



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**Análisis de la regulación transcripcional del gen *stdA* de *Salmonella*
Enteritidis 49214**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

JULIO MANUEL MÉNDEZ ALEMÁN

Asesores:

DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ
M. en C. INDA MARCELA FIGUEROA OCHOA
DR. RICARDO OROPEZA NAVARRO



Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“Solo desde que dios yace en la tumba han vuelto ustedes a resucitar. Sólo ahora llega el gran mediodía, sólo ahora se convierte el hombre superior ¡en amo!”

“¡Bien! ¡Adelante! ¡Hombres superiores! Ahora es cuando gira la gran montaña del futuro humano. Dios ha muerto. Ahora nosotros queremos que viva el superhombre.”

“El hombre es malvado’. Así me dijeron, para consolarme, los demás sabios. ¡Ay, si eso fuera hoy verdad! Pues el mal es la mejor fuerza del hombre”

Friedrich Nietzsche

Dedicatoria

Este trabajo es el conjunto de las experiencias vividas con las personas que me han acompañado a lo largo de las victorias, derrotas y callejones sin salida. Por ello el trabajo está dedicado a todos aquellos que me acompañaron en el proceso de creación.

A mi madre y a mi padre que me enseñaron a nunca dejar de trabajar por lo que quieres y que sin ellos nunca hubiese podido terminar. A mi hermano que dentro de todo es el único que entiende mi cariño total por nuestros canes.

A mi familia que nunca dejo de creer en mí. Gracias a todos.

A mi madre académica Marce, espero nunca haberla decepcionado.

Pero sobre todo a Tormenta y a Kimba porque nunca fui el dueño que tanto pidieron que fuera; a Thor que siempre me acompañaste mientras estudiaba por las noches para aprender todo lo que siempre quise; a Kiba que siempre fuiste atenta, linda, siempre tranquila y tierna, te extraño; a Maggie que por poco que estuviste conmigo me hiciste tener más humildad y cuidado; y por último a Kohle, Kuma y Carlota espero que nos queden muchos años juntos mis cachorras.

Agradecimientos

Al Departamento de Microbiología e Inmunología del que he recibido muchas enseñanzas y la oportunidad más importante de desarrollo que he obtenido hasta ahora.

Al doctor Antonio Verdugo que siempre creyó en el trabajo, aun cuando parecía que nunca acabaría.

A la doctora Marcela Figueroa que siempre tuvo una fe inquebrantable en que podría terminar la tesis. “Gracias madre académica”.

Al doctor Ricardo Oropeza que siempre me ayudó a seguir en la tesis, porque siempre tuvo la paciencia de ayudarme en los experimentos de expresión nunca se desesperó con los resultados que se fueron obteniendo. Espero no se haya aburrido mucho Doc.

A la señora Francisca que siempre me ayudó con todo lo que fui necesitando en el laboratorio, por las pláticas extracurriculares que tuvimos, gracias.

A los integrantes del laboratorio de Microbiología Molecular de todas las generaciones con las que tuve el honor de convivir. Siempre les tuve un cariño muy grande, aunque casi nunca conviviese mucho con ustedes. Siempre aprendí de todos. Gracias.

A todas aquellas personas que fueron mis alumnos, amigos y que al final me ayudaron a trabajar como profesor y de los cuales ahora he visto que se han desarrollado.

A la doctora María Antonieta por creer en mí para dar clases en las clases prácticas de bacteriología.

A la doctora Fabiola por ser una excelente maestra en prácticas de virología, pero por su apoyo durante todo el tiempo de la tesis.

Ahora si los agradecimientos el regimiento latoso del LMM. A Diana por brindarme tu amistad y ayudarme a aprender la tolerancia a otros mundos e ideas. A Liliana porque

nunca te callabas y eso hacía más divertida la vida en el laboratorio, aún más por tu extraña forma de olvidar todo; recuerda eres la hermana mayor que nunca quise tener, pero pues ya llegaste. A Cloé porque en tu extraña creencia que si el mundo fuese como tu sería mejor (más torpe); me daba cuenta de lo bien que estábamos todos. Pero aun así eres una persona muy interesante de conocer, gracias por las pláticas raras. A Salvador gracias por trabajar conmigo y dejarme ser tu asesor, fue muy divertido durante todo el tiempo. Aunque algunas veces era una lucha interminable de necesidad e hiperactividad. A Rodrigo que siempre me ayudaste mientras intentábamos las clonaciones que parecían nunca acabarse. Porque contigo siempre pude platicar de temas que los demás no entendían. A Isaac contigo amigo siempre me entendí mejor que con nadie, además fuiste el primer alumno que llegó a ayudarme al laboratorio.

Índice

1. EPIDEMIOLOGÍA	2
1.1. Datos en humanos	2
1.2. Datos en animales y subproductos	4
2. <i>SALMONELLA</i>	5
2.1. <i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> serovariedad Enteritidis.	5
3. PARATIFOIDEA AVIAR	6
3.1. Paratifoidea en animales adultos.	6
3.2. Paratifoidea en animales jóvenes.	6
4. PATOGENIA	7
5. PATOGÉNESIS MOLECULAR	11
6. ADHERENCIA	15
6.1. LPS	16
6.2. Flagelo	16
6.3. Adhesinas no fimbriales	17
7. FIMBRIAS	18
7.1. Sistema secreción general o pili tipo IV.	19
7.2. Sistema enucleación/precipitación.	19
7.3. Camino alternativo de las chaperonas.	20
7.4. Sistema clásico chaperona/acomodador	20

8. FIMBRIA STD	21
9. REGULACIÓN DE STD	22
10. JUSTIFICACIÓN	24
11. HIPÓTESIS	25
12. OBJETIVO GENERAL	26
13. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
14. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	27
15. MATERIALES Y MÉTODOS.	28
15.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.	28
15.2. Predicción digital de promotores	29
15.3. Iniciadores	29
15.4. Ensayos de PCR	30
15.5. Vector de clonación	34
15.6. Extracción de ADN Genómico de <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 49214	35
15.7. Extracción de ADN plasmídico	36
15.8. Células electrocompetentes	36
15.9. Predicciones digitales y ensayos de restricción	37
15.10. Protocolos de Clonación	38
15.11. Secuenciación del plásmido pJM13	39
15.12. Cinética de crecimiento de SEpJM13	39
15.13. Ensayo de expresión de la fusión transcripcional del reportero CAT.	40
15.13.1. Pre-Inóculos	40
15.13.2. Cultivos	40

16. RESULTADOS	46
16.1. Predicción digital de Promotores del operón <i>stdABCDEF</i> y diseño de iniciadores.	46
16.2. Extracción de ADN Genómico de <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 49214.	51
16.3. PCR del <i>Promotor stdA</i> .	52
16.4. Predicciones digitales y ensayos de restricción del <i>Promotor stdA</i> .	53
16.5. Extracción de ADN del plásmido pKK232/Tet.	55
16.6. Clonación del <i>Promotor stdA</i> en el plásmido pKK232/Tet y transformación en DH5 α	55
16.7. PCR del <i>Promotor stdA</i> y secuenciación del plásmido pJM13 en DH5 α	59
16.8. Transformación del plásmido pJM13 en <i>Salmonella</i> Enteritidis 49214	63
16.9. Predicciones digitales, ensayos de restricción con <i>DraI</i> , <i>BamHI</i> y <i>HindIII</i> ; y PCR del plásmido pJM13 en <i>Salmonella</i> Enteritidis 49214.	63
16.10. Estandarización de las condiciones de cultivo.	70
16.10.1. Volúmenes de medio 5ml y 10ml	71
16.10.2. Velocidades de agitación 100 rpm y 150 rpm	71
16.10.3. Medios de cultivo a pH 7.4	72
16.11. Cinética de crecimiento de 8 h de SEpJM13 en WM	72
16.12. Ensayos de expresión en los medios de cultivo M9M, LB, DMEM y WM	73
16.13. Ensayos de expresión de CAT a 3 temperaturas de crecimiento 30, 37 y 42 °C en medio LB y WM	76
16.14. Ensayos de expresión de CAT en diferentes concentraciones de FeCl en medio LB y WM a 42 °C	78
16.15. Ensayos de expresión de CAT en diferentes concentraciones de FeCl en medio LB y WM a 42 °C	80
17. DISCUSIÓN	82
18. CONCLUSIONES	88
19. PROSPECTIVA	89

20. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
21. ANEXO DE MEDIOS DE CULTIVO	102
22. ANEXO DE SOLUCIONES	104

Índice de figuras

Figura 1 Patogenia de SE en aves. Vía de transmisión oral fecal _____	9
Figura 2 Patogenia de SE en aves. Vía de transmisión vertical _____	10
Figura 3 Patogénesis molecular de Salmonella en enterocitos _____	15
Figura 4 Sistemas de estructuración fimbrial _____	18
Figura 5 Simulación de una PCR de la secuencia del Promotor <i>stdA</i> _____	31
Figura 6 Simulación de una PCR del Promotor <i>stdA</i> clonado en SE pJM13 con los iniciadores pKK-F y pKK-R _____	33
Figura 7 Simulación de una PCR del gen TCR que se encuentra en el plásmido pKK232/Tet _____	33
Figura 8 Mapa del vector pKK232/Tet _____	34
Figura 9 Representación gráfica del orden de las muestras para la cuantificación de proteínas totales ____	44
Figura 10 Representación gráfica del orden de las muestras para la cuantificación de la actividad de CAT _	45
Figura 11 Secuencia de la región corriente arriba del operón fimbrial <i>Std</i> _____	47
Figura 12 Resultados del alineamiento de los iniciadores en el Primer Blast _____	50
Figura 13 Predicción digital del amplificado de la PCR del <i>Promotor stdA</i> con las regiones promotoras sugeridas por el Bprom _____	51
Figura 14 Extracción de ADN genómico de SE49214 _____	52
Figura 15 PCR del <i>Promotor stdA</i> _____	53
Figura 16 Predicción electroforética del ensayo de restricción con <i>DraI</i> , <i>KpnI</i> y <i>PvuI</i> para el amplificado del <i>Promotor stdA</i> _____	54
Figura 17 Ensayo de restricción para el amplificado del <i>Promotor stdA</i> con <i>DraI</i> , <i>KpnI</i> y <i>PvuI</i> _____	55
Figura 18 Extracción de ADN plasmídico del vector pKK232/Tet _____	55
Figura 19 Predicción digital del ensayo de doble digestión con las enzimas <i>BamHI</i> y <i>HindIII</i> para el vector pKK232/Tet _____	56
Figura 20 Ensayo de doble digestión con las enzimas <i>BamHI</i> y <i>HindIII</i> para el vector pKK232/Tet ____	57
Figura 21 Representación gráfica de los patrones de sembrado utilizados en la doble selección de clones ____	58
Figura 22 Extracciones de plásmido de las clonas obtenidas por la doble selección _____	59
Figura 23 PCR del <i>Promotor stdA</i> de las clonas C3JM12, 13 y 15 _____	60
Figura 24 Mapa del vector pJM13 _____	61
Figura 25 Alineación digital de las secuencias obtenidas usando el iniciador delantero y reversa para el <i>Promotor stdA</i> con el plásmido pJM13 _____	62
Figura 26 Mapa del vector pJM13 con el alineamiento de la secuenciación del amplificado <i>Promotor stdA</i> _	63
Figura 27 Predicción electroforética del ensayo de restricción para el plásmido pJM13 con <i>DraI</i> _____	64

Figura 28	Ensayo de restricción para el plásmido pJM13 con <i>DraI</i> _____	65
Figura 29	Predicción del ensayo de restricción para el plásmido pJM13 con <i>BamHI</i> y <i>HindIII</i> _____	66
Figura 30	Ensayo de restricción para el plásmido pJM13 <i>BamHI</i> y <i>HindIII</i> _____	67
Figura 31	Predicción virtual de la PCR del <i>Promotor stdA</i> del plásmido pJM13, el gen TCR del plásmido pKK232/Tet y del <i>Promotor stdA</i> cromosómico de SEpJM13 _____	68
Figura 32	PCR del <i>Promotor stdA</i> del plásmido pJM13, del gen TCR del plásmido pKK232/Tet y del <i>Promotor stdA</i> cromosómico de SEpJM13 _____	68
Figura 33	Predicción digital del ensayo de restricción con <i>DraI</i> y <i>KpnI</i> para el amplificado del pJM13 usando los iniciadores pKK-F y pKK-R _____	69
Figura 34	Ensayo de restricción con <i>DraI</i> y <i>KpnI</i> para el amplificado del pJM13 usando los iniciadores pKK-F y pKK-R _____	70
Figura 35	Gráfica de las DO a 600 nm de SEpJM13 en los 2 protocolos de crecimiento _____	73
Figura 36	Niveles de expresión de CAT de SEpJM13 crecidas por 6 h en medios M9MM, LB, DMEM y WM con pH de 7.4 a 37 °C a 100 rpm _____	75
Figura 37	Niveles de expresión de CAT en medios LB y WM a pH 7.4 a 30 °C, 37 °C y 42 °C _____	78
Figura 38	Niveles de expresión de CAT en medios WM y LB a pH 7.4 a 42 °C con diferentes concentraciones de FeCl ₃ -6H ₂ O _____	80
Figura 39	Niveles de expresión de CAT en medios WM y LB a pH 7.4 a 42 °C con diferentes concentraciones de lisina. _____	81

Índice de cuadros

Cuadro 1	Reactivos y concentraciones para la PCR de la región intergénica del gen <i>stdA</i> _____	31
Cuadro 2	Reactivos y concentraciones para la PCR del sitio múltiple de clonación de pKK232/Tet _____	32
Cuadro 3	Predicción de promotores utilizando el software Bprom de la compañía Softberry _____	48
Cuadro 4	Predicción de promotores utilizando el software Bprom de la compañía Softberry _____	48
Cuadro 5	Iniciadores diseñados con el programa DNAMAN _____	49

Abreviaturas

Grados celsius o centígrados	°C
Pares de bases	pb
Molar	M
Milimolar	mM
Micromolar	μM
Gramo	g
Microgramo	μg
Nanogramo	ng
Revoluciones por minuto	rpm
Hora u horas	h
Minutos	'
Segundos	''
Prima	`
Micro Faraday's	μF
Ohms	Ω
Kilovoltios	Kv
Porcentaje	%
Picomoles	pmol
Potencial de hidrógeno	pH
Coenzima A	CoA
Mili Q	MQ
Libras	lb
Litro o litros	L
Mililitros	ml
Microlitros	μl
Fuerza centrífuga relativa	rcf

Resumen

Méndez-Alemán Julio Manuel. Análisis de la región transcripcional del gen *stdA* *Salmonella* Enteritidis 49214. (Bajo la dirección de: Dr. Antonio Verdugo Rodríguez, M. en C. Inda Marcela Figueroa Ochoa y Dr. Ricardo Oropeza Navarro)

La salmonelosis es una enfermedad de distribución mundial causada por bacterias del género *Salmonella* que afecta a humanos, mamíferos, aves y reptiles. La Organización Mundial de la Salud, la Autoridad Europea de Sanidad Alimentaria; y la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos la consideran una de las principales enfermedades transmitidas por alimentos. Se reporta que *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE) es la principal serovariedad asociada a la enfermedad en humanos, teniendo como principal fuente de infección el huevo y sus subproductos. Para todo proceso infeccioso, los microorganismos patógenos deben entrar en contacto con su célula o tejido diana; a este proceso se le conoce como adhesión. La adherencia de SE es dependiente de diferentes estructuras que sobresalen de la membrana externa de la bacteria. Las fimbrias son sistemas especializados en la adhesión, SE tiene en su cromosoma 13 operones, que codifican para estas estructuras proteicas. Se ha reportado que las fimbrias Fim y Csg se expresan *in vitro*. Solo en los ensayos *in vivo* se ha podido demostrar la función de cada uno de estos operones. Std es una fimbria perteneciente al sistema chaperona/acomodador, el operón que codifica para la fimbria es ortólogo y policistrónico para el género *Salmonella* y se ha demostrado su actividad en ensayos con aves. Se demostró que la expresión del gen *stdA* en *Salmonella* Typhimurium (ST) se encuentra regulada negativamente por Dam, SeqA y RosE, mientras que su regulación positiva es dependiente de HdfR; además de que el operón *stdABCDEF* regula negativamente a la isla de patogenicidad 1 de ST. El objetivo de este trabajo fue determinar si la modificación de las condiciones ambientales *in vitro*, como: pH, tipo de medio de cultivo, temperatura y concentraciones crecientes de hierro o lisina; permitían la expresión del gen *stdA*, por medio de una fusión reportera con el gen *cat*. Se demostró la actividad específica de CAT en la cepa SEpJM13, utilizando el protocolo de crecimiento 16 h/6 h en los medios Waymouth (WM) y Luria-Bertani (LB) en donde se reporta una diferencia del 200 % entre los medios. Además, se probó que la actividad de CAT se reduce a diferentes temperaturas desde los 30 °C hasta los 42 °C, los medios WM y LB solo muestran diferencias importantes en la expresión de CAT, en las temperaturas de 30 y 42 °C. Se demostró que el FeCl₃-6H₂O a concentraciones de 250-1000 µM mejora la expresión de la fusión reportera en el WM en un 800 % comparándola con el LB control. Se reportó que las concentraciones crecientes de lisina (250-1000 µg) no modifican la expresión de la fusión reportera para ninguno de los dos medios (WM y LB) comparándolos con los medios control. Con estos resultados se puede inferir que el uso del medio WM a 42°C suplementado con FeCl₃-6H₂O en concentraciones mayores de 250 µM podría permitir la expresión del gen *stdA* en el cromosoma de SE.

1. Epidemiología

1.1. Datos en humanos

La salmonelosis es una de las principales enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), que afectan al humano. Las especies y serovariedades no tifoidales del género *Salmonella* se consideran las causas de diarrea severa en humanos de mayor repercusión a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en el año 2010, las enfermedades diarreicas causaron 230,000 muertes de humanos en todo el mundo (Havelaar *et al.*, 2015).

Salmonella enterica subespecie *enterica* serovar Enteritidis (SE) se ha convertido en una de las serovariedades más aisladas en humanos, animales y en subproductos destinados al consumo; tanto por los sistemas de salud como por los de inocuidad alimentaria. Debido a su distribución globalizada existen diferentes organizaciones como la OMS, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (por sus siglas en inglés EFSA), los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (por sus siglas en inglés CDC), entre otras; que se dedican al monitoreo de *Salmonella* Enteritidis además de publicar los datos que se obtengan de la vigilancia epidemiológica.

De acuerdo con los datos recopilados por la OMS en el 2010, la media global de aislamientos de salmonelas no tifoidales en humanos es de 78,707,591 en todo el mundo, de los cuales 59,153 se reportaron como casos fatales ([WHO] World Health Organization, 2015; Havelaar *et al.*, 2015)

“Para el año 2014 los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades Europeo (por sus siglas en inglés ECDC) y la EFSA reportan 88,175 casos confirmados, en 28 miembros de la Unión Europea. Resultando en un rango de 23.4 casos por cada 100,000 habitantes, lo cual representa un aumento de 15.3% con respecto al año anterior” ([EFSA] European Food Safety Authority, 2016). Las serovariedades más aisladas en este año fueron *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium, con un porcentaje de aislamientos de 44.4% y 17.4% respectivamente ([EFSA] European Food Safety Authority, 2016).

En Estados Unidos de América los CDC por medio de su Laboratorio de Vigilancia de Enfermedades Entéricas (por sus siglas en inglés LEDS), notificaron en su reporte nacional de vigilancia 45,735 casos en humanos correspondientes al año 2013. Esto representa un 7% menos que los casos reportados el año anterior, con una incidencia de 14.5 casos por cada 100,000 habitantes. De los 45,735 casos en el 2013, las serovariedades con el mayor número de casos reportados fueron *Salmonella* Enteritidis con 6,928 y *Salmonella* Typhimurium con 5,853 ([LEDS] The Laboratory-based Enteric Disease Surveillance, 2016). Se estima que el costo de esta enfermedad, producida por *Salmonella*, en los Estados Unidos fue de \$3,666,600,031 dólares para el año 2013 ([ERS] Economic Research Service, 2013).

En México el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) por medio del boletín epidemiológico reporta 76,708 casos en humanos de salmonelosis, en toda la República Mexicana para el año 2015 ([SINAVE] Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2016). Estudios epidemiológicos realizados en cuatro estados de México por Zaidi *et al.* indicaron que *Salmonella* Enteritidis ocupa el segundo lugar entre las serovariedades aisladas de humanos y que los pollos son el principal reservorio de la

bacteria (Zaidi *et al.*, 2006, 2008, 2012; Zaidi, Macías & Calva, 2006; Leon, Michell & Chaussabel, 2013) .

1.2. Datos en animales y subproductos

La Unión Europea (por sus siglas en inglés, EU) reporta por medio de la EFSA que en el año 2014 la prevalencia de *Salmonella* en parvadas (incluyendo a aves de postura, pollos de engorda y en pavos) fue menos del 1%. Mientras que la carne de pavo (3.5%) y la carne de pollo (2.2%) tuvieron las proporciones más altas en muestras individuales. Se considera que, a pesar que en el huevo se detectó *Salmonella* en menor proporción en muestras individuales (0.3%) y en muestras de lote (1%), este producto sigue siendo la causa más importante de contaminación alimentaria en la EU ([EFSA] European Food Safety Authority, 2016) .

En Estados Unidos de América los CDC informan para el año 2014, por medio de su reporte anual de Vigilancia Epidemiológica para Brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos, 369 brotes. *Salmonella* fue confirmada en 11 brotes de aves provocando 227 casos de enfermedad en humanos ([CDC] Centers for Disease Control and Prevention, 2014).

