of America (Estados Unidos de América)