En México no hay datos reportados acerca de la contaminación alimentaria por SE en los sistemas de inocuidad alimentaria. Sin embargo investigaciones realizadas en nuestro país, muestran que la tendencia de aislamientos de SE de productos aviáres se mantiene desde el año 2000 hasta la fecha (Cogco *et al.*, 2000).

2. *Salmonella*.

Salmonella es un bacilo Gram negativo que pertenece a la familia *Enterobacteraceae*, intracelular facultativo, móvil por flagelos peritricos, no esporula y por sus requerimientos atmosféricos se clasifica como anaerobio facultativo. El género *Salmonella* tiene dos especies reconocidas que son *S. bongori* y *S. enterica*; siendo *S. enterica* la que afecta a los humanos. Se han identificado seis subespecies de *S. enterica* que son: (I) *enterica*, (II) *salamae*, (IIIa) *arizonae*, (IIIb) *diarizonae*, (IV) *indica* y (VI) *houtenae*. Existen más de 2500 serovariedades solo de la especie *enterica* en todo el mundo, clasificadas por su composición antigénica externa dada por el lipopolisacárido (LPS), el flagelo y en algunos casos la capsula (Tindall *et al.*, 2005; Grimont & Weill, 2007). Fermentan la glucosa; frecuentemente con la producción de gas como subproducto, reducen los nitratos a nitritos, descarboxilan la lisina y la ornitina, y son negativos a la prueba de oxidasa. (Barrow & Feltham, 2003; Garrity, 2005)

2.1. *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovariedad Enteritidis.

SE es el responsable de la patratifoidea aviar y es la única de las serovariedades que contamina el huevo de manera rutinaria utilizando como vía de transmisión la transovárica. Así mismo puede contaminar la carne de aves de engorda, como los pollos y los pavos. Después de las primeras tres semanas de vida, la patogenicidad de SE disminuye, por lo que los animales quedan como portadores asintomáticos de la enfermedad lo que ocasiona que se contamine el huevo destinado para consumo humano.

Ya que el huevo ha sido identificado como la fuente más importante de las infecciones derivadas por SE, se han ideado métodos para el control y la detección del huevo contaminado: como la selección de líneas libres de SE, la selección de cruzas entre animales pertenecientes a las líneas ligeras sensibles con las líneas pesadas que han mostrado una menor sensibilidad a las infecciones y el diagnóstico de las parvadas para la eliminación de los animales positivos, pero aún con todas estas medidas las diferentes organizaciones encargadas de la vigilancia epidemiológica mencionan que SE se mantiene como el primer lugar de las salmonellas no tifoidales (EFSA, 2014).

3. Paratifoidea Aviar

Se caracteriza por ser una infección asintomática, con persistencia en tracto intestinal y en órganos internos. Se ha reportado, que existen diferencias en la virulencia de las cepas de SE, ya que algunas pueden ser letales para animales jóvenes (menos de 21 días) y otras pueden contaminar el huevo destinado al consumo. Se sabe también que el fagotipo 4 se encuentra asociado a una mayor capacidad de invasividad (Barrow, 2000a; Wallis & Barrow, 2005; Blackall & Soriano-Vargas, 2013; Chousalkar & Gole, 2016).

3.1. Paratifoidea en animales jóvenes.

A diferencia de los animales adultos los pollos jóvenes son más susceptibles a SE, ya que desde la contaminación del huevo, los embriones pueden morir sin llegar a eclosionar o justo después que salen del huevo.

En aquellos animales que sobreviven a la infección del huevo o que se infectan a los primeros días de nacidos, se pueden presentar los signos clásicos de la paratifoidea: pérdida

de peso, anorexia, emaciación, crecimiento retardado, somnolencia progresiva, alas caídas, plumas erizadas, escalofríos, diarrea y deshidratación. En ocasiones puede provocar ceguera y pérdida de las uñas (Barrow, 2000b; Wallis & Barrow, 2005; Swayne, 2013; Chousalkar & Gole, 2016).

Puede provocar lesiones como enteritis, hepatomegalia, esplenomegalia, nefromegalia además de procesos inflamatorios en ovario y oviducto. De forma ocasional puede provocar peritonitis, artritis purulenta, neumonía, poliserositis, tiflitis y saculitis (Barrow, 2000b; Wallis & Barrow, 2005; Swayne, 2013; Chousalkar & Gole, 2016).

3.2. Paratifoidea en animales adultos.

La paratifoidea aviar en pollos adultos tiene una morbilidad y una mortalidad inconsistente. En animales inoculados de manera experimental, se logró aislar a SE de tejidos como el hígado, bazo, ovario, oviducto, corazón y del peritoneo. También se detectó que un 74% de los huevos se encontraban contaminados con SE (Barrow, 2000a; Wallis & Barrow, 2005; Blackall & Soriano-Vargas, 2013; Chousalkar & Gole, 2016). Se ha reportado que la temperatura media de las aves de 42 °C puede actuar como una barrera que impide que SE exprese su isla de patogenicidad I (SPI I) la cual le permite invadir células no fagocíticas y con ello diseminarse en el hospedero. (Troxell *et al.*, 2015)

4. Patogenia

Se han reportado dos vías de transmisión para SE, la vía horizontal en la cual la bacteria utiliza la ruta oral fecal para infectar a un hospedero, principalmente por la contaminación de alimentos y del agua de bebida con heces; y la vía vertical, en la cual utiliza una ruta

transovárica, SE es capaz de diseminarse en el organismo de las aves mediante la infección y migración de macrófagos, llegar al tracto reproductor de estas y mediante sus sistemas de adherencia específicos o fimbrias, persistir en diferentes secciones del aparato reproductor de las aves desde los ovarios hasta la vagina, lo que puede ocasionar la contaminación del huevo.

En la transmisión horizontal SE entra mediante la ingesta de alimento y agua contaminada con heces, pasa por esófago, llega al proventrículo y el estómago muscular (molleja) en donde la bacteria es capaz de sobrevivir a los cambios ambientales (pH ácido y pepsina estomacal) que ocurren en estos órganos, gracias a diferentes mecanismos moleculares que expresa la bacteria. SE sigue su ruta de infección, a través de las primeras dos secciones del intestino delgado (duodeno y yeyuno) resistiendo a los cambios osmóticos, de pH, enzimáticos y a la microbiota intestinal. Ya en el íleon la bacteria se adhiere a sus células blanco con la ayuda de diferentes estructuras presentes en su membrana externa como son el flagelo (Allen-Vercoe & Woodward, 1999; Crawford, Reeve & Gunn, 2010), el lipopolisacarido (LPS), fimbrias, pilis y adhesinas. Se reporta también que la bacteria puede colonizar los ciegos de las aves. Una vez que la bacteria ha generado contacto con la célula no fagocítica da inicio al proceso de internación mediado por un sistema proteico, denominado inyectosoma, que transloca proteínas efectoras para modificar la actividad celular y permitir la entrada de SE al enterocito. La internación de la bacteria da como resultado la formación de una vacuola contenedora de Salmonella (SCV), desde este organelo membranoso, SE transloca mediante otro inyectosoma, nuevos efectores que actúan como toxinas, segundos mensajeros celulares, mediadores del tránsito celular, etc. Posteriormente puede ocurrir la liberación de la bacteria directamente a la lámina propia del intestino y generar la destrucción del tejido, una respuesta inflamatoria y quimiotáctica de

células polimorfonucleares (PMN) ocasionada por la secreción de IL-8 (Barrow, 2000a; Wallis & Barrow, 2005) . *Salmonella* puede provocar la pérdida de líquidos celulares mediante diarrea, ésta se genera por un aumento del inositol-fosfato en la célula, que modifica la permeabilidad de la membrana con lo que se expulsa Cl^- y con este elemento sale el agua de la célula provocando la diarrea. Cuando hay lisis celular del epitelio intestinal, las bacterias son liberadas y arrastradas por las heces hacia el exterior (figura 1).

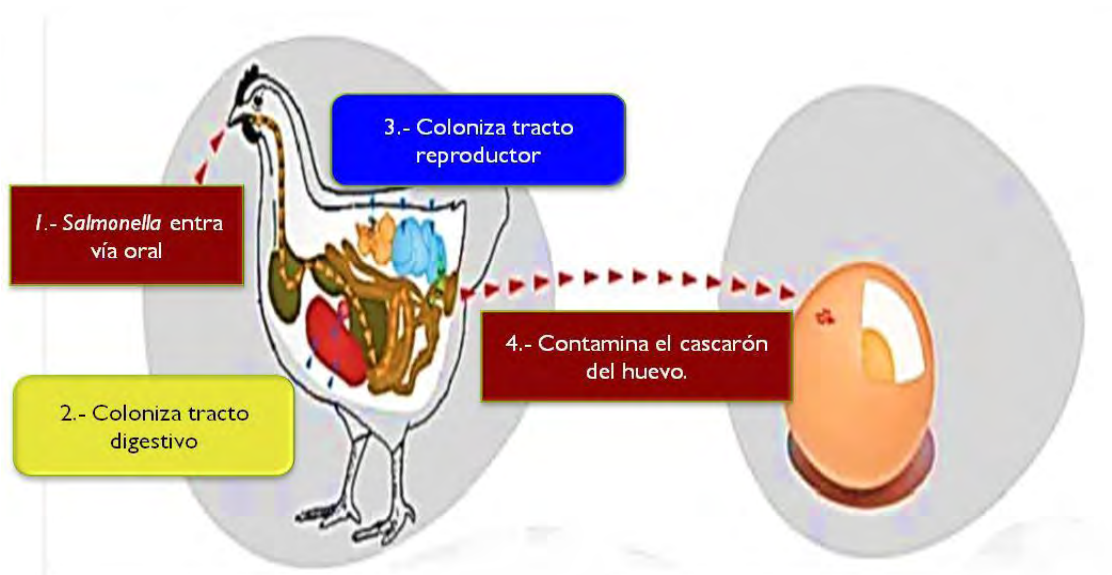


Figura 1. Patogenia de SE en aves. Vía de transmisión oral fecal modificada de Gantois *et al.*, 2009

Existen reportes de que SE contamina el huevo a través de una vía vertical, mediada por la migración de macrófagos infectados con la bacteria al aparato reproductor, en la cual se ven involucradas todas las regiones que componen el aparato reproductor de las aves. La contaminación del cascarón en el momento de la ovoposición puede llevar a la contaminación interna del huevo; se ha reportado que la bacteria es capaz de atravesar el cascarón debido a lesiones o fisuras microscópicas en éste, así como por el cambio de temperatura entre el ave (42 °C) y el medio ambiente (25 °C) con lo cual se genera una presión negativa que empuja a la bacteria al interior del huevo. Existen reportes de que

Salmonella puede usar las heces como reservorio o fuente nutricional para mantenerse adherida al huevo por cierto tiempo (Gantois *et al.*, 2009).

Varias líneas de investigación reportan que SE es capaz de colonizar diferentes secciones del órgano reproductor de las aves con lo que la bacteria puede presentar diversas localizaciones en las estructuras que conforman el huevo (figura 2). SE es la única serovariedad que puede replicarse en el ovario de las aves. Diferentes autores indican que SE ha sido aislada con mayor frecuencia de folículos inmaduros en comparación con aquellos que ya se encuentran en un estado maduro más avanzado. Existe evidencia de que la bacteria puede invadir y multiplicarse dentro de las células de la granulosa, mientras que otros trabajos reportan que la bacteria puede mantenerse adherida a las membranas vitelinas del huevo. Existen reportes que indican que la estructura del huevo que presenta mayor contaminación es la albumina, lo cual indicaría la presencia de SE a lo largo del oviducto (De Buck *et al.*, 2004; Gantois *et al.*, 2009; Guard, Gast & Guraya, 2010). Otros autores centran sus estudios en la contaminación del huevo al momento de la ovoposición, por lo que se centran en la vagina como sitio de persistencia de la bacteria (Gantois *et al.*, 2009).



Figura 2. Patogenia de SE en aves. Vía de transmisión vertical modificada de Gantois *et al.*, 2009

5. Patogénesis molecular

Después de la entrada de *Salmonella* por vía oral y su paso por el esófago, la bacteria se enfrenta a condiciones ambientales adversas en el estómago. El pH ácido del compartimento gástrico, así como las enzimas digestivas que se secretan en el medio estomacal, funcionan como mecanismos de defensa en contra de *Salmonella*. Sin embargo la bacteria expresa diferentes genes por medio de los cuales puede contrarrestar estas barreras fisiológicas, como son los sistemas de dos componentes PhoQ/PhoP o reguladores generales como Fur, que permiten que la bacteria resista diferentes condiciones ácidas. Otros genes involucrados permiten la utilización de bombas de protones que secretan el exceso de iones del citoplasma, así como el metabolismo de descarboxilación de lisina y arginina que permite el aumento del pH intracelular, entre otros (Hall & Foster, 1996; Bearson *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 2016).

En el tracto intestinal, la bacteria debe resistir a otros mecanismos fisiológicos inherentes al proceso de digestión, a diferentes condiciones osmóticas, de oxigenación, entre otras. Las sales biliares representan una amenaza a la estabilidad celular de *Salmonella*, ya que su actividad detergente puede desestabilizar la membrana, generar daño al ADN de la bacteria o a las estructuras de ARN encargadas del metabolismo de traducción y a las proteínas del citoplasma provocando su desnaturalización. *Salmonella* expresa diferentes mecanismos moleculares, mediante los cuales disminuye los efectos adversos a los que se enfrenta en el ambiente intestinal. Se ha reportado que el LPS es indispensable para la resistencia a las sales biliares, ya que la pérdida de la cadena “O” genera mutantes rugosas sensibles a la acción de la bilis. El daño al ADN inicia la activación de los genes regulados por OxyR y

SoxRS (*dps*, *nfo*, *katC* y *fumC*) sugiriendo que la bilis tiene un efecto oxidativo sobre la bacteria. También se ha reportado que *Salmonella* puede sobrevivir en la vesícula biliar, esto de manera intracelular así como de forma extracelular con la formación de biopelículas. (Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2011)

La adhesión bacteriana es necesaria para contrarrestar el peristaltismo intestinal y así dar comienzo a la colonización del tejido, con la posibilidad de diseminación en todo el sistema orgánico del hospedero. Para que *Salmonella* pueda mantener un estrecho contacto con los enterocitos y las células M en las placas de Peyer, expresa diferentes operones fimbriales que se encuentran distribuidos por toda la extensión de su cromosoma y que pueden variar en cantidades o en los tipos de fimbria para los que codifican; de acuerdo con la serovariedad de la que se trate. Clayton *et al.*, 2008 realizaron el análisis *in silico* de las secuencias genómicas de diferentes serovariedades de salmonelas que fueron clasificadas como específicas de especie (*Salmonella Gallinarum* específica de aves, *Salmonella Typhi* específica de humanos), salmonelas generalistas (*Salmonella Typhimurium* y *Salmonella Enteritidis*) y una salmonella intermedia en especificidad (*Salmonella Cholerasuis*); se encontró que las diferentes serovariedades presentan al menos 11 operones fimbriales con los que podría llevar a cabo la adhesión a diferentes sustratos celulares. Sin embargo, también mencionan que las serovariedades específicas de hospedero presentan pseudogenes en alguno de los componentes del operón que no permiten la expresión del sistema fimbrial; con lo cual el número real de operones disminuye a menos de la mitad. Esto indica que la especialización de las serovariedades a los diferentes hospederos, así como los ligandos que cada uno presenta en el lumen intestinal, ha hecho que las serovariedades generalistas mantengan la mayor cantidad de operones sin mutaciones; a diferencia de las

serovariedades específicas de hospedero en donde los operones han sufrido mutaciones que evitan su expresión. (Clayton *et al.*, 2008b).

A pesar de que SE y ST tiene en su cromosoma 13 operones dedicados a la producción de fimbrias; no se ha podido demostrar su síntesis *in vitro* bajo las condiciones de crecimiento estándar de laboratorio, a excepción de las fimbrias Csg y Fim que son necesarias para la formación de las biopelículas y lo sobrevivencia de la bacteria a condiciones adversas de crecimiento. Lo que se conoce de las fimbrias, a cerca de su actividad o de sus ligandos se ha conseguido por medio de ensayos *in vivo* en los cuales se ha demostrado que las fimbrias Csg, Fim, Sef y Lpf son necesarias para la persistencia de la SE en pollos de 18 días (Clayton *et al.*, 2008b), mientras que en ratones ocurre una atenuación de ST si los mismo cuatro operones son eliminados de manera simultánea (Velden *et al.*, 1998). Con estos resultados se concluye que la mutación de un operón fimbrial no disminuye la capacidad que tiene la bacteria de invadir a diferencia de la mutación en los cuatro operones la cual produce una atenuación de veintiseis veces comparada con la cepa silvestre (Velden *et al.*, 1998; Clayton *et al.*, 2008b).

López-Garrido & Casadesús, 2012 reportaron que los genes *stdE* y *stdF* del operón de la fimbria Std regulan negativamente la actividad de HilD que es uno de los tres reguladores principales de la isla de patogenicidad 1 (SPI 1 por sus siglas en inglés) que codifica para el sistema de secreción tipo 3 (SST III por sus siglas en inglés) o inyectosoma que permite que la bacteria invada células no fagocíticas. Estos datos sugieren que la bacteria mantiene un estricto control en la expresión de los genes que se dedican a la adherencia y que estos mismos regulan la capacidad de invasión de *Salmonella*.

Una vez que la bacteria se encuentra firmemente adherida a su célula blanco, comienza la síntesis del SST III y la translocación de efectores que permitirán la internación de la

bacteria por medio de la modificación de la membrana y el citoesqueleto. Todo esto por medio de diferentes cascadas de señalización que son dirigidas por las Rho GTPasas, los factores NFκ-β, entre otros. El tráfico intracelular de la bacteria se da dentro de una estructura membranosa, que se conoce como la vacuola contenedora de *Salmonella* (SCV por sus siglas en inglés). Es en esta SCV en donde la bacteria expresa su isla de patogenicidad 2 (SPI -2 por sus siglas en inglés) que codifica para otro SST III que transloca diferentes de proteínas efectoras, para permitir la maduración de la SCV y el intercambio de marcadores celulares que determinarán la ruta de la SCV hasta su localización final en la región trans-Golgi. *Salmonella* puede replicarse dentro de esta SCV, liberarse y diseminarse hacia las células vecinas o finalmente diseminarse hacia la lámina propia del intestino, donde será fagocitada por células dendríticas o macrófagos que permitirán su diseminación hacia linfonodos mesentéricos u otros órganos del hospedero (figura 3). (Deiwick *et al.*, 2006; Haraga, Ohlson & Miller, 2008; LaRock, Chaudhary & Miller, 2015; Perez-Lopez *et al.*, 2016)

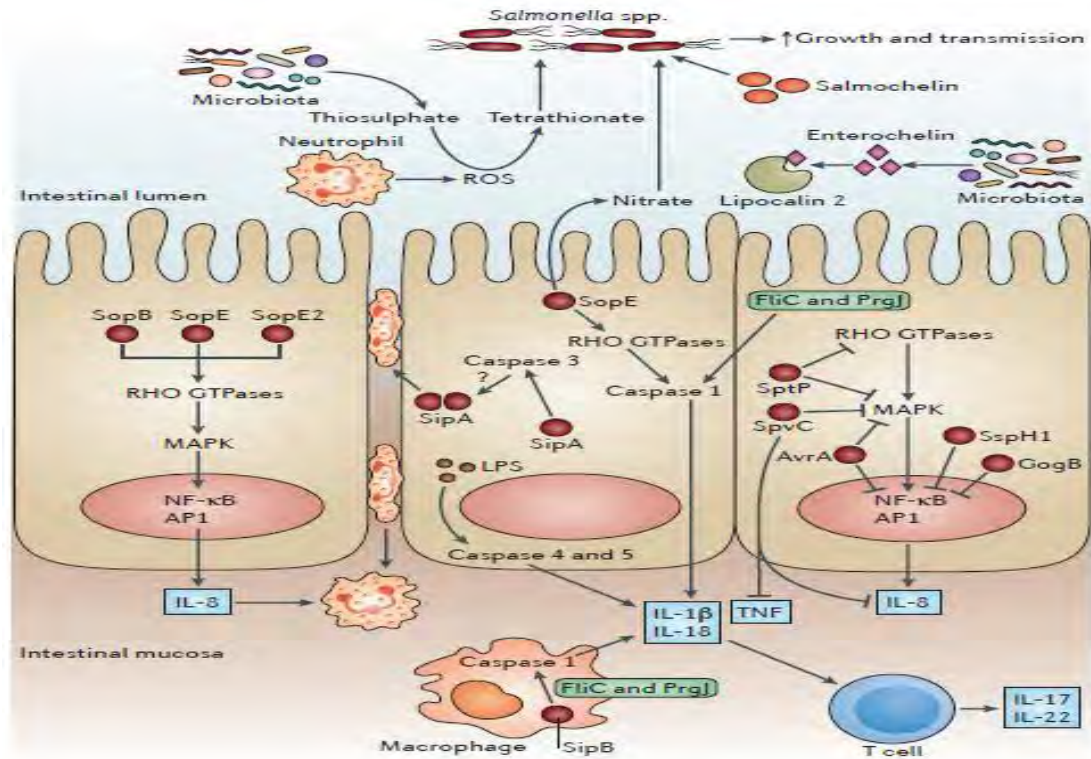


Figura 3. Patogénesis molecular de *Salmonella* en enterocitos tomado de LaRock, Chaudhary & Miller, 2015

6. Adherencia

Uno de los primeros eventos en la patogénesis de una enfermedad es la unión estrecha entre el patógeno y el hospedero. A este proceso se le conoce como adherencia, que es la capacidad del microorganismo de mantener una unión firme a su célula o tejido diana. *Salmonella* es un organismo intracelular facultativo, que puede invadir células fagocíticas como macrófagos y células dendríticas, así como células que no son fagocitos profesionales. Esto por medio de dos diferentes inyectosomas codificados en la SPI I y II que al translocar sus efectores, permiten que la bacteria pueda reestructurar el citoesqueleto para ser internada, manipular las rutas de tránsito intracelular, usar mensajeros intracelulares dependientes de fosfato y lograr su localización perinuclear, etc (Linke & Goldman, 2011).

Pero antes de que todo esto ocurra *Salmonella* debe tener la capacidad de acercarse a su célula blanco y adherirse a ella con la finalidad de llevar a cabo el proceso de invasión. Muchas salmonellas pueden desplegar una enorme cantidad de estructuras externas que permiten la adherencia y que se pueden clasificar en estructuras fimbriales y no fimbriales. Dentro de estas estructuras no fimbriales se encuentran: la capsula, el LPS, el flagelo y las adhesinas no fimbriales (Linke & Goldman, 2011).

6.1. LPS

El lipopolisacárido de la membrana externa no posee algún ligando en específico con la matriz extracelular, su actividad de adhesina se le atribuye más a su carácter anfipático además de conformar la membrana externa con la presencia de proteínas de membrana externa (OMP's). Novola *et al*, 1985 demostraron que las bacterias sin LPS eran deficientes en la colonización de tejidos a diferencia de la cepa silvestre (Linke & Goldman, 2011).

6.2. Flagelo

El movimiento quimiotáctico de la bacteria hacia su nicho de replicación ideal, contribuye con el proceso del establecimiento de la enfermedad. El flagelo de *Salmonella* es la estructura que permite el movimiento de la bacteria hacia las condiciones ambientales en donde pueda adherirse a sus células diana, invadirlas y diseminarse a otros tejidos. Además de esta actividad de motilidad bacteriana, el flagelo puede realizar otras funciones como la adherencia a epitelios intestinales y la colonización de tejidos. Mutaciones en los genes estructurales o de ensamblaje del flagelo demostraron que *Salmonella* Typhimurium no es capaz de adherirse a superficies ricas en colesterol (Allen-Vercoe & Woodward, 1999; Crawford, Reeve & Gunn, 2010; Linke & Goldman, 2011).

6.3. Adhesinas no fimbriales

Salmonella posee adhesinas no fimbriales, las cuales se sitúan en la membrana externa y tienen el largo suficiente para sobre salir de la cadena O del LPS. Estas adhesinas son secretadas por diferentes sistemas de secreción como el tipo I (SST I) o el tipo V (SST V). SiiE y BapA son las proteínas grandes dentro del proteoma de *Salmonella* y son secretadas al medio extra celular por medio del SST I. BapA está asociada a la formación de biopelículas y su expresión se encuentra regulada por AgfD, regulador que se encarga de la expresión de la fimbria tipo curli y del metabolismo de síntesis de celulosa. En el caso de la proteína SiiE se ha demostrado que es importante para el proceso de invasión a células intestinales, ya que mutaciones a lo largo de la proteína disminuyen la capacidad de invasión de la bacteria, capacidad que puede ser restituida con la disminución de la longitud de la cadena O en el LPS de SE. También se ha demostrado que esta proteína se encuentra bajo la regulación de HilA, uno de los reguladores generales de la SPI I (Linke & Goldman, 2011).

El sistema de secreción tipo V (SST V) permite la translocación de adhesinas monoméricas y triméricas, estas proteínas son ShdA y MisL que son monoméricas; y SadA que es trimérica. ShdA y MisL no han sido expresadas por *Salmonella* en condiciones de laboratorio, solo mediante el uso de expresión heteróloga se ha comprobado que las dos proteínas tienen como ligando a la fibronectina. En ensayos *in vivo* las dos proteínas son requeridas por la bacteria para su persistencia en el ciego de ratones, con lo que se puede suponer que tienen actividades sinérgicas que ayudan a *Salmonella* a llevar a cabo su proceso de invasión. SadA es una adhesina trimérica parecida a YadA de *Yersinia*

enterocolica, se desconocen cuáles son sus condiciones de expresión, su ligando o su papel en la adhesión de *Salmonella* (Linke & Goldman, 2011).

7. Fimbrias

Las fimbrias o pilis son estructuras de origen proteico ancladas en las membranas y pared celular de la bacteria con un número de copias diverso que permiten la adherencia bacteriana de forma específica a algún componente de la matriz extracelular. Se han reportado cuatro diferentes sistemas de ensamblaje para estas estructuras de superficie y se clasifican en: el sistema chaperona/acomodador, el sistema de secreción general, el sistema de enucleación/precipitación y el camino alternativo de las chaperonas (figura 4). (Soto & Hultgren, 1999; Linke & Goldman, 2011)

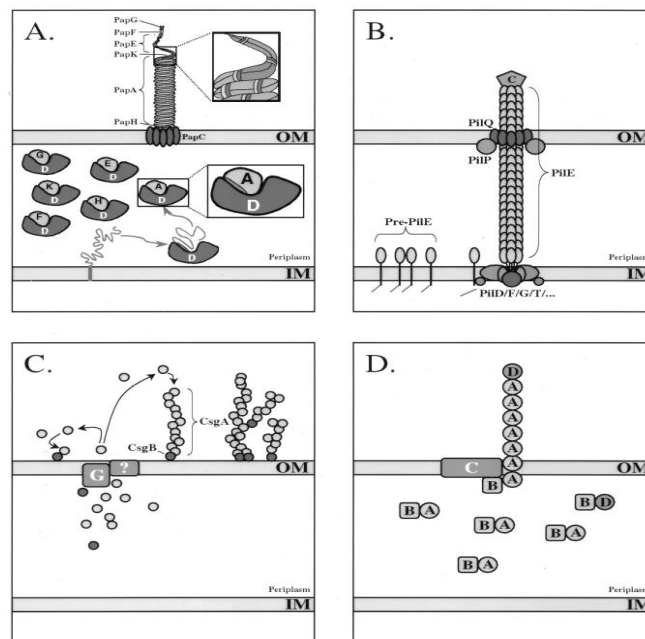


Figura (4). Sistemas de estructuración fimbrial. A. Sistema clásico chaperona/acomodador. **B.** Sistema de secreción general. **C.** Sistema de enucleación/precipitación. **D.** Sistema alternativo de las chaperonas. (Soto & Hultgren, 1999)

7.1. Sistema secreción general o pili tipo IV.

El pili tipo IV en *Salmonella* tiene un operón con 11 genes que se encuentran localizados en la isla de patogenicidad 7, este pili es necesario para la adherencia y la internación en las células del intestino de humanos. Las subunidades para la formación de la fimbria tipo IV se realiza en el periplasma, y son transportadas por medio de la vía de secreción general que se localiza en la membrana interna de la bacteria. La proteína prepilina es separada de su secuencia señal por medio de una peptidasa que permite el crecimiento o decremento del largo de la fimbria; con lo cual se puede dar el movimiento de *twitching* o halado a través de una superficie con gasto de ATP. Esta es una de las únicas fimbrias que se ha reportado que se expresan *in vitro* y que son necesarias para la formación de las biopelículas. (Soto & Hultgren, 1999; Linke & Goldman, 2011)

7.2. Sistema enucleación/precipitación.

La fimbria tipo *curli* tienen un sistema de síntesis más sencillo, su operón comprende los genes *csgA* y *csgB* que codifican para las proteínas estructurales de la fimbria; su ensamblaje ocurre por medio de la secreción al exterior de la bacteria, de las subunidades solubles que darán forma a las fibras rizadas de donde adquiere su nombre. CsgA es la subunidad principal en la estructura fimbrial, ésta utiliza como base o sitio de precipitación a la subunidad CsgB. Se reporta que CsgB permite la ramificación de esta fimbria, dicho proceso ayuda a la formación de biopelículas con participación de celulosa y del pili tipo IV. El operón *csgDEFG* codifica para el regulador de la fimbria rizada y para otras tres proteínas de las cuales no se conoce su función (Soto & Hultgren, 1999; Linke & Goldman, 2011).

7.3. Ruta alterna de las chaperonas.

En el sistema alterno de las chaperonas, se ensambla una fimbria que tiene un sistema de estructuración similar al del clásico de las chaperonas, sin embargo las proteínas encargadas de la actividad de chaperona son distintas. En este modelo de estructuración existe también una proteína que formará el cuerpo de la fimbria y actuará como la adhesina, además de otras proteínas involucradas que actuarán como las chaperonas de dicha pilina. Se cree que una proteína de membrana externa funciona como un canal que permite la salida de la pilina al medio externo. A pesar de las funciones similares entre el sistema alterno y el clásico de las chaperonas se sugiere que estos dos sistemas evolucionaron a la par y no uno dependiente del otro (Soto & Hultgren, 1999).

7.4. Sistema clásico chaperona/acomodador

La vía de ensamblaje del sistema chaperona acomodador ha sido la más estudiada y se conocen las funciones de cada proteína a detalle. Las subunidades fimbriales, que son las que dan forma al cuerpo de la fimbria, se secretan al periplasma utilizando la ruta del sistema de secreción general mediante un péptido señal en la región N-terminal de la proteína. Estas subunidades interactúan con las chaperonas que previenen un plegamiento prematuro de la proteína o su degradación por proteasas del espacio periplásmico. Por último las proteínas acomodadoras que son proteínas integrales de la membrana externa, se encargan de coordinar el ensamblaje final de la fimbria. La subunidad proteica distal de la fimbria contiene secuencias de aminoácidos que tienen la función de receptor hacia algún ligando de la matriz extracelular. Dentro de estos sistemas se encuentran diez de los doce operones presentes en SE, entre ellos *Std* el cual se mantiene como ortólogo en todas las especies de *Salmonella*.

8. Fimbria Std

La fimbria Std es un miembro del sistema chaperona/acomodador, clasificada como una fimbria tipo π de acuerdo con lo propuesto por Nuccio & Bäumlér, 2007, para esta clasificación se utiliza una comparación de secuencias entre las proteínas acomodadoras de las diferentes fimbrias que pertenecen al sistema chaperona/acomodador. La familia de las proteínas acomodadoras fimbriales (FUP por sus siglas en inglés) es un grupo grande y de rápido crecimiento, que se distribuye entre los géneros del phylum *Proteobacteria*, *Cyanobacteria* y *Deinococcus-Thermus*. La nomenclatura con letras griegas que se propuso para la denominación de los diferentes clados de proteínas acomodadoras similares se basa en las características más importantes de los ancestros de cada clado. Para el caso del clado π se hace referencia al pili tipo P asociada a la pielonefritis (Nuccio & Bäumlér, 2007).

La fimbria Std es una de las trece fimbrias que se han descrito para SE, pero posee la característica de que es un operón ortólogo, esto quiere decir que tiene más de 85 % de identidad en la secuencia del operón entre las diferentes especies de *Salmonella*, además de no presentar mutaciones sin sentido o codones de paro en el interior de la secuencia, con lo cual se cree que es funcional. (Clayton *et al.*, 2008b) En diferentes experimentos *in vivo* se ha demostrado que Std es necesaria para la persistencia de ST y SE; en el colon y en el ciego de ratones y de pollos respectivamente (Weening *et al.*, 2005; Clayton *et al.*, 2008a; Shippy *et al.*, 2013).

Chessa *et al.*, 2009 reportaron que la adhesina StdA de ST tiene como ligando los residuos terminales de α (1-2) de fucosa que es un carbohidrato componente de la matriz extracelular de las células Caco-2 y en las células del colon de ratones.

Se han reportado 5 genes que componen al operón policistrónico *std* estos son: *stdA* el cual codifica para la proteína que tiene como función formar el cuerpo de la fimbria y la adhesina de la misma; *stdB* que codifica para la proteína acomodadora que es la que se encarga de permitir el paso de StdA y su anclaje en la membrana externa; *stdC* que codifica para la chaperona que tiene como función la protección de StdA en el periplasma, así como ayudar al correcto plegamiento de la proteína y de situar a StdA en contacto con StdB en la membrana externa; para el gen *stdD* no se ha descrito alguna función en la estructuración de la fimbria; y por último los genes *stdE* y *stdF* los cuales no tienen una actividad definida dentro del proceso de síntesis de la fimbria Std, sin embargo se ha reportado que estos dos genes regulan negativamente la expresión de HilD, por lo mismo la expresión de la SPI-I de *Salmonella* disminuye y en consecuencia la capacidad de invasión de la bacteria (Balbontín *et al.*, 2006; Chessa *et al.*, 2008, 2009; Jakomin *et al.*, 2008; López-Garrido & Casadesús, 2012; Shippy *et al.*, 2013).

9. Regulación de Std

Salmonella Enteritidis posee 13 operones fimbriales cada uno de los cuales puede codificar para un sistema fimbrial, de estas 13 fimbrias solo se ha reportado que *fim* y *csg* se expresan en condiciones de laboratorio. Lo cual nos da un indicio de que la expresión de estos sistemas proteicos tiene una regulación estricta basada en las condiciones externas que permiten la expresión de cada operón fimbrial (Clayton *et al.*, 2008b).

La fimbria Std de ST fue expresada *in vitro* mediante mutaciones de *dam*, *seqA* y *rosE*, los dos primeros son genes de regulación general lo cuales se encargan no solo de la regulación del ciclo celular de la bacteria, sino también de la regulación positiva o negativa de ciertos

genes bajo condiciones externas específicas; mientras que *rosE* es el regulador negativo de la expresión de *stdA* (Balbontín *et al.*, 2006; Chessa *et al.*, 2008).

En estos experimentos se demostró que la cepa de ST que tenía las mutaciones en las proteínas Dam, SeqA y RosE, era deficiente en su capacidad de invasión pero no se investigó este efecto en la cepa. Sin embargo se asoció a la sobre expresión de la fimbria. Jakomin *et al.*, 2008 reportaron que la proteína HdfR actúa como regulador positivo de la expresión del operón *stdABCDEF*, esta proteína pertenece a la familia de reguladores de tipo LysR o LTTR. Los reguladores LTTR son una familia de proteínas que se ha reportado que interactúan con reactivos aromáticos, los cuales pueden actuar como inductores de la expresión génica. Sin embargo HdfR actúa directamente regulando la actividad de SeqA y de Dam, con lo cual permite la transcripción del gen *stdA* (Schell, 1993; Jakomin *et al.*, 2008; Maddocks & Oyston, 2008).

También se reportó que los genes *stdE* y *stdF* regulan negativamente al ARN mensajero de *hilD*, con lo que se demuestra que para la expresión del SST III de *Salmonella* y para que invada células no fagocíticas, es necesario que los mecanismos de adherencia sean regulados negativamente (López-Garrido & Casadesús, 2012).

10. Justificación

En estudios anteriores hechos por Clayton *et al.*, 2008a demostraron la actividad de la fimbria Std en ensayos *in vivo* para *Salmonella* Enteritidis. Chessa *et al.*, 2008 demostraron su síntesis *in vitro*, gracias a mutaciones en genes como *dam* o *seqA*, que son reguladores generales de la expresión genética en *Salmonella* Typhimurium. En esos estudios la bacteria mostró una capacidad de invasión reducida 100 veces. Jakomin *et al.*, 2008 demostraron que el operón *stdABCDEF* presenta una regulación positiva bajo la actividad de la proteína HdfR; que pertenece a los reguladores de la familia LysR. Los genes *stdE* y *stdF* son importantes en la regulación negativa de la isla de patogenicidad I; actuando sobre HilD (López-Garrido & Casadesús, 2012).

En algunas ocasiones los estudios en condiciones generales de cultivo son realizados con una bacteria atenuada en su virulencia y no con una cepa virulenta. Este estudio sería pionero en el análisis de la transcripción del operón *stdABCDEF* en *Salmonella* Enteritidis silvestre y la base para estudios subsecuentes de regulación y de expresión.

11. Hipótesis

Salmonella Enteritidis 49214 iniciará la transcripción del gen *stdA*, en respuesta a la modificación de condiciones de cultivo y así se podrá inferir la síntesis de la fimbria, bajo condiciones de laboratorio, para subsecuentes estudios de patogenicidad de la bacteria.

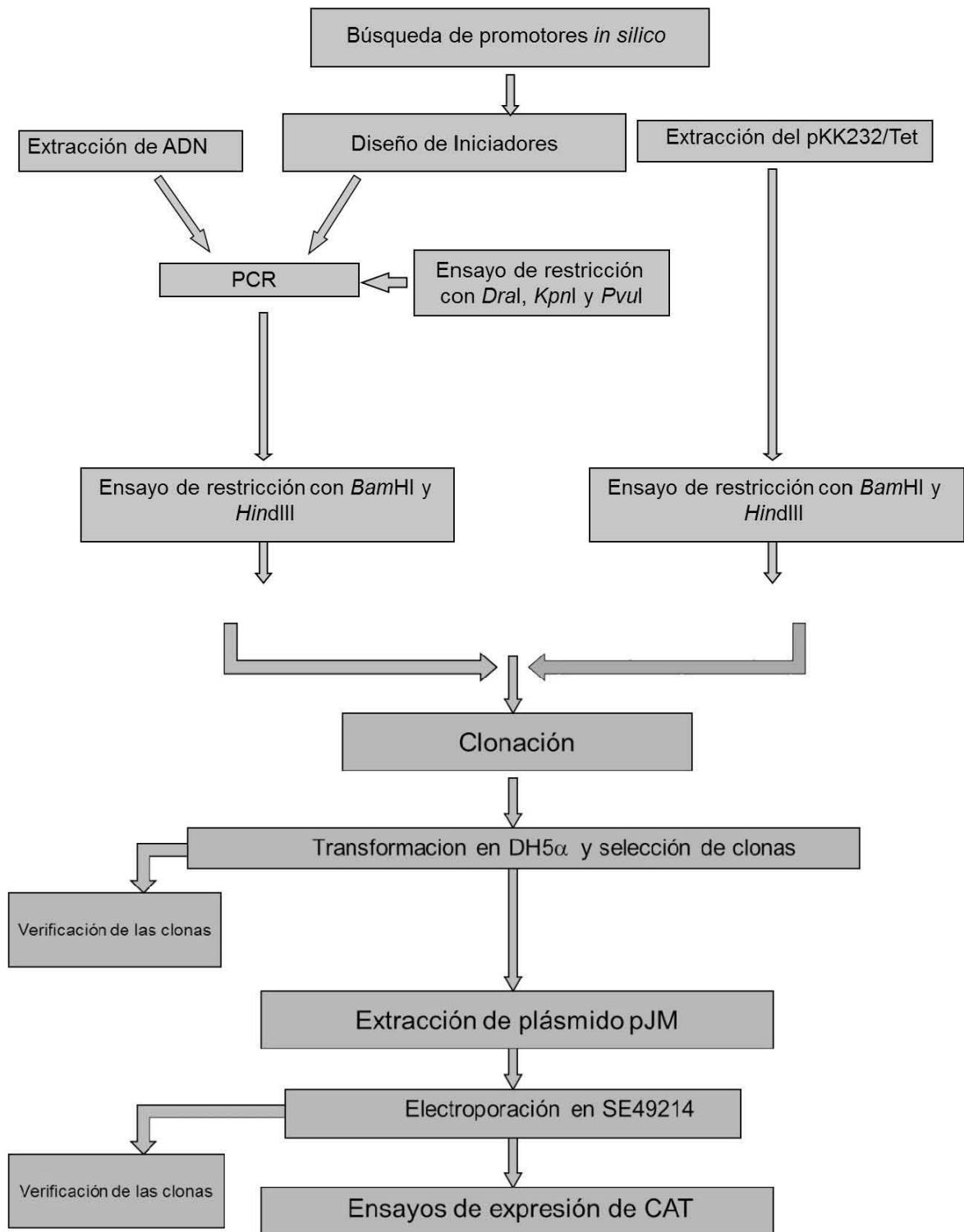
12. Objetivo General

Determinar las condiciones ambientales *in vitro* en las cuales *Salmonella* Enteritidis expresa el gen *stdA*, por medio de una fusión reportera con la posible región promotora del gen, para estudios subsecuentes del papel de la fimbria Std en la patogenia de la salmonelosis.

13. Objetivos Específicos

- Realizar el análisis *in silico* de la probable región promotora del gen *stdA*.
- Diseño de iniciadores y amplificación de la región promotora por medio de la técnica de la PCR.
- Generar una fusión reportera de la región promotora de *stdA-cat* para medir la activación del promotor, bajo diferentes condiciones de cultivo.

14. Estrategia Experimental



15. Materiales y Métodos.

15.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

Se utilizaron las cepas bacterianas de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovariedad Enteritidis ATCC® 49214 (SE 49214), *Salmonella* Enteritidis 49214 con el plásmido JM13 (SE pJM13) y *Escherichia coli* DH5 α (DH5 α), las cuales se mantuvieron en congelación a -70 °C hasta que fueron requeridas. Para los ensayos se recurrió al uso de diferentes medios de cultivo líquidos como Luria-Bertani (LB), Waymouth MB752/1 (WM), Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Medio Mínimo M9 (M9MM); así mismo se utilizaron placas de agar LB cuando fue necesario.

Se complementaron los medios de cultivo con los antibióticos ampicilina (Amp) a una concentración de 150 μ g/ml o tetraciclina (Tet) a una concentración de 50 μ g/ml; cuando fue necesario para la selección de clonas y el mantenimiento de los plásmidos en las cepas utilizadas en el estudio.

Para los ensayos de expresión del promotor se utilizó cloruro de hierro (FeCl₃-6H₂O) a una concentración de 0.5 M que se esterilizó por medio de filtración en una membrana de 0.22 μ m; la solución se mantuvo a temperatura ambiente cubierta de la luz, hasta su uso. El clorhidrato de lisina se solubilizó en agua bidestilada a una concentración de 250 mg/ml y se filtró por una membrana de 0.22 μ m, se hicieron alícuotas en tubos de 1.5ml y se refrigeró.

15.2. Predicción digital de promotores

Para la búsqueda de la región corriente arriba del operón *stdABCDEF*, que será nombrado en lo subsecuente como ***Promotor stdA***; se recurrió a la biblioteca genómica de Kioto en donde se buscó la secuencia genómica de la cepa de *Salmonella* Enteritidis cepa P125109 (SE P125109) con número de acceso o CDS T00776 y posteriormente con las opciones del programa KEGG se seleccionó la posición del gen *stdA* entrada SEN2873. (“GenomeNet”) Ya con la secuencia que se obtuvo de la biblioteca genómica se procedió a realizar una predicción y búsqueda digital de promotores por medio del programa Bprom que se encuentra a libre acceso en la página Softberry (Softberry, 2011).

15.3. Iniciadores

Para la amplificación del ***Promotor stdA*** se diseñaron iniciadores con el programa DNAMAN utilizando la secuencia que se obtuvo de la biblioteca genómica de Kioto y que pertenece a *Salmonella* Enteritidis cepa P125109 (CDS T00776). A dichos oligonucleótidos se les agregó de forma manual las secuencias que reconocen las enzimas *Bam*HI para el iniciador delantero y *Hind*III para el iniciador reversa; además de un agregado de cuatro bases para proporcionarle una mejor área de interacción de la enzima.

- Iniciadores para el ***Promotor stdA***

Delantero: (stdAIntergenic1F) ccggGGATCCTGACAGCACTGACTGGAATCTG

En rojo se puede observar la secuencia que reconoce *Bam*HI, en azul la sección

extra para la enzima de restricción y en negro la región que se alinea con *Salmonella* Enteritidis.

Reversa: (stdAIntergenic1R) ccggAAGCTTGATCGACTGCATATACAGAAGCG

En rojo se puede observar la secuencia que reconoce *HindIII*, en azul la sección extra para la enzima de restricción y en negro la región que se alinea con *Salmonella* Enteritidis.

- Iniciadores *invA* fueron diseñados y reportados anteriormente por Rahn *et al.*, 2006 y se utilizaron como control positivo de la reacción.
- Iniciadores para el plásmido pKK232/Tet se utilizaron para la comprobación de las clonas en SE 49214 con el pJM13.

Delantero: (pKK-F) GGAATTCTCGGGGAT

Reversa: (pKK-R) GTTTTGTCCTACTCAAGC

15.4. Ensayos de PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó para la amplificación del *Promotor stdA* de SE 49214, con un tamaño de 1217 pb, fue realizado el siguiente protocolo (cuadro 1):

Reactivo	Concentración inicial	Volumen por reacción
H ₂ O inyectable	-	35 µl
Amortiguador KCl sin MgCl ₂	10 X	5 µl
MgCl ₂	50 mM	2 µl
DNTP's	10 mM	2 µl

Iniciador Delantero	10 pmol	2 µl
Iniciador Reversa	10 pmol	2 µl
ADN SE ATCC 49214	100 ng	2 µl
Taq polimerasa recombinante	5 U	0.4 µl

Cuadro 1. Reactivos y concentraciones para la PCR de la región intergénica del gen *stdA*.

La reacción se colocó en el termociclador TECHNE TC-512 con las siguientes condiciones: precalentamiento de la tapa a 105 °C por 5', temperatura de desnaturalización inicial a 95 °C por 5', para después pasar a la etapa de ciclación en donde la desnaturalización a 94 °C por 30'', el alineamiento de iniciadores fue a 60.0 °C por 30'' y la extensión final a 72 °C por 1' 30''; todo esto por 30 ciclos. La extensión final fue a 72 °C por 7' y se finalizó el protocolo bajando la temperatura a 4 °C (Figura 5).

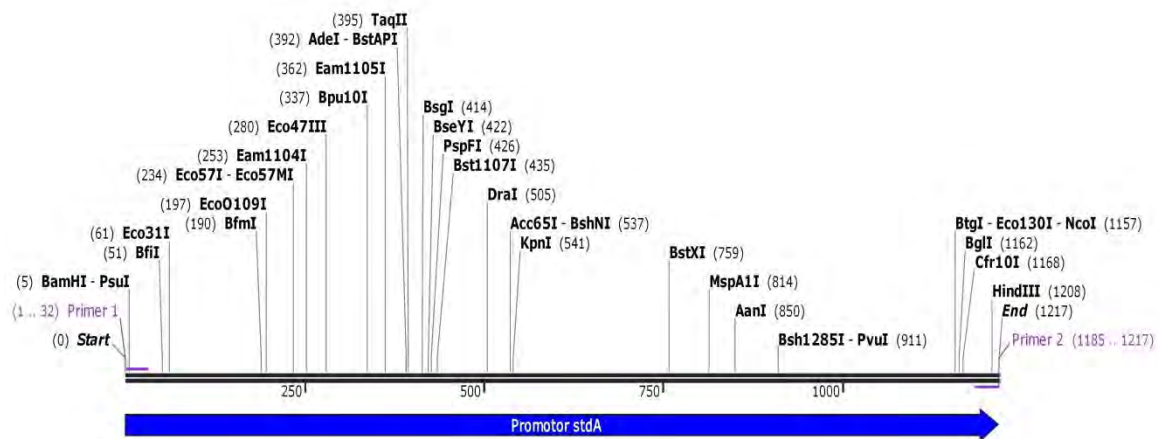


Figura 5. Simulación de una PCR de la secuencia del Promotor *stdA* en SE pJM13. Utilizando los iniciadores *stdA*Intergenic1F y *stdA*Intergenic1R, el fragmento mide 1217 pb

La PCR del gen *invA* con una longitud de 284 pb, reportada por Rhan y Ginocchio sirvió de control positivo de las reacciones de PCR.

Las condiciones para la PCR del plásmido pKK232/Tet, el cual sirvió para la comprobación de las clonas en SE pJM13 se describe a continuación (Cuadro 2):

Reactivo	Concentración inicial	Volumen por reacción
H ₂ O inyectable	-	35 µl
Amortiguador KCl sin MgCl ₂	10 X	5 µl
MgCl ₂	50 mM	2 µl
DNTP's	10 mM	2 µl
Iniciador Delantero	10 pmol	2 µl
Iniciador Reversa	10 pmol	2 µl
ADN pJM13	100 ng	2 µl
Taq polimerasa recombinante	5 U	0.4 µl

Cuadro 2. Reactivos y concentraciones para la PCR del sitio múltiple de clonación de pKK232/Tet

La reacción se colocó en el termociclador TECHNE TC-512 con las siguientes condiciones: precalentamiento de la tapa 105 °C por 5', temperatura de desnaturalización inicial a 94 °C por 2', para después pasar a la etapa de ciclación en donde la desnaturalización fue a 94 °C por 1', el alineamiento de iniciadores fue a 53.0 °C por 1' y la extensión final a 72 °C por 2'; todo esto por 30 ciclos. La extensión final fue a 72 °C por 7' y se finalizó el protocolo bajando la temperatura a 4 °C. La figura 6 y 7 representan las predicciones de los amplificadores utilizando los iniciadores pKK-F y pKKR.

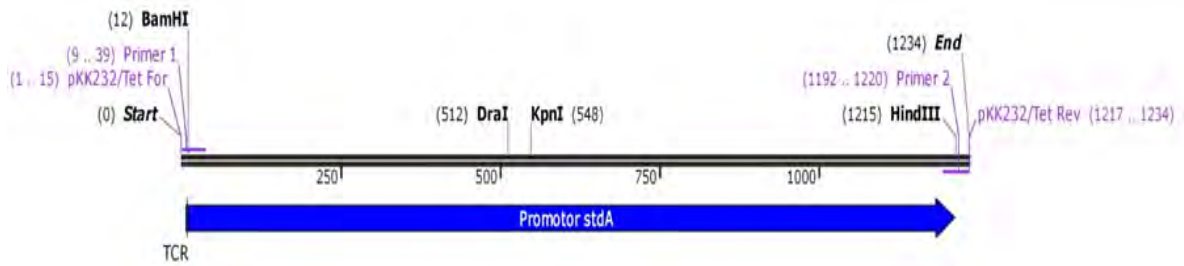


Figura 6. Simulación de una PCR del *Promotor stdA* clonado en SE pJM13 con los iniciadores pKK-F y pKK-R. El fragmento es de 1234 pb.

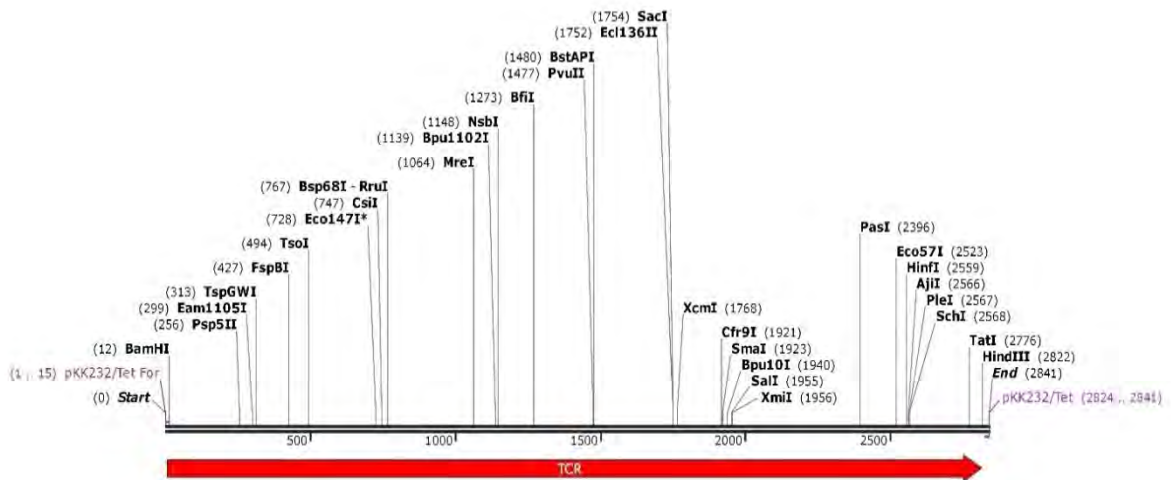


Figura 7. Simulación de una PCR del gen TCR que se encuentra en el plásmido pKK232/Tet. El tamaño del amplificado es de 2841, se hizo para compararlo con los resultados.

Todas las PCRs fueron evaluadas por medio de una electroforesis horizontal en agarosa al 1% en TAE, que se puso bajo las siguientes condiciones de voltaje/tiempo 60 V por 1 h. Al término de la electroforesis se tiñó el gel con bromuro de etidio y se colocó en el transiluminador Mini Lumi[®] para tomar una imagen digital.

15.5. Vector de clonación

Para realizar la construcción de la fusión reportera entre el *Promotor stdA* y el gen *cat* o *camR* que codifica para la proteína cloranfenicol acetil transferasa (CAT) se utilizó el vector pKK232/Tet que tiene el sitio múltiple de clonación ocupado por un gen de resistencia a tetraciclina, lo cual permite hacer una selección de clones por medio del uso de tetraciclina. Debido a que la secuencia del plásmido no se pudo obtener, se realizó una simulación digital de clonación del plásmido pKK232-8 al cual se le introdujo un gen de resistencia contra tetraciclina llamado TCR con un tamaño de 2841 pb este gen es más grande por 500 pb que el gen de resistencia del plásmido proporcionado por el Dr. Ricardo Oropeza Navarro del Instituto de Biotecnología de la UNAM (figura 8). Dicho plásmido fue utilizado para las simulaciones de los ensayos de restricción con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III que liberaban el gen de resistencia del sitio múltiple de clonación.

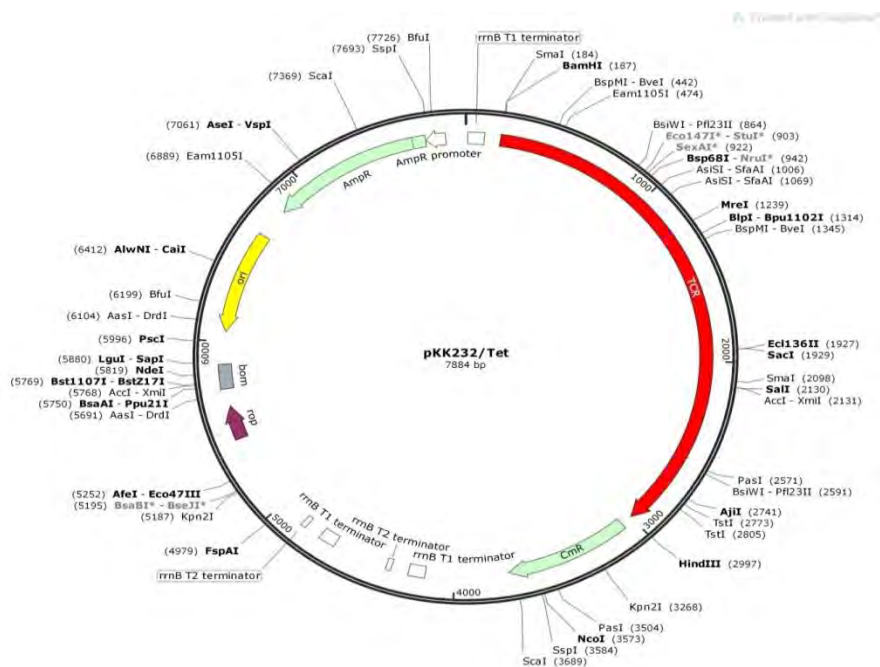


Figura 8. Mapa del vector pKK232/Tet simulado a falta de la secuencia original.

15.6. Extracción de ADN Genómico de *Salmonella* Enteritidis ATCC 49214

Para la obtención del material cromosómico de SE 49214 se utilizó el protocolo de extracción de ADN genómico reportado por Pitcher *et al.* por medio de tiocianato de guanidina con las siguientes modificaciones. Se cultivó la cepa de SE 49214 en 20 ml de caldo LB a 37°C a 250 rpm por 24 h. Se procedió a realizar el procedimiento de extracción de ADN modificando la concentración de tiocianato de guanidina de la marca Sigma-Aldrich a 1.66 M, las concentraciones de los otros componentes de la solución de lisis se mantuvieron como las describe en su protocolo Pitcher, Saunders & Owen, 1989.

En el paso de purificación se utilizó Fenol-Cloroformo 1:1 v/v; homogenizando solo por 10'' en agitador por vórtice, para después centrifugar la mezcla de forma inmediata a 13,539 g por 3' y así obtener la fase acuosa de la forma más pura posible. Se purificó una vez más con Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamilico 25:24:1 v/v; se homogenizó por 10'' y se centrifugó a 13,539 g por 5'.

Para la precipitación del material genómico se prefirió el uso de isopropanol (2-propanol) de la marca JT Baker®, ya que se observó un mejor rendimiento y calidad del ADN. Después de agregar el isopropanol se incubó a -20 °C por 1 h en congelador, se centrifugó a 13,539 rcf por 10'. Se eliminó el sobrenadante dejando el comprimido de material genómico lo más seco posible. Se utilizó 1 ml de etanol al 70% para eliminar las sales sobrantes en el comprimido, esto se realizó tres veces como mínimo.

Se eliminó lo más posible de etanol y el tubo se colocó dentro de una campana de flujo laminar para evaporar los sobrantes de etanol durante 15'. Pasado el tiempo se retiró el tubo de la campana y el comprimido se suspendió en 50-100 µl de agua inyectable.

Se verificó de forma cualitativa la cantidad y calidad del material genómico por medio de una electroforesis horizontal en agarosa al 1 % en TAE, que se puso bajo las siguientes condiciones de voltaje/tiempo 60 V por 1 h. Al término de la electroforesis se tiñó el gel con bromuro de etidio y se colocó en el transiluminador Mini Lumi[®]. Para verificar de forma cuantitativa la cantidad de material obtenido, se cuantificó el ADN con el espectrofotómetro Ultrospec 3000 Pharmacia Biotech[®], con cubetas de cristal sensible a luz UV, a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm.

El ADN se diluyó a una concentración de 100 ng/ml y se mantuvo a -20° C para su subsecuente uso.

15.7. Extracción de ADN plasmídico

Para la obtención de ADN plasmídico se realizó el procedimiento de lisis alcalina, como se ha descrito previamente (Sambrook & Russel, 2001); el tamaño de las extracciones se adaptó de acuerdo a lo que cada vector requería; desde las mini prep hasta las midi prep.

Se verificó de forma cualitativa la cantidad y calidad del ADN plasmídico por medio de una electroforesis horizontal en agarosa al 1% en TAE, que se puso bajo las siguientes condiciones de voltaje/tiempo 60 V por 1 h. Al término de la electroforesis se tiñó el gel con bromuro de etidio y se colocó en el transiluminador Mini Lumi[®].

15.8. Células electrocompetentes

Se prepararon células electrocompetentes de DH5 α y SE 49214 para su transformación con el vector pJM13. Siempre se utilizaron células competentes preparadas el mismo día ya que

se obtenían mejores resultados a la transformación y nunca pasando de un OD₆₀₀ de 0.400 nm (Sambrook & Russel, 2001).

15.9. Predicciones digitales y ensayos de restricción

Con el programa SnapGene[®] se hicieron predicciones digitales de los ensayos de restricción tanto de los fragmentos amplificados por PCR, así como para la verificación de las clonaciones. En los cuales se ocuparon las enzimas *DraI*, *KpnI*, *PvuI*, *BamHI* y *HindIII*, todas las enzimas que se usaron fueron de Thermo Scientific[®], con las cuales se digirió tanto los amplificados como los plásmidos y que gracias a la herramienta de simulación de geles nos mostraba los patrones que debíamos esperar de los experimentos. Las predicciones fueron realizadas con el programa SnapGene[®].

El amplificado del *Promotor stdA* se verificó con las enzimas *DraI*, *KpnI* y *PvuI* cada reacción bajo las siguientes condiciones 4µl del amplificado a una concentración de 1µg/µl, 4µl del amortiguador 5X de la enzima y 2µl de la enzima a una concentración 10 u/µl. Los ensayos se incubaron a 37 °C por 1 h en baño María.

Se utilizaron las enzimas *BamHI* y *HindIII* para preparar el fragmento amplificado del *Promotor stdA*, así como el plásmido pKK232/Tet para el ensayo de ligazón. Las condiciones fueron las mismas que las descritas para la verificación del fragmento amplificado por PCR, solo el volumen de la enzima fue de 1 µl por cada enzima para el ensayo de doble digestión.

Los ensayos de restricción se verificaron por medio de una electroforesis horizontal en agarosa al 1% en TAE 1X, bajo las siguientes condiciones de voltaje/tiempo 60 V por 1 h.

Al término de la electroforesis se tiñó el gel con bromuro de etidio y se colocó en el transiluminador Mini Lumi[®].

15.10. Protocolos de Clonación

Se procedió a realizar la ligazón bajo las siguientes condiciones: 15 μl del amplificado del *Promotor stdA* digerido a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 7.5 μl del plásmido pKK232/Tet abierto sin purificar a una concentración de 500 $\text{ng}/\mu\text{l}$, 2 μl de enzima T4 ligasa Invitrogen[®] y 5 μl del amortiguador 5X de la enzima T4. El ensayo se dejó toda la noche a 4 °C en el termociclador Select Cycler[®], al día siguiente se guardó la reacción a 4 °C mientras se preparaban las células competentes DH5 α .

Ya con las células competentes listas se procedió a electroporar; 200 μl de células competentes se mezclaron con 4 μl de la reacción de ligazón y se electroporaron en las siguientes constantes: 50 μF capacitancia, 200 Ω de resistencia y 2.5 Kv. Después de cada pulso se transfirieron los 200 μl de las células transformadas a 1 ml de medio SOC el cual se incubó a 37 °C a 200 rpm por 1 h. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó el cultivo de SOC a 13,539 rcf por 5'. Después de la centrifugación se decantó el sobrenadante dejando de 100 a 150 μl del medio, con lo cual se suspendió el comprimido bacteriano por pipeteo. El volumen total de las bacterias fue sembrado en un agar LB con Amp a 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se plaqueó con perlas de vidrio esteriles. Los agares fueron incubados a 37 °C nunca por más de 24 h para la selección de clonas. Para la electroporación de SE 49214 se utilizaron las mismas condiciones antes mencionadas.

Las clonas de DH5 α que se obtuvieron fueron resembradas de forma pareada en agar LB con 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Amp y en agar LB con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Tet para hacer una doble selección.

Aquellas clonas que fuesen resistentes a ampicilina y sensibles a tetraciclina fueron seleccionadas para ser verificadas por PCR y secuenciación.

Para las clonas en SE 49214 se verificaron por ensayo de restricción y PCR.

15.11. Secuenciación del plásmido pJM13

Para la secuenciación del plásmido pJM13 se mandó a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBT) que utiliza un secuenciador automático de DNA de 16 capilares Applied Biosystems[®], modelo 3130xl y el método de Sanger.

15.12. Cinética de crecimiento de SEpJM13

Se inocularon 100 µl de SEpJM13 en tres tubos cónicos de 15ml con 5 ml de WM pH 7.4 con Amp; el inóculo se tomó directamente del LB con glicerol (que se había guardado en congelación a -75 °C, se le nombro preinóculo) y se incubó a 37 °C a 100 rpm durante 8 h. Cada hora se tomó 1 ml y se midió la DO a 600 nm.

Se inoculó 100 µl del preinóculo en 5 ml de WM pH 7.4 con Amp para incubarlos a 37 °C a 100 rpm por 16 h, terminado el tiempo se inocularon 100 µl del preinóculo en 5 ml de WM pH 7.4 con Amp, se utilizaron tres tubos de 15 ml. Los tubos se incubaron a 37 °C a 100 rpm por 8 h. Cada hora se tomó 1 ml y se midió la DO a 600 nm.

Otros tres tubos de 15ml con 5 ml de WM pH 7.4 con Amp sin inocular fueron usados como control negativo.

15.13. Ensayo de expresión de la fusión transcripcional del reportero CAT.

Para los ensayos de medición de la actividad del gen reportero se realizó el siguiente protocolo.

15.13.1. Pre-Inóculos

En 5 ml de caldo LB con 150 µg/ml de ampicilina se inoculó 100 µl desde las semillas de SE pJM13 (que se congelaron a -70 °C en leche con glicerol) y se incubó por 16 h a 37 °C a 100 rpm. Del cultivo de 16 h se inocularon 100 µl del medio en caldo LB con 10 % de glicerol, con 150 µg/ml de Amp e incubar por 6 h a 37 °C a 100 rpm, terminado el tiempo de incubación, se tomó 1 ml del cultivo en tubos de 2 ml y se congeló a -70 °C hasta su uso. Procurando que nunca pasen más de dos meses de tiempo entre usos de los pre-inóculos.

15.13.2. Cultivos

15.13.2.1. Preparación de inóculos

100 µl de un pre-inóculo descongelado fueron inoculados en 5 ml de medio WM con 150 µg/ml de Amp en un tubo cónico tipo Falcón de 15 ml y se incubó por 16 hora a 37 °C a 100 rpm.

15.13.2.2. Cultivos para ensayos de expresión en M9MM, LB, DMEM y WM a 37 °C.

El ensayo se realizó con el siguiente protocolo. Se descongeló la cepa SEpJM13 y se sembraron 100 µl en 5 ml WM pH7.4 con Amp en un tubo cónico de 15 ml, se incubó a 37 °C a 100 rpm por 16 h. Se prepararon por triplicado, tubos cónicos de 15 ml por cada medio de cultivo (M9MM, LB, DMEM y WM) a pH 7.4 con 5 ml de medio con Amp y se inoculó cada tubo con 100 µl del inóculo de 16 h. Los tubos se incubaron a 37 °C a 100 rpm por 6 h. Al terminar se centrifugó de cada medio 4 ml de muestra en un tubo cónico de 1.5 ml a 13,539 rcf por 5', se decantó el sobrenadante y el comprimido bacteriano se congeló a -20 °C hasta su uso.

15.13.2.3. Cultivos para ensayos de expresión en LB y WM a 30 °C, 37°C y 42°C.

Se preparó un inóculo de 100 µl SEpJM13 con 16 h de crecimiento previas en 5 ml de WM pH 7.4 con Amp, del cual se inocularon 100 µl en 5 ml de LB y 5 ml de WM a pH 7.4 los dos medios suplementados con Amp, todo esto por triplicado. Los medios fueron incubados a 30 °C, 37 °C o 42 °C, según fuera el caso, a 100 rpm por 6 h. Se colectaron 4 ml de cada muestra; en un tubo cónico de 2 ml y se centrifugó a 13,539 rcf por 5', se eliminó el sobrenadante y el comprimido fue congelado a -20 °C hasta su uso. La medición de la actividad de CAT se realizó como se describe en la metodología.

15.13.2.4. Cultivos para ensayos de expresión en LB y WM a 42 °C con diferentes concentraciones de hierro

Se preparó un inóculo de 100 µl SEpJM13 con 16 h de crecimiento previas en 5 ml de WM pH 7.4 con Amp, del cual se inocularon 100 µl en 5 ml de LB y 5 ml de WM a pH 7.4 los dos medios suplementados con Amp y con Cloruro de hierro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a concentraciones de 250 µM, 500 µM, 750 µM y 1000 µM; todo esto por triplicado. Los medios fueron incubados a 42 °C a 100 rpm por 6 h. Se colectaron 4 ml de cada muestra; en un tubo cónico de 2 ml y se centrifugó a 13,539 rcf por 5', se eliminó el sobrenadante y el comprimido fue congelado a -20 °C hasta su uso. La medición de la actividad de CAT se realizó como se describe en la metodología.

15.13.2.5. Cultivos para ensayos de expresión en LB y WM a 42 °C con diferentes concentraciones de lisina

Se preparó un inóculo de 100 µl SEpJM13 con 16 h de crecimiento previas en 5 ml de WM pH 7.4 con Amp, del cual se inocularon 100 µl en 5 ml de LB y 5 ml de WM a pH 7.4 los dos medios suplementados con Amp y con lisina a concentraciones de 250 µg, 500 µg, 750 µg y 1000 µg; todo esto por triplicado. Los medios fueron incubados a 42 °C a 100 rpm por 6 h. Se colectaron 4 ml de cada muestra; en un tubo cónico de 2 ml y se centrifugó a 13,539 rcf por 5', se eliminó el sobrenadante y el comprimido fue congelado a -20 °C hasta su uso. La medición de la actividad de CAT se realizó como se describe en la metodología.

15.13.3. Extracción de proteínas totales por sonicación

1. Se descongelaron los comprimidos bacterianos de 4 ml de cada muestra para la obtención de sus proteínas totales por sonicación.
2. Se añadieron 700 μ l de buffer TDTT (Tris. Ditioneitol) al comprimido bacteriano y se suspendieron con agitador de vórtice. (TDTT: Tris-HCl 50 mM pH 7.8 – DTT 30 μ M)
3. Los tubos se centrifugaron 2' a 13,539 rcf.
4. El sobrenadante fue desechado.
5. Las pastillas se suspendieron en 600 μ l de TDTT y fueron mezcladas con agitador de vórtice.
6. Las bacterias se lisaron por sonicación en un equipo Ultrasonic Processor[®] durante 3' a intervalos de pulsos de encendido “on” 9” y pulsos de apagado “off” 9”. Conforme se sonicaban, se les colocó en hielo. Las puntas del sonicador se limpiaron con etanol entre cada muestra para evitar contaminaciones.
7. Se centrifugó durante 15' a 13,539 rcf.
8. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos. Es en el sobrenadante en donde quedan las proteínas expresadas por la bacteria en las condiciones del cultivo.

15.13.4. Lectura de proteínas totales

1. Se colocaron 10 μ l de cada muestra en una caja de 96 pozos y se realizó un duplicado del ensayo con 20 μ l de la muestra, en el siguiente orden (Figura 9):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	8	8	16	16	24	24	32	32	40	40

B	2	2	9	9	17	17	25	25	33	33	41	41
C	3	3	10	10	18	18	26	26	34	34	42	42
D	4	4	11	11	19	19	27	27	35	35	43	43
E	5	5	12	12	20	20	28	28	36	36	44	44
F	6	6	13	13	21	21	29	29	37	37	45	45
G	7	7	14	14	22	22	30	30	38	38	46	46
H	Bco	Bco	15	15	23	23	31	31	39	39	47	47

Figura 9. Representación gráfica del orden de las muestras para la cuantificación de proteínas totales. Cada pozo esta numerado para realizar un duplicado de la muestra. Los pozos 1H, 2H y la abreviatura Bco representan la posición del blanco.

2. En el blanco se colocaron 10 µl de TDTT.
3. Se preparó reactivo BCA Protein Assay Kit Reagent® (Pierce):
4. Reactivo A: BCA (ácido bicinconónico)
5. Reactivo B: CuSO₃
6. Preparados a una proporción 50:1 (A: B) en una probeta.
7. Se agregaron 200 µl de esta mezcla a cada uno de los pozos de la placa con la pipeta multicanal.
8. La placa fue incubada a 37 °C durante 30’.
9. La placa fue leída en el espectrofotómetro CERES ELx808 Biotek®.

15.13.5. Lectura de la actividad de CAT (enzima cloranfenicol acetil transferasa)

1. De cada muestra se colocaron 10 µl por pozo en una caja de 96 pozos y se realizó un duplicado del ensayo con 20 µl de la muestra, de la siguiente manera (figura 10):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	1	9	17	25	33	41
B	2	10	18	26	34	42	2	10	18	26	34	42
C	3	11	19	27	35	43	3	11	19	27	35	43
D	4	12	20	28	36	44	4	12	20	28	36	44
E	5	13	21	29	37	45	5	13	21	29	37	45
F	6	14	22	30	38	46	6	14	22	30	38	46
G	7	15	23	31	39	47	7	15	23	31	39	47
H	8	16	24	32	40	48	8	16	24	32	40	48

Figura 10. Representación gráfica del orden de las muestras para la cuantificación de la actividad de CAT. Cada pozo esta numerado para realizar un duplicado de la muestra. Para diferenciar la placa de CAT de la placa de BCA, esta se divide a la mitad como se observa en la figura.

2. Se disolvieron 0.02 g de DTNB (ácido ditiobisnitrobenzoico) en 5 ml de Tris HCl 1M pH 7.8 con vortex.
3. Se tomó 2.5 ml de esta mezcla y diluirlos con 22 ml de agua MQ.
4. Se agregó 500 µl de acetyl CoA 0.2 mM.
5. Se añadió 500 µl de cloranfenicol 0.2 mM.
6. La mezcla fue homogenizada perfectamente.
7. De forma inmediata se agregaron 200 µl de este reactivo a cada uno de los pozos de la placa con la pipeta multicanal. Ya que la reacción enzimática es inmediata, por lo tanto, se hizo la lectura de la placa cuando se terminó de añadir la mezcla, en el CERES ELx808 Biotek®.

16.Resultados

16.1. Predicción digital de Promotores del operón *stdABCDEF* y diseño de iniciadores.

Como se describe en la sección de metodología se obtuvo la secuencia del gen *stdA* de la cepa SE P125109 en la Biblioteca Genómica de Kioto.

El marco de lectura del gen *stdA* marca el inicio del operón fimbrial, así que sirvió de base para la búsqueda de la región intergénica. Con las opciones que tiene el software de KEGG se procedió a seleccionar la región genética que contendría al posible promotor del operón, de tal manera que se escogieron 1000 pb corriente arriba del gen *stdA*, en las cuales se incluyó el fragmento final del gen anterior y 200 pb del marco de lectura del gen *stdA* (Figura 11). Se destaca que para evitar el uso excesivo de la nomenclatura: “región corriente arriba del gen *stdA*” se asignó la denominación ***Promotor stdA*** para toda esta región que se amplificó por PCR.

GATGACAGCACTGACTGGAATCTGTATGTCAAATCAGATAAAAAAGCCCCAGTTGAAGGA
 GACCACTATATTCGGATAAATTCATCGATTACGGTAGCAGAAGATTATCTCCCTGCGGGC
 CAGAAAAATGATGCTATTAATAAAGCAAACCAGAAAATGAAAGAAGGAGATAAAAAAGGG
 ACTATAGAGGCCCTGAAACTAGCAGGCGTCAGTGTTATTGAAAATCAGGAACTCATTCCT
 CTTCAGCAAACCCGTAAGGATGTGACCACAGCGCTTTCCTTGATGAACGAAGGAAAATAC
 TATCAGGCAGGTCTATTACTGAAATCAGCTCAGGATGGCATAAGTTGTAGACTCTCAGTCA
 GTTCAGGAATCACCCACGCACTCCGTGCAGCACGACGCCGCGCATTAAATATCCCCCAGCC
 TGCTGTATACATTACAGCAGGCAGCATTATGTCTGACAGCTATTACCAGTTTGTTCCTTG
 CTGTCCGCATTGTTTTTAAATTTTCATCCGCGAAGTTTAGAAATGTCAGGGTACCTGCATT
 TATATCTATTGTGATGCTCATCAAAATACAGAAGAATATCATTTTCATTTATTATTTTT
 ATTCCTTCCACTTATGATGGTTCATAATGATTTATTAAGTTAATGTTTTGGAATTAATG
 CCTTTTACTTGCGTTATATCCAGTTTTTTATGCTGCCAGTAATTTTCATTGTTATATATGA
 TTAGTATTATGTTTTGTAAATATCCAGTGTAATGGAAAAGCAAACATACATTCCCAGATA
 ATATATTACAAAATATTTTCATGTCCGCTGCGAATATCTGTCTGTTAGGTATCACCCGCT
 TATAATTACATTAATAAAGTATTTCTTTGATGATTATCTTAAATTACGATCATAATCATC
 GATCGTATCGATCTATTTTTATTGTTTTAATTTGAATAAGAATTTTCTTACAACCTGATTA
 GGCATTAGCTGAAATCAATATTTTTCGATGGAAAGTTCAGGTGCTTCGTTTAAACACCAGG
 CGTTTATTATTCATACGAATCTTTTCTGAACGCTTTCATTAATACCCTCAGAGTTGTTTT
 CAGCCTTTGCAAAAATAATTCTCATTTACCCAAAGGACATATTATCTATGCGTAATAAAAT
 AATACTTGCCATGGCGGCTGCCGGTATGATGTATGGCGCTTCTGTATATGCAGTCGATCC

Figura 11. Secuencia de la región corriente arriba del operón fimbrial Std. De color rojo se puede observar la secuencia para el gene que se encuentra corriente arriba de *stdA*, de color negro región intergénica del operón *stdABCDEF* y en azul 200 pb de la región codificante del gene *stdA*.

La secuencia fue analizada, con el software Bprom de la empresa Softberry, el cual hace la búsqueda de regiones promotoras mediante la utilización de las secuencias consenso para las cajas -10 y -35 de *E. coli*. (Solovyev & Salamov, 2010; Softberry, 2011)

El programa arroja los resultados en dos partes. El primer resultado indica el tamaño de la secuencia que se utilizó que en este caso fue de 1200 pb; el número de promotores encontrados para la secuencia, que fue de tres; y en cuales nucleótidos se propone que están las cajas -10 y -35 de cada promotor. Estas regiones se encontraron en los nucleótidos: 620 al 598 a la cual se le denominó 1er promotor; del nucleótido 923 al 903 a la cual se le nombró 2do promotor y del nucleótido 74 al 53 a la que se le denominó 3er Promotor (Cuadro 3).

El segundo resultado (cuadro 4) que arroja el programa, es el de los sitios en los cuales se uniría un factor transcripcional y a que familia podría pertenecer.

Test sequence

Length of sequence-1200

Threshold for promoters -0.20

Number of predicted promoters - 3

Promoter Pos: 635 LDF-8.40

-10 box at pos. 620 GTTCATAAT Score 57

-35 box at pos. 598 TTTATT Score 34

Promoter Pos: 938 LDF-6.26

-10 box at pos. 923 TGTTTTAAT Score 55

-35 box at pos. 903 TCGTAT Score 5

Promoter Pos: 89 LDF-3.90

-10 box at pos. 74 GGATAAATT Score 52

-35 box at pos. 53 TTGAAG Score 54

Cuadro 3. Predicción de promotores utilizando el software Bprom de la compañía Softberry con la secuencia de la región Promotora de *stdA* de la bacteria SE P125109. En el primer resultado se muestran los resultados que arroja el programa, con el largo de la secuencia 1200 pb, los tres posibles promotores y las cajas -10 y -35.

For promoter at 635:

soxS: TATCATTT at position 578 Score - 9

lrp: ATTTATTA at position 587 Score - 6

lrp: TATTTTTT at position 593 Score - 11

argR: TTTTTTAT at position 595 Score - 13

argR2: TTTTTATT at position 596 Score - 13

fur: ATAATGAT at position 624 Score - 6

lrp: ATTTATTA at position 630 Score - 6

phoB: TTTATTAA at position 631 Score - 8

rpoD15: TAATGTTT at position 641 Score - 9

For promoter at 938:

argR: ATAATCAT at position 892 Score - 9

argR2: TTTTTATT at position 916 Score - 13

rpoD19: ATTGTTTT at position 921 Score - 7

nagC: TTTAATTT at position 926 Score - 7

ada: ATAAGAAT at position 936 Score - 11

rpoD17: AATTTTCT at position 941 Score - 7

For promoter at 89:

rpoD17: AAATCAGA at position 31 Score - 7

argR: AATTCATC at position 79 Score - 5

Cuadro 4. Predicción de promotores utilizando el software Bprom de Softberry. Se empleó la secuencia de la región corriente arriba al marco de lectura de *stdA* de la bacteria SE P125109. Se enlistan los posibles factores transcripcionales que podrían interactuar con cada región promotora.

Se consideró que la posición 635, que fue la que obtuvo un mejor resultado entre las cajas -

10 y -35, se decidió utilizar como inductor a el hierro por la presencia de una secuencia que

es reconocida por el regulador fur. Otro de los posibles inductores elegidos fue la lisina, con base en lo que reporta Jakomin *et al.*, 2008, ya que HdfR es el activador del operón Std y pertenece a la familia de los reguladores de lisina.

Con la secuencia definida se realizó el diseño de los iniciadores con ayuda del programa DNAMAN y se eligieron los iniciadores basándose en los siguientes criterios: que tuviesen una longitud de 20 pb o más, que amplificaran un fragmento entre 1100 a 1200 pares de bases, con lo cual se incluirían los tres promotores previamente identificados y que tuviesen una temperatura media de alineamiento (TM) de ente 58-62 °C. Se agregaron de manera manual las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción *Bam*HI para el iniciador stdAIntergenic1F y *Hind*III para el iniciador stdAIntergenic1R en sus extremos 5', además de estas secuencias se agregaron cuatro pares de bases extra para permitir que las enzimas de restricción tuviesen una sección que permitiera el correcto acoplamiento y la digestión del fragmento amplificado (Cuadro 5).

stdAIntergenic1F 5'-3'

3 ccggGGATCCTGACAGCACTGACTGGAATCTG primer con *Bam*HI

*Len=22 Tm= 61.4°C

stdAIntergenic1R 5'-3'

1199 ccggAAGCTTGATCGACTGCATATACAGAAGCG primer con *Hind*III

*Len=23 Tm= 61.1°C

Cuadro 5. Iniciadores diseñados con el programa DNAMAN. En color negro se pueden ver las secuencias que se alinean con SE P125109. En color rojo las secuencias reconocidas por las enzimas *Bam*HI y *Hind*III respectivamente para cada iniciador. En color azul se observan las cuatro bases añadidas para facilitar que la enzima pueda digerir el amplificado. Con (*) se marcan las longitudes y temperaturas de alineamiento de los iniciadores, pero estos datos son solo para las secuencias de color negro.

Se comprobó que los iniciadores alinearan con SE P125109 y que delimitasen la zona que se eligió previamente en el programa KEGG. El alineamiento de iniciadores se realizó con la herramienta digital Primer Blast que se encuentra en el software Blast del Centro Nacional para Información de Biotecnología (NCBI por sus siglas en inglés) (NCBI) . Con el cual se obtuvo un 100 % de identidad (figura 12). También se comprobó que dentro del amplificado, se encontraran las predicciones hechas por el Bprom para las regiones promotoras. Esto se realizó con el programa SnapGene® (figura 13)

```

Primer pair 1
-----
Sequence (5'-->3')
-----
Forward primer      CAGCACTGACTGGAATCTGTATGT      24      54.69      45.83%
Reverse primer      GATCGACTGCATATACAGAAGCG      23      53.69      47.83%
Products on target templates
-----
>AM933172.1 Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. P125109 complete genome
product length = 1194
Features associated with this product:
  threonine operon leader peptide (artificial fragment)

  probable fimbrial protein

Forward primer 1      CAGCACTGACTGGAATCTGTATGT      24
Template         3081485      .....      3081462

Reverse primer 1      GATCGACTGCATATACAGAAGCG      23
Template         3080292      .....      3080314

```

Figura 12. Resultados del alineamiento de los iniciadores en el Primer Blast. Se hace hincapié de que en el proceso de alineamiento se utilizaron los iniciadores sin las secuencias para las enzimas de restricción ni los agregados de 4 bases.

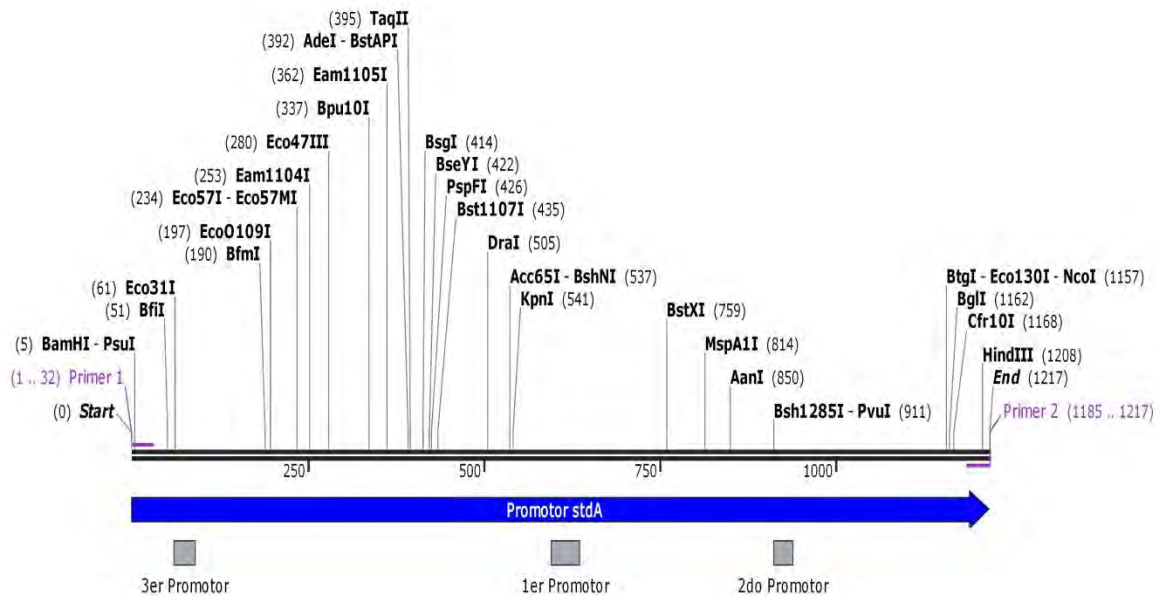


Figura 13. Predicción digital del amplificado de la PCR del *Promotor stdA* con las regiones promotoras sugeridas por el Bprom. En las cajas grises se presentan las predicciones en cuanto a las posiciones de los tres promotores encontrados por el programa Bprom. En morado las posiciones de los iniciadores, con lo que se comprueba que estos nos permiten tener los promotores dentro del amplificado.

16.2. Extracción de ADN Genómico de *Salmonella* Enteritidis ATCC 49214.

Se hizo la extracción de ADN genómico de SE 49214 por el método descrito por Pitcher *et al.* con las modificaciones que se especificaron en la metodología. El ADN fue evaluado de forma cualitativa con una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1 % en TAE. Se cuantificó en el espectrofotómetro Ultraspec 3000 Pharmacia Biotech®; para utilizar el material genético se diluyó a una concentración de 100 ng/μl (Figura 14).

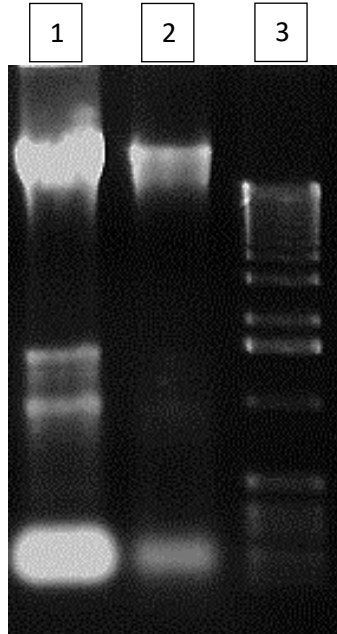


Figura 14. Extracción de ADN genómico de SE49214. Foto de un gel de agarosa al 1% en TAE. **Carril 1 y 2** ADN genómico de SE 49214. **Carril 3** Marcador de peso molecular 1 Kb Invitrogen®.

16.3. PCR del *Promotor stdA*.

Se amplificó el *Promotor stdA* mediante la técnica de PCR en la modalidad de gradientes de temperatura usando un rango de 12 °C; se obtuvo un amplificado con un peso de 1217 pb. Como control positivo de la reacción se utilizó la PCR del gen *invA* en la columna del bloque térmico que estaría a una temperatura de 55 °C. El ADN de SE 49214 se utilizó para ambas reacciones. A los amplificados se les realizó una electroforesis horizontal en agarosa al 1% en TAE (figura 15).

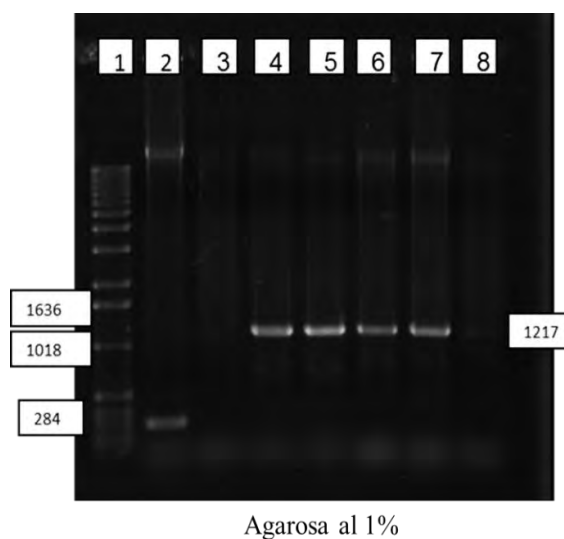


Figura 15. PCR del *Promotor stdA*. Foto de un gel de agarosa al 1% en TAE. **Carril 1** Marcador de peso molecular 1 Kb Invitrogen®. **Carril 2** PCR de *invA* 284 pb. **Carril 3** PCR *Promotor stdA* a 58.2 °C. **Carril 4** PCR *Promotor stdA* a 59.6 °C. **Carril 5** PCR *Promotor stdA* a 60.2 °C. **Carril 6** PCR *Promotor stdA* a 61.3 °C. **Carril 7** PCR *Promotor stdA* a 62.2 °C. **Carril 8** PCR *Promotor stdA* a 62.2 °C.

Con el ensayo de gradientes se decidió utilizar una temperatura menos astringente para la PCR del *Promotor stdA*, esta temperatura fue 60.2 °C.

16.4. Predicciones digitales y ensayos de restricción del *Promotor stdA*.

Para comprobar el amplificado del *Promotor stdA* se hizo una predicción digital del patrón electroforético de la digestión con tres enzimas *DraI*, *KpnI* y *PvuI* en el programa SnapGene® (Figura 16).

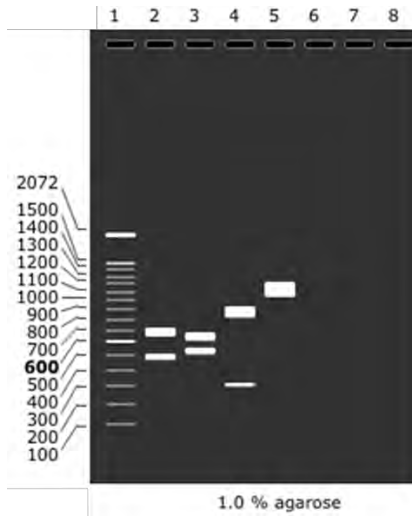


Figura 16. Predicción electroforética del ensayo de restricción con *DraI*, *KpnI* y *PvuI* para el amplificado del *Promotor stdA*. Carril 1 Marcador de Peso Molecular 100 pb Invitrogen®. Carril 2 PCR del *Promotor stdA* digerido con *DraI* se obtienen dos fragmentos 712 pb y 505 bp. Carril 3 PCR del *Promotor stdA* digerido con *KpnI* se obtienen dos fragmentos 676 bp y 541 bp. Carril 4 PCR del *Promotor stdA* digerido con *PvuI* se obtienen dos fragmentos 911 bp y 306 bp. Carril 5 PCR del *Promotor stdA* sin digerir.

Posteriormente se llevó a cabo el ensayo de restricción con las enzimas antes mencionadas y el *Promotor stdA*; su análisis por medio de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1 % en TAE se muestra en la figura 17.

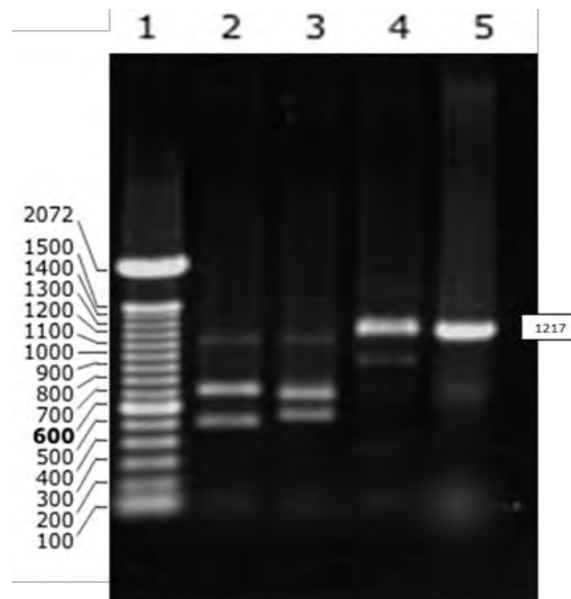


Figura 17. Ensayo de restricción para el amplificado del *Promotor stdA* con *DraI*, *KpnI* y *PvuI*. Foto de un Gel de agarosa al 1% en TAE. **Carril 1** Marcador de Peso Molecular 100 pb Invitrogen®. **Carril 2** PCR del *Promotor stdA* digerido con *DraI* se obtienen dos fragmentos 712 pb y 505 bp. **Carril 3** PCR del *Promotor stdA* digerido con *KpnI* se obtienen dos fragmentos 676 bp y 541 bp. **Carril 4** PCR del *Promotor stdA* digerido con *PvuI* se obtienen dos fragmentos 911 bp y 306 bp. **Carril 5** PCR del *Promotor stdA* sin digerir 1217.

16.5. Extracción de ADN del plásmido pKK232/Tet.

El cultivo *E. coli* con el vector pKK232/Tet fue sometido al procedimiento de lisis alcalina. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE del ADN plasmídico pKK232/Tet (figura 18).

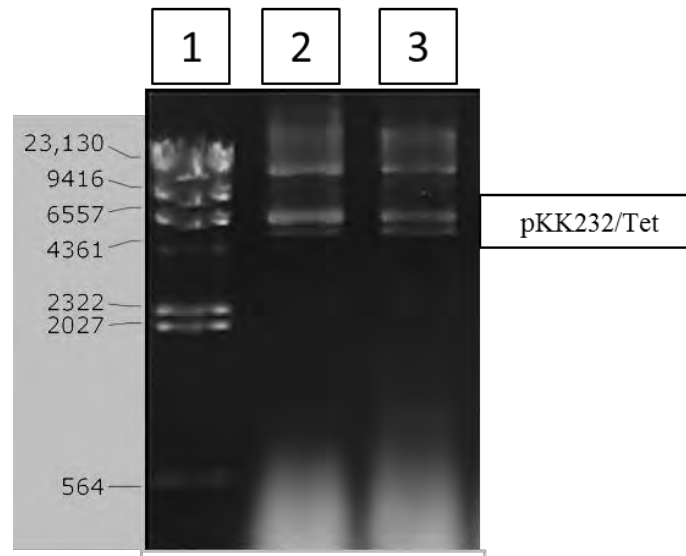


Figura 18. Extracción de ADN plasmídico del vector pKK232/Tet. Foto de un gel de agarosa al 1% en TAE. **Carril 1** Marcador de peso molecular λ /*HindIII* Invitrogen®. **Carril 2 y 3** ADN plasmídico del vector pKK232/Tet.

16.6. Clonación del *Promotor stdA* en el plásmido pKK232/Tet y transformación en DH5 α

Para la clonación del amplificado del *Promotor stdA* en el plásmido pKK232/Tet, los elementos fueron preparados con una reacción de doble digestión mediante el uso de las enzimas *BamHI* y *HindIII*. Las dos reacciones se realizaron bajo el mismo protocolo y al mismo tiempo, ya que la eliminación de las secuencias de los extremos de la PCR del

Promotor *stdA* no podría observarse mediante electroforesis en agarosa. Por lo contrario, el ensayo en el vector pKK232/Tet eliminaba el gen de resistencia a tetraciclina, diferencia que si podía observarse por medio de la electroforesis. En la siguiente predicción digital del ensayo de restricción (figura 19) se presenta el patrón electroforético predicho con el programa SnapGene[®], es importante señalar que la secuencia del plásmido pKK232/Tet que fue utilizada para los ensayos digitales, tiene un gen de resistencia de 500 pb de más; comparada con el ensayo final que se realizó (figura 20).

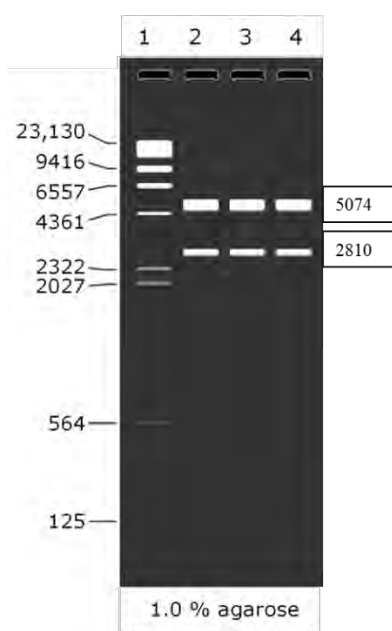


Figura 19. Predicción digital del ensayo de doble digestión con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III para el vector pKK232/Tet. Carril 1 Marcador de peso molecular λ /*Hind*III Invitrogen[®]. Carril 2-4 pKK232/Tet cortado con *Bam*HI y *Hind*III se observan dos bandas que representan al pKK232/Tet con un peso de 5074 pb y al gen de resistencia a tetraciclina TCR con un peso de 2810 pb.

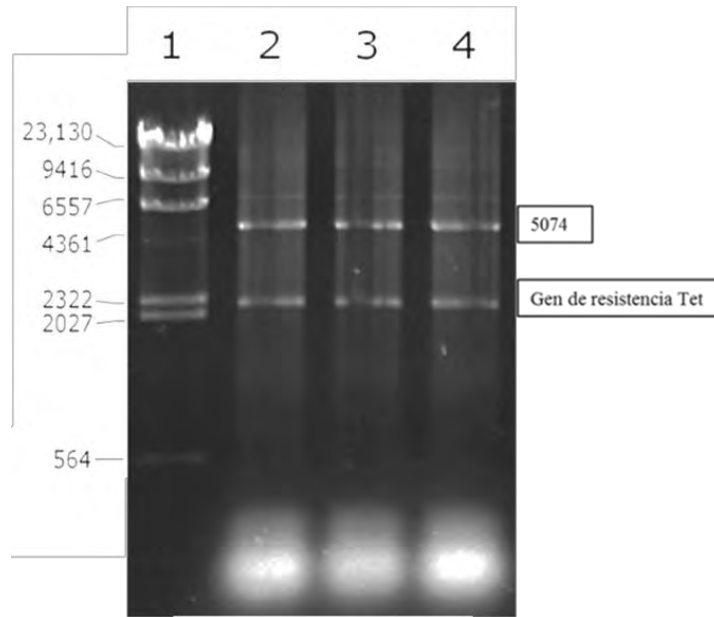


Figura 20. Ensayo de doble digestión con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III para el vector pKK232/Tet. Foto de una electroforesis en agarosa al 1% en TAE. **Carril 1** Marcador de peso molecular λ /*Hind*III Invitrogen®. **Carril 2-4** pKK232/Tet digerido con *Bam*HI y *Hind*III se observan dos bandas que representan al pKK232/Tet con un peso de 5074 pb y al gen de resistencia a tetraciclina.

Ya con el producto de la PCR digerido y con el plásmido abierto se procedió a realizar el ensayo de ligazón con la T4 ligasa Invitrogen® como se describió en la metodología. Se resalta que nunca se purificaron los productos de la digestión; lo cual permite que tanto el gen de resistencia TCR, como el amplificado del *Promotor stdA* puedan ocupar el sitio múltiple de clonación en el pKK232/Tet lo que nos permite una selección mediante el uso de ampicilina y tetraciclina. Aquellas clonas que crecieran solo en ampicilina y no en tetraciclina, serían las candidatas a contener el plásmido pJM.

La reacción de ligazón se transformó por medio de electroporación en células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α , se usó el Genepulser II de Biorad®.

La selección de las clonas se realizó en agar LB con Amp a una concentración de 150 μ g/ml. La placa se incubó a 37 °C por no más de 24 h.

Con las clonas obtenidas en el agar LB se procedió a realizar una doble selección, mediante el uso de placas de LB con 150 $\mu\text{g/ml}$ de Amp y LB con 50 $\mu\text{g/ml}$ de Tet; todo lo anterior bajo la suposición de que solo las clonas que crecieron en el LB con ampicilina y no se desarrollaron en el LB con tetraciclina, eran candidatas a tener el plásmido pJM transformado (figura 21). Cada clona se sembró por duplicado, haciendo un trazo en el cuadrante marcado; utilizando una punta de plástico estéril para cada clona.

A cada clona se le dió una clave de reconocimiento que nombra el número de caja del que se obtuvo marcado con C # y las clonas de cada caja se nombraron JM#. Quedando de la siguiente forma: C1JM1.

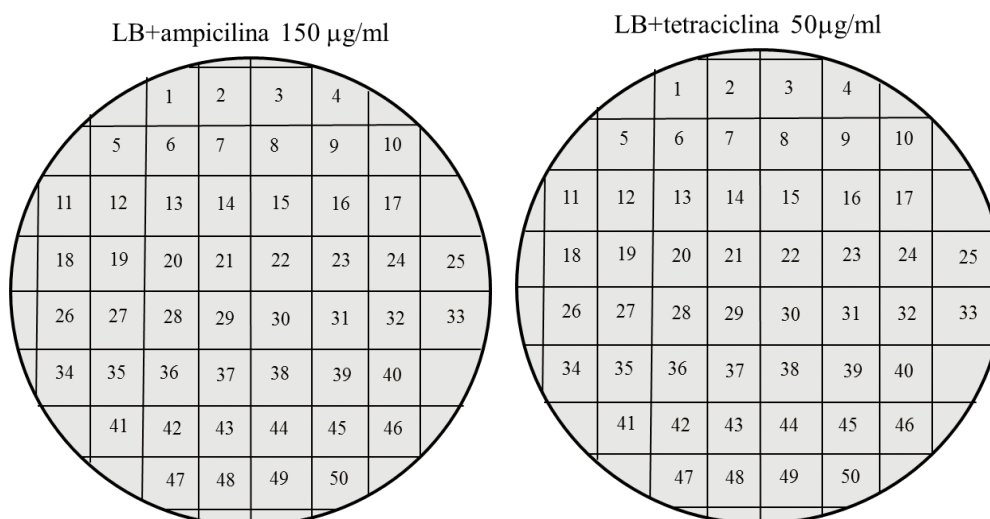


Figura 21. Representación gráfica de los patrones de sembrado utilizados en la doble selección de clonas. Aquellas colonias que crecieran en el LB con ampicilina y no crecieran en el LB con tetraciclina fueron candidatas de tener el plásmido pJM.

A las clonas candidatas se les realizó una extracción de plásmido a partir de un cultivo de 25 a 50 ml de caldo LB adicionado con Amp, por el método de lisis alcalina en su versión midi prep (figura 22), ya que la clonación del pJM tuvo como consecuencia aparente una disminución en el número de copias dentro de las células DH5 α . Las candidatas se

crecieron también en agar LB con ampicilina para mantener cada clona, mientras se realizaba su comprobación molecular.

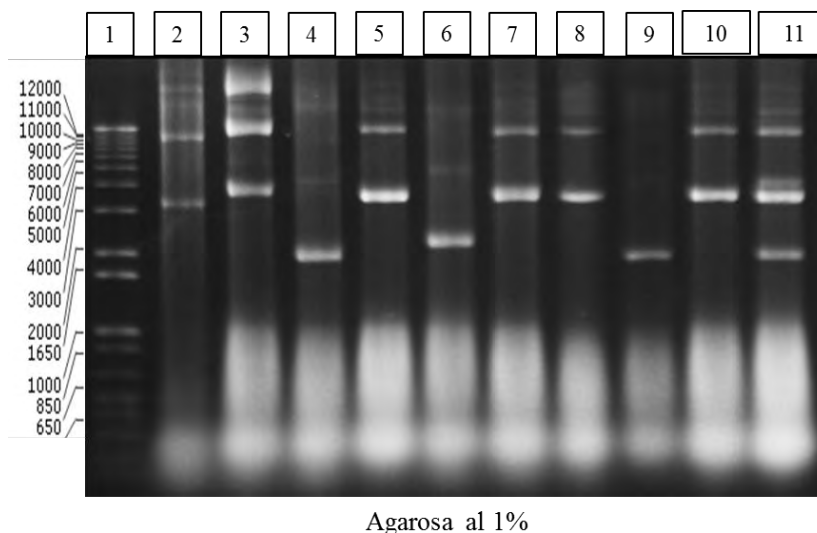


Figura 22. Extracciones de plásmido de las clonas obtenidas por la doble selección. Foto de un gel de agarosa al 1% en TAE. **Carril 1** Marcador de peso molecular 1 Kb plus de la marca Invitrogen. **Carril 2-11** ADN plasmídico de las clonas.

16.7. PCR del *Promotor stdA* clonada y secuenciación del plásmido pJM13 en DH5 α .

Se escogieron las Clonas C3JM12, 13 y 15 ya que en éstas amplificó el *Promotor stdA*, sin embargo, en los ensayos siguientes no se logró amplificar el fragmento de las clonas C3JM12 y la C3JM15 así que ya no fueron usadas para el estudio (figura 23). La clona C3JM13 fue criopreservada en leche con glicerol al 10 % a una temperatura de -75 °C en ultracongelador.

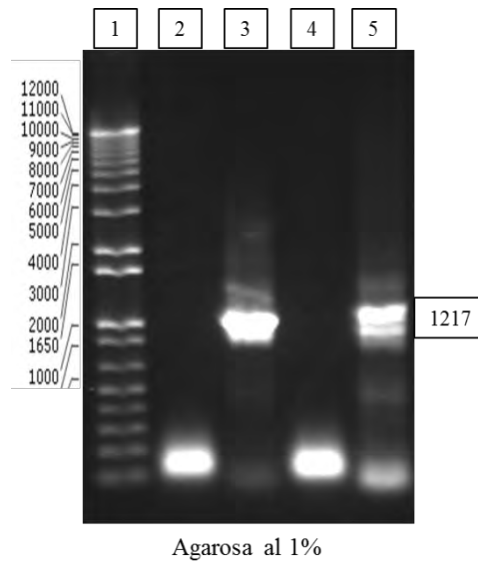


Figura 23. PCR del *Promotor stdA* de las clonas C3JM12, 13 y 15. Foto de un gel de agarosa al 1% en TAE. **Carril 1** Marcador de peso molecular 100 pb (Thermo). **Carril 2** PCR del *Promotor stdA* de la clona C3JM12. **Carril 3** PCR del *Promotor stdA* de la clona C3JM13 amplificado de 1217 pb. **Carril 4** PCR del *Promotor stdA* de la clona C3JM15. **Carril 5** PCR del *Promotor stdA* empleando como templado ADN cromosomal de SE 49214. Este ensayo se repitió porque en el anterior el marcador no se observa bien.

Como en los amplificados del *Promotor stdA* que se obtuvieron no se observó una banda nítida, se decidió hacer un ensayo de restricción con la enzima *DraI* ya que ésta no digiere el gen de resistencia TCR, pero si el *Promotor stdA*, del plásmido pJM13 que se encontraba en la clona C3JM13. Lo primero que se hizo fue la construcción *in silico* del plásmido pJM13 (figura 24) con ayuda del programa SnapGene[®], para posteriormente realizar el ensayo digital de restricción con *DraI* y observar el patrón electroforético.

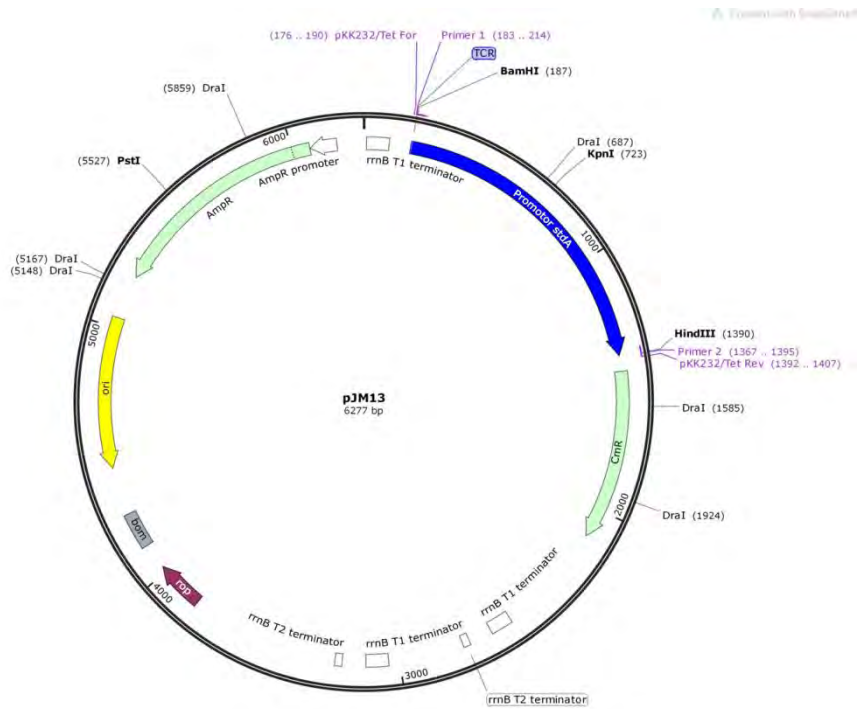


Figura 24. Mapa del vector pJM13. En azul puede observarse la posible región corriente arriba del operón *stdABCDEF*. En azul turquesa el gen reportero *cat* (CmR) corriente debajo del inserto.

El plásmido pJM13 fue purificado para su secuenciación en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM, en el cual se le realizó una secuenciación automatizada de tipo Sanger con el secuenciador automático modelo 3130xl de 16 capilares, de la marca Applied Biosystems. Después, la secuencia fue analizada con el programa SnapGene[®], el cual determinó una identidad del 99 % con la secuencia del *Promotor stdA* proveniente de la cepa de SE P125109, que se utilizó para la construcción digital del plásmido pJM13; y el amplificado del *Promotor stdA* que se obtuvo de SE 49214. En la figura 25 se muestra cómo se alinean las secuencias recibidas del IBT con el plásmido pJM13.

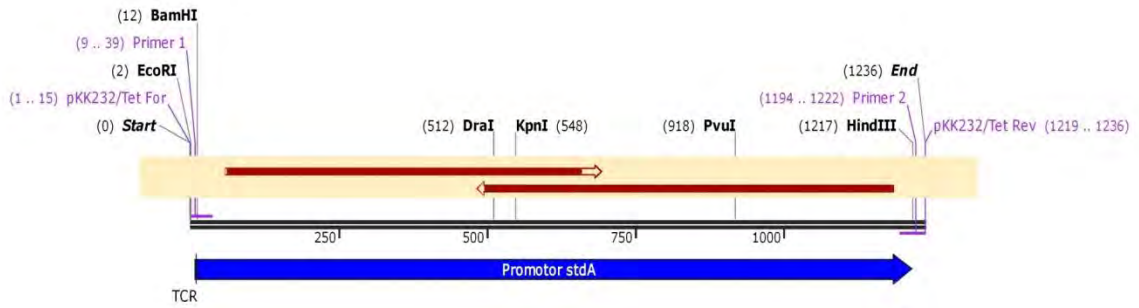


Figura 25 Alineación digital de las secuencias obtenidas usando el iniciador delantero y reversa para el *Promotor stdA* con el plásmido **pJM13**. En azul se observa la región intergénica del gen *stdA* de SE P125109 y su dirección con sentido corriente abajo del gen reportero. En rojo las secuencias delantera y reversa del *Promotor stdA* amplificado de SE 49214.

En la figura 26 se demuestra que la construcción se encuentra en el mismo sentido de transcripción con el gen reportero; lista para ser transformada en la SE 49214.

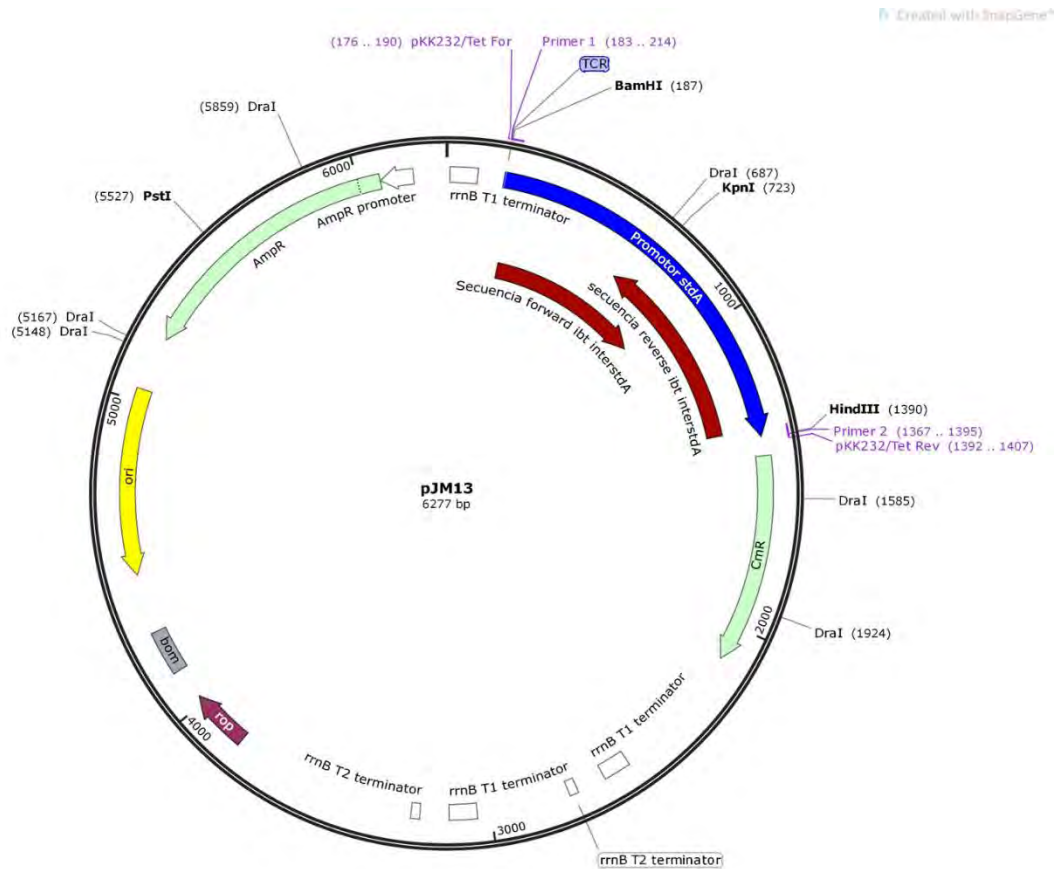


Figura 26. Mapa del vector pJM13 con el alineamiento de la secuenciación del amplificado *Promotor stdA*. Se puede observar las secuencias que se alinean en la zona de inserción de la región corriente arriba de *cat*.

16.8. Transformación del plásmido pJM13 en *Salmonella* Enteritidis 49214

Para la transformación del pJM13 en SE 49214, se realizaron diferentes ensayos. El primero de ellos fue comprobar la susceptibilidad de la cepa SE 49214 a la concentración de ampicilina de 150 µg/ml que se utilizaba para el medio LB, ya que de ser resistente se tendría un problema al momento de la selección de las clonas positivas. Así que se sembró la cepa SE 49214 en agares LB con ampicilina a una concentración de 150 µg/ml y un agar LB sin ampicilina; los medios se dejaron incubar a 37 °C por 24 h. Se demostró que la cepa SE 49214 no crecía a 150 µg/ml de ampicilina así que se prosiguió a la preparación de las células competentes de SE 49214 como se mencionó en la metodología.

Para la extracción del ADN plasmídico pJM13 de la clona C3JM13 se llevó a cabo el protocolo de lisis alcalina en su modalidad midi prep. El plásmido se purificó de un gel de agarosa al 0.8% con el kit Zymoclean Gel DNA Recovery® Zymo Research®. Ya purificado el plásmido pJM13 se utilizó para transformar las células competentes SE 49214 por electroporación.

Las clonas se sembraron en LB con Amp a una concentración de 150 µg/ml y se incubó a 37 °C por 24 h, a las colonias que se obtuvieron se les denominó SE pJM13.

16.9. Predicciones digitales, ensayos de restricción con *DraI*, *BamHI* y *HindIII*; y PCR del plásmido pJM13 en *Salmonella* Enteritidis 49214.

Para la comprobación de las clonas SE pJM13 se realizó un ensayo de restricción con las enzimas *DraI*, *BamH1* y *HindIII* en primera instancia.

Previamente se extrajo el plásmido pJM13, a la par se realizó la simulación del ensayo de restricción con la enzima *DraI* y su patrón electroforético (figura 27).

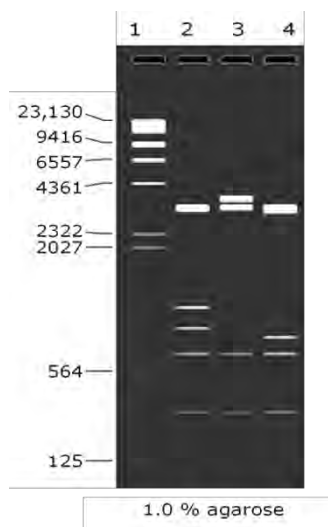


Figura 27. Predicción electroforética del ensayo de restricción para el plásmido pJM13 con *DraI*.
Carril 1 Marcador de peso molecular λ /*HindIII* Invitrogen®. **Carril 2** Plásmido pJM13 digerido con *DraI* se obtienen 6 fragmentos: 1.- 3224 pb, 2.- 1105 pb, 3.- 898 pb, 4.- 692 pb, 5.- 339 pb y 6.- 19 pb. **Carril 3** Plásmido pKK232/Tet se obtienen 5 fragmentos: 1.- 3610 pb, 2.- 3224 pb, 3.- 692 pb, 4.- 339 pb y 5. 19 pb. **Carril 4** Plásmido pKK232-8 se obtienen 5 fragmentos: 1.- 3224 pb, 2.- 820 pb, 3.- 692 pb, 4.- 339 pb y 5. 19 pb

Ya con la predicción del patrón electroforético se procedió a realizar el ensayo con *DraI* y el análisis de éste por medio de electroforesis horizontal; en la figura 28 se muestra el patrón esperado para el plásmido pJM13.

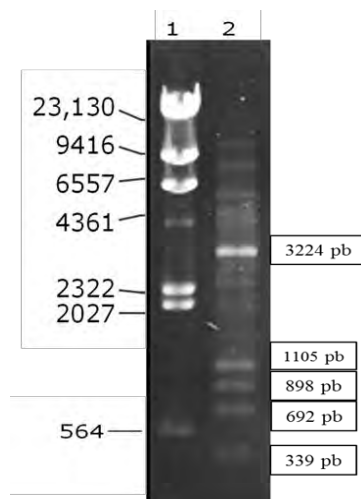


Figura 28. Ensayo de restricción para el plásmido pJM13 con *DraI*. Foto de un gel de agarosa al 1% en TAE. **Carril 1** Marcador de peso molecular λ /*HindIII* Invitrogen®. **Carril 2** Plásmido pJM13 digerido con *DraI* se obtienen 6 fragmentos: 1.- 3224 pb, 2.- 1105 pb, 3.- 898 pb, 4.- 692 pb, 5.- 339 pb y 6.- 19 pb

Posteriormente al ensayo de digestión con *DraI*, se realizó una predicción digital de los patrones electroforéticos del plásmido pJM13 digerido con *BamHI*, lo cual permitiría evaluar su peso lineal de 6277 pb; y una doble digestión con *BamHI* y *HindIII* en el cual se observaría la salida del *Promotor stdA* de 1203 pb y un fragmento de 5074 pb del plásmido (figura 29)

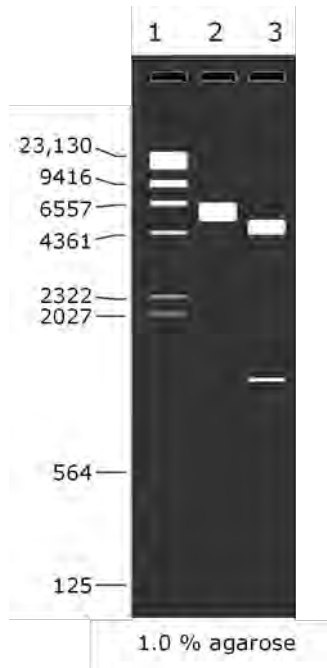


Figura 29. Predicción del ensayo de restricción para el plásmido pJM13 con *Bam*HI y *Hind*III. Carril 1 Marcador de peso molecular λ /*Hind*III Invitrogen®. **Carril 2** Plásmido pJM13 digerido con *Bam*HI se obtienen 1 fragmento de 6277 pb que corresponde al peso lineal del plásmido. **Carril 3** Plásmido pJM13 digerido con *Bam*HI y *Hind*II se obtienen 2 fragmentos uno de 5074 pb que corresponde al plásmido y 1203 pb que pertenecen al *Promotor stdA*.

Una vez predicho el patrón de restricción se procedió a realizar el ensayo con las enzimas, en la figura 30 se observan los resultados de dicho experimento.

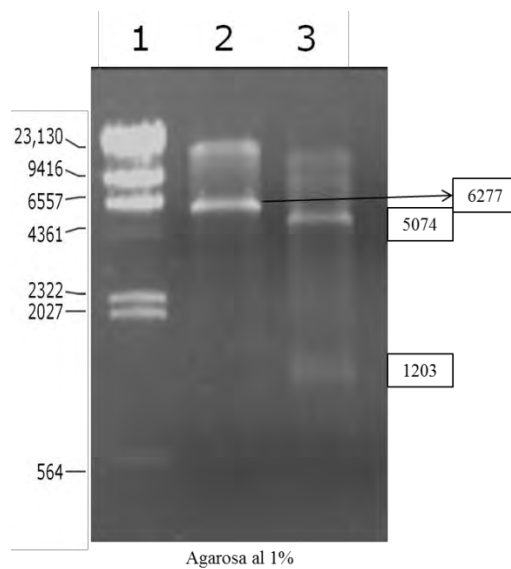


Figura 30. Ensayo de restricción para el plásmido pJM13 *Bam*HI y *Hind*III. Foto de un gel de agarosa al 1% en TAE. **Carril 1** Marcador de Peso Molecular λ /*Hind*III Invitrogen®. **Carril 2** Plásmido pJM13 digerido con *Bam*HI se obtienen un fragmento de 6277 pb que corresponde al peso lineal del plásmido. **Carril 3** Plásmido pJM13 digerido con *Bam*HI y *Hind*III se obtienen dos fragmentos uno de 5074 pb que corresponde al plásmido y 1203 pb que pertenecen al inserto.

También se realizó la PCR del pJM13 con los iniciadores para el plásmido, que permiten la amplificación del sitio múltiple de clonación. Gracias a la herramienta digital de simulación de PCR y el patrón electroforético se pudo obtener una simulación de la electroforesis para los productos de la PCR, tanto para el pJM13, así como para el pKK232/Tet original. En la figura 31 se esquematiza el patrón electroforético de tres reacciones de PCR; el primer amplificado de 1234 pb correspondiente al *Promotor stdA* clonado en pJM13 y amplificado con los iniciadores pKK-F y pKK-R; el segundo amplificado de 2841 pb corresponde al gen TCR amplificado en el pKK232/Tet con los iniciadores pKK-F y pKK-R, es importante señalar que en la predicción, el fragmento posee 500 pb más que aquel fragmento que está clonado en el pKK232/Tet y el tercer amplificado de 1217 pb correspondiente al *Promotor stdA* cromosómico de SE pJM13 con los iniciadores stdAIntergenic1F y stdAIntergenic1R.

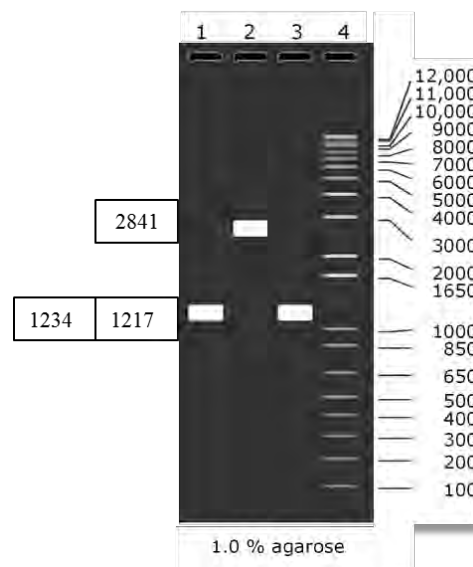


Figura 31. Predicción virtual de la PCR del *Promotor stdA* del plásmido pJM13, del gen TCR del plásmido pKK232/Tet y del *Promotor stdA* cromosómico de SEpJM13. Carril 1 PCR del pJM13 con los iniciadores para el pKK232/Tet, amplificado de 1234 pb. Carril 2 PCR del pKK232/Tet con los iniciadores para el pKK232/Tet, amplificado de 2841 pb. Carril 3 PCR del Promotor con los iniciadores para el *Promotor stdA* a partir del ADN de SE pJM13, amplificado de 1217 pb. Carril 4 Marcador de peso Molecular 1 Kb plus Invitrogen®.

Se realizaron las PCR correspondientes y los amplificados se analizaron mediante electroforesis en agarosa al 1% en TAE (Figura 32)

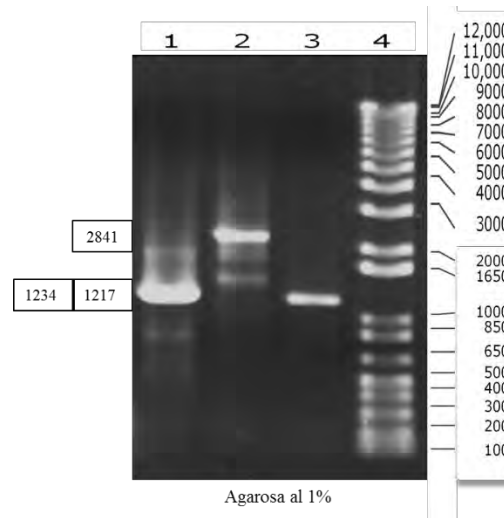


Figura 32. PCR del *Promotor stdA* del plásmido pJM13, del gen TCR del plásmido pKK232/Tet y del *Promotor stdA* cromosómico de SEpJM13. Foto de un gel de agarosa al 1% en TAE. Carril 1 PCR del pJM13 con los iniciadores para el pKK232/Tet, amplificado de 1234 pb. Carril 2 PCR del pKK232/Tet con los iniciadores para el pKK232/Tet, el amplificado tiene un peso aproximado a 2841 pb. Carril 3 PCR del Promotor con los iniciadores para el *Promotor stdA* a partir del ADN de SE pJM13, amplificado de 1217 pb. Carril 4 Marcador de peso Molecular 1 Kb plus Invitrogen®.

Como comprobación del amplificado del pJM13 obtenido con los iniciadores pKK-F y pKK-R; se llevó a cabo un ensayo de restricción con las enzimas *DraI* y *KpnI* que se utilizaron previamente para comprobar el amplificado del *Promotor stdA*. El amplificado del *Promotor stdA* fue ocupado como control positivo de la digestión y este se obtuvo mediante una PCR a partir del ADN de SE 49214. Como ya se ha mencionado antes de realizar la digestión de los fragmentos amplificados, se hizo una predicción digital del patrón electroforético mediante el programa SnapGene® (figura 33) en la cual se observa

que hay una pequeña discrepancia en el tamaño de los fragmentos que sería indiferenciable en un gel de agarosa.

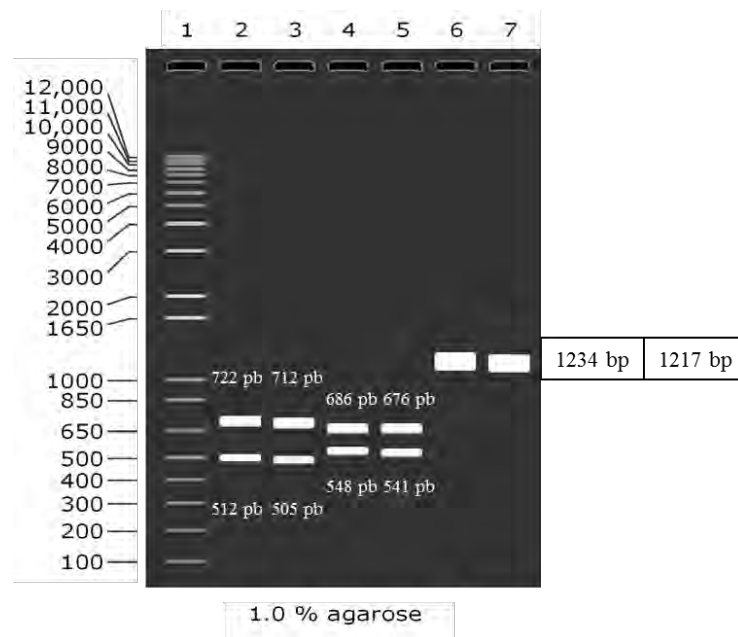


Figura 33. Predicción digital del ensayo de restricción con *DraI* y *KpnI* para el amplificado del pJM13 usando los iniciadores pKK-F y pKK-R. Carril 1 Marcador de Peso Molecular 1Kb plus Invitrogen®. **Carril 2** Amplificado del pJM13 con iniciadores pKK-F y pKK-R digerido con *DraI*; se obtienen dos fragmentos uno de 722 pb y otro de 512 pb. **Carril 3** Amplificado del *Promotor stdA* con los iniciadores stdAIntergenic1F y stdAIntergenic1R digerido con *DraI*; se obtienen dos fragmentos uno de 712 pb y otro de 505 pb. **Carril 4** Amplificado del pJM13 con iniciadores pKK-F y pKK-R digerido con *KpnI*; se obtienen dos fragmentos uno de 686 pb y otro de 548 pb. **Carril 5** Amplificado del *Promotor stdA* con los iniciadores stdAIntergenic1F y stdAIntergenic1R digerido con *KpnI*; se obtienen dos fragmentos uno de 676 pb y otro de 541 pb. **Carril 6** Amplificado del pJM13 con iniciadores pKK-F y pKK-R sin digerir 1234 pb. **Carril 7** Amplificado del *Promotor stdA* con los iniciadores stdAIntergenic1F y stdAIntergenic1R sin digerir 1217 pb.

El análisis del ensayo de digestión con las enzimas *DraI* y *KpnI* se visualizó en un gel de agarosa al 1% en TAE (figura 34). Con ello se demuestra que la cepa SE pJM13 contiene el plásmido de interés, con el fragmento perteneciente al *Promotor stdA* clonado en su sitio múltiple de clonación.

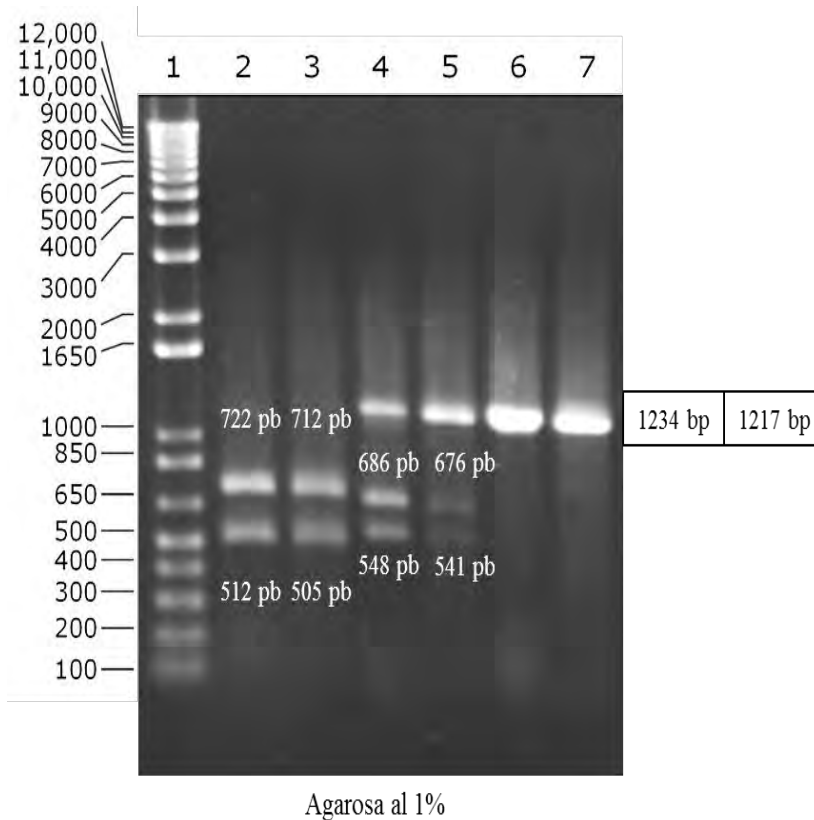


Figura 34. Ensayo de restricción con *DraI* y *KpnI* para el amplificado del pJM13 usando los iniciadores pKK-F y pKK-R. Foto de un gel de agarosa al 1% en TAE. **Carril 1** Marcador de peso molecular 1Kb plus Invitrogen®. **Carril 2** Amplificado del pJM13 con iniciadores pKK-F y pKK-R digerido con *DraI*; se obtienen dos fragmentos uno de 722 pb y otro de 512 pb. **Carril 3** Amplificado del *Promotor stdA* con los iniciadores stdAIntergenic1F y stdAIntergenic1R digerido con *DraI*; se obtienen dos fragmentos uno de 712 pb y otro de 505 pb. **Carril 4** Amplificado del pJM13 con iniciadores pKK-F y pKK-R digerido con *KpnI*; se obtienen dos fragmentos uno de 686 pb y otro de 548 pb. **Carril 5** Amplificado del *Promotor stdA* con los iniciadores stdAIntergenic1F y stdAIntergenic1R digerido con *KpnI*; se obtienen dos fragmentos uno de 676 pb y otro de 541 pb. **Carril 6** Amplificado del pJM13 con iniciadores pKK-F y pKK-R sin digerir 1234 pb. **Carril 7** Amplificado del *Promotor stdA* con los iniciadores stdAIntergenic1F y stdAIntergenic1R sin digerir 1217 pb.

16.10. Estandarización de las condiciones de cultivo.

La estandarización de las condiciones de cultivo fue importante en el ensayo de expresión de la fusión reportera *Promotor stdA-cat*, ya que la variación de estas nos ofrecería resultados muy diferentes entre experimentos.

16.10.1. Volúmenes de medio 5ml y 10ml

En primera instancia se probaron 2 volúmenes de medio de cultivo 5 ml y 10 ml de WM y LB con Amp a 37 °C a 100 o 150 rpm por 16 h. Los resultados de dichos experimentos nos permitieron decidir que 5 ml sería el volumen que se utilizó en los siguientes ensayos de expresión, ya que se obtenía una actividad del promotor menos variable y detectable por el equipo CERES ELx808 Biotek®. Mientras que en los cultivos de 10 ml los resultados eran tan variables que en ocasiones no era detectable la actividad del promotor, aunque se trabajaran tubos pareados.

16.10.2. Velocidades de agitación 100 rpm y 150 rpm

La siguiente condición que se fijó para el experimento fue la velocidad de agitación, se realizaron cultivos en 5 ml de LB y WM con Amp a 37 °C por 16 h a 150 rpm y 100 rpm asumiendo que un número bajo en las revoluciones ayudaría al proceso de encendido de la fusión *stdA-cat* en SEpJM13. Pero principalmente a que en ensayos *in vitro* en los que se ha evaluado la capacidad de síntesis de la fimbria Std en *Salmonella* Typhimurium, se han utilizado de 200-250 rpm para los cultivos, concluyendo que no hay expresión de la fimbria bajo estas condiciones (Velden *et al.*, 1998; Weening *et al.*, 2005; Clayton *et al.*, 2008a; Shippy *et al.*, 2013). Finalmente se decidió utilizar 100 rpm para los ensayos de expresión de CAT debido a que la variación en los resultados es menor a la obtenida en los ensayos a 150 rpm.

16.10.3. Medios de cultivo a pH 7.4

La tercera condición que se manejó como constante fue la del pH en los medios de cultivo, se utilizó como base un pH de 7.4 para los ensayos. Esta evaluación a diferencia de las anteriores no se realizó con un cultivo a diferentes pH. Si no que fue hecha durante los ensayos anteriores en los cuales cuando se notaba una disminución en la expresión del gen *cat* y un cambio visual de color naranja claro a un rosado intenso, debido al rojo de fenol de los medios de cultivos celulares DMEM y WM, se procedía a medir el pH a una fracción de 20 ml de todos los medios de cultivo con el uso de un potenciómetro. Aquí se observó que el pH de los medios DMEM y WM variaba después de los tres meses en refrigeración subiendo a pH 8.0, mientras que los medios M9MM y LB se mantenían cercanos al pH 7.6. Todo esto con un decremento en la expresión de la fusión reportera y en la biomasa del cultivo. Por lo mismo los medios eran preparados a un pH 7.4 y cambiados a los tres meses de haberse preparado.

16.11. Cinética de crecimiento de 8 h de SEpJM13 en WM

Para los ensayos de expresión del gen reportero, se evaluaron dos metodologías para el crecimiento de SEpJM13 en medio WM, que nos permitirían cosechar a la bacteria en la fase logarítmica tardía.

Se eligió esta fase en la curva de crecimiento bacteriano con base en los experimentos en los que se trabaja la expresión de la SPI I de *Salmonella*, en estos estudios se reporta que la fase estacionaria es la más usada para los ensayos de invasión ya que en ésta, la bacteria expresa los genes de la SPI I que dan origen al SSTIII y a las proteínas efectoras de dicha isla genómica. (Martínez *et al.*, 2012, 2014; Petrone, Stringer & Wade, 2014)

Otro de los motivos por los que se escogió la fase logarítmica tardía fue que López-Garrido & Casadesús, 2012. reportaron que los genes *stdE* y *stdF* regulan negativamente el gen *hilD*, que es uno de los principales reguladores de la SPI I; por lo que se infirió que el momento máximo de expresión de la fimbria Std sería en a la fase logarítmica tardía, en la cual la bacteria podría tener su mayor capacidad de adherencia.

En la figura 35 se observa que a las 6 h de crecimiento tanto para el preinóculo como para el inóculo se llega a la fase logarítmica tardía, sin embargo, aun cuando los dos cultivos llegan en el mismo tiempo a la misma posición en la curva, el inóculo llega con una DO más alta (1.323) que la del preinóculo (0.982 nm), así que para los ensayos siguientes se utilizó el segundo protocolo de crecimiento de 16h de cultivo inicial pero solo 6 h de cultivo final. (Metodología descrita en el punto 15.12)

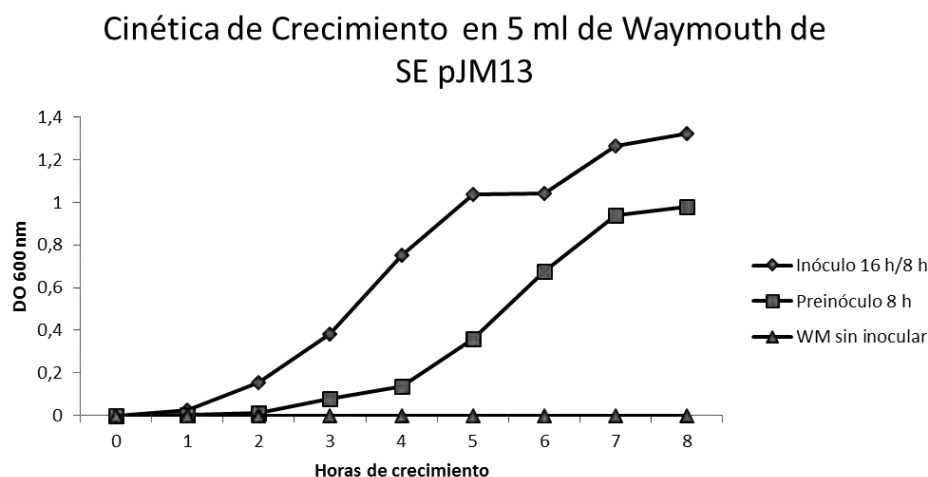


Figura 35. Gráfica de las DO a 600 nm de SEpJM13 en los 2 protocolos de crecimiento. Con rombos se indican las DO₆₀₀ nm de SEpJM13 en el protocolo para el Inóculo (16 h/8 h). Con cuadrados se indican las DO₆₀₀ nm de SEpJM13 en el protocolo para el Preinóculo (8 h). Con triángulos el control negativo medio WM pH 7.4 con ampicilina sin inocular.

16.12. Ensayos de expresión en los medios de cultivo M9M, LB, DMEM y WM

Ya con el protocolo de crecimiento estandarizado, se procedió a realizar los ensayos de expresión de la fusión reportera creciendo a SEpJM13 en 4 medios de cultivos. El medio

mínimo M9 (M9MM) que está compuesto de las sales mínimas necesarias para el crecimiento bacteriano y 0.4 % de glucosa; se pensó que serviría como control negativo de la expresión CAT. El medio Luria-Bertani (LB) que es un medio enriquecido, utilizado de forma común en diferentes ensayos de laboratorio; en los que no se ha reportado la síntesis de la fimbria Std para SE, mientras que para ST se ha logrado la expresión de Std pero solo por la mutaciones en genes de regulación general (Balbontín *et al.*, 2006; Chessa *et al.*, 2008, 2009; Jakomin *et al.*, 2008). El medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que es un medio común utilizado para cultivo celular, fue utilizado en experimentos (Dostal *et al.*, 2014) en donde se reportó la capacidad de *Salmonella* Typhimurium de invadir o de persistir adherida en células Caco-2 y HT29/MTX a diferentes concentraciones de hierro, *S.* Typhimurium mostró que su capacidad de invadir se ve afectada a concentraciones mayores a 250 μM de hierro, por el contrario la adherencia de la bacteria se mantuvo en cultivo celular; y por último se utilizó el medio Waymouth MB752/1 (WM) que es un medio para cultivo celular diseñado para las células de hepatocarcinoma de pollo LMH-1 y que ya se tenía en el laboratorio.

En la figura 36 se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los medios, es importante resaltar que los valores de actividad de CAT son la media de tres experimentos y se presenta la desviación estándar que se obtuvo para cada uno de ellos. (Puente *et al.*, 1996)

Los resultados demuestran que existe una diferencia en la expresión del reportero entre el medio WM en el cual se obtuvo una expresión media de 35.6538 unidades de actividad específica mientras que en los otros tres medios no existe una diferencia entre los valores obtenidos. Estos datos demuestran que la composición química del medio de cultivo

permite que el *Promotor stdA* inicie la transcripción del gen reportero, por lo que se puede inferir que el proceso de transcripción del operón *std* en SE da inicio. Mientras que el medio de cultivo LB tuvo una expresión de 11.778 unidades de actividad específica siendo el segundo mejor medio de cultivo, sin embargo, no llega ni a la mitad de lo obtenido en el medio WM. Para el medio M9MM la expresión de 8.5475 unidades, fue la menor de todas y la más variable como demuestra su desviación estándar de 12.088 unidades, por lo que se decidió eliminar este medio de ensayos subsecuentes. En el caso del medio DMEM se esperaba que la SEpJM13 presentara una expresión mayor, sin embargo, ésta fue de 8.0418 unidades de actividad específica con una desviación estándar de 5.017, por lo que el medio ya no fue utilizado en los ensayos subsecuentes.

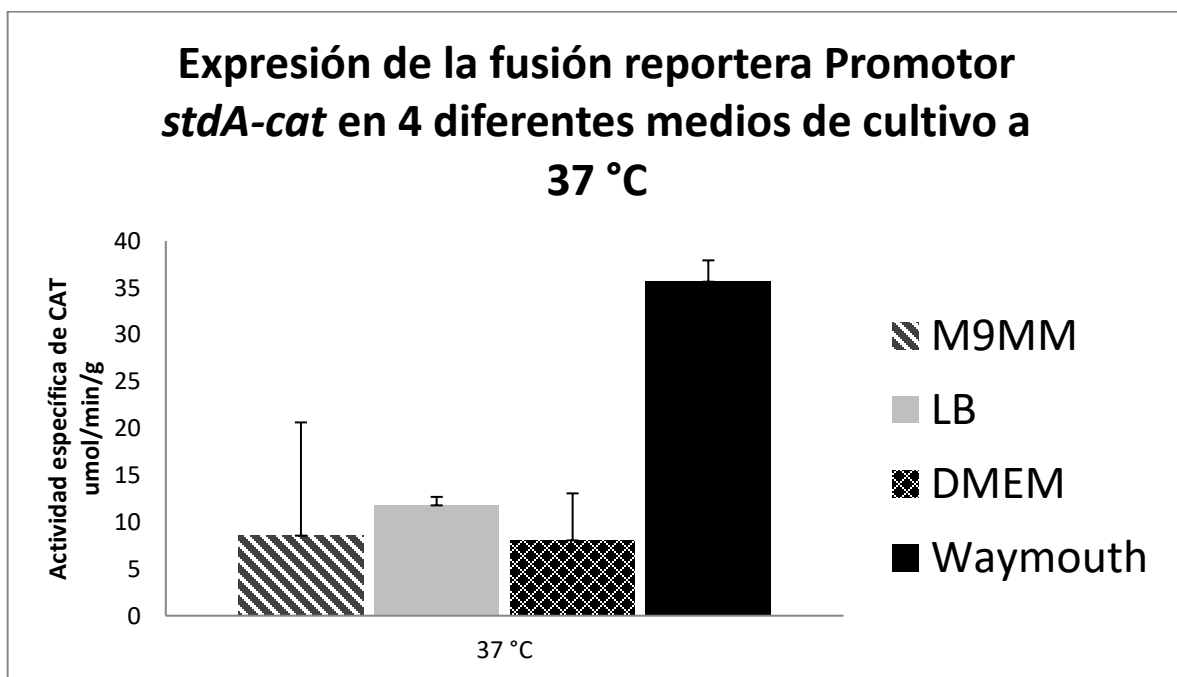


Figura 36. Niveles de expresión de CAT de SEpJM13 crecidas por 6 h en medios M9MM, LB, DMEM y WM con pH de 7.4 a 37 °C a 100 rpm. Unidades del reportero CAT en medio M9MM (▨), LB (□), DMEM (▩) y WM (■) a 37 °C. Las barras representan la media de tres experimentos con sus respectivas desviaciones estándar.

16.13. Ensayos de expresión de CAT a 3 temperaturas de crecimiento 30, 37 y 42 °C en medio LB y WM

Para comprobar si la temperatura de crecimiento, sumada a las diferencias en la composición de los medios de cultivo LB y WM, afectaban el encendido de la fusión *stdA-cat* se decidió probar a la cepa SEpJM13 en los dos medios, creciendo a 30 °C, 37 °C y 42°C. Las diferentes temperaturas fueron elegidas por las siguientes razones: 30 °C fue utilizada, por la capacidad de SE de sobrevivir y mantenerse viable, mientras se encuentra adherido a diferentes estructuras inertes, así como a tejidos vegetales (López-Garrido *et al.*, 2015)(Wiedemann *et al.*, 2015); 37 °C ya que es la temperatura de los organismos mamíferos a los que infecta SE ya sea de forma natural o experimental. Además de que es la temperatura de crecimiento en la cual se han realizado la mayoría de los experimentos en los que se evalúan la adherencia y las fimbrias (Bäumler, Tsolis & Heffron, 1996a,b; Norris, Kingsley & Bümler, 1998; Velden *et al.*, 1998; Allen-Vercoe & Woodward, 1999; Edwards, Schifferli & Maloy, 2000; Chessa *et al.*, 2009). Por último 42 °C porque es la temperatura media de las aves (Blackall & Soriano-Vargas, 2013), otra razón es que se encuentra cerca de la temperatura de fiebre que puede sufrir un mamífero en un proceso infeccioso de hasta casi 40 °C.

En la figura 37 se presentan los resultados obtenidos para cada una de las temperaturas con el LB y el WM, los valores que se presentan en la gráfica son las medias de tres experimentos y sus respectivas desviaciones estándar(Puente *et al.*, 1996).

De este ensayo se obtuvieron dos conclusiones principales las cuales fueron:

- La temperatura afecta de forma inversa la expresión de la fusión reportera *stdA-cat*; como se puede observar en la figura 37 la actividad media específica obtenida tanto para el LB, así como para el WM, en la temperatura más baja de 30 °C los valores

más altos fueron de 17.359 unidades CAT para el LB y 28.027 para el WM con desviaciones en los valores no mayores a 4. Mientras que en la temperatura de 37 °C las unidades de CAT en medio LB y en medio WM; fueron de 14.344 y 18.874; con valores de desviación de 1.021 y 4.395, respectivamente para cada medio. Por último, a la temperatura de 42 °C los valores obtenidos fueron los menores de todo el ensayo. Obteniendo unidades de CAT para el LB y para el WM de 9.838 y 16.046; con desviaciones de 1.779 y 2.385, respectivamente.

- La diferencia en la expresión de CAT, entre el medio WM y LB que se observó en el experimento anterior se mantuvo principalmente para las temperaturas de 30 °C y 42 °C, aunque los valores de las medias en la temperatura de 37 °C no presentan una separación mayor, se consideró que los datos son relevantes y que pudieran ser producto de la degradación que sufre el medio WM debido al tiempo que transcurrió entre su formulación y hasta que fue utilizado.

Para los experimentos subsecuentes se utilizó la temperatura de 42 °C, que a pesar de haber presentado una disminución en la expresión de CAT, mantuvo una diferencia entre los medios LB y WM que sirvió de base para los ensayos en donde se evaluaron concentraciones de hierro y de lisina. Pero se hace relevante que en estudios posteriores se estudien otras condiciones de crecimiento con la temperatura de 30 °C, la que ha demostrado ser un factor que permite la expresión positiva del gen *stdA*.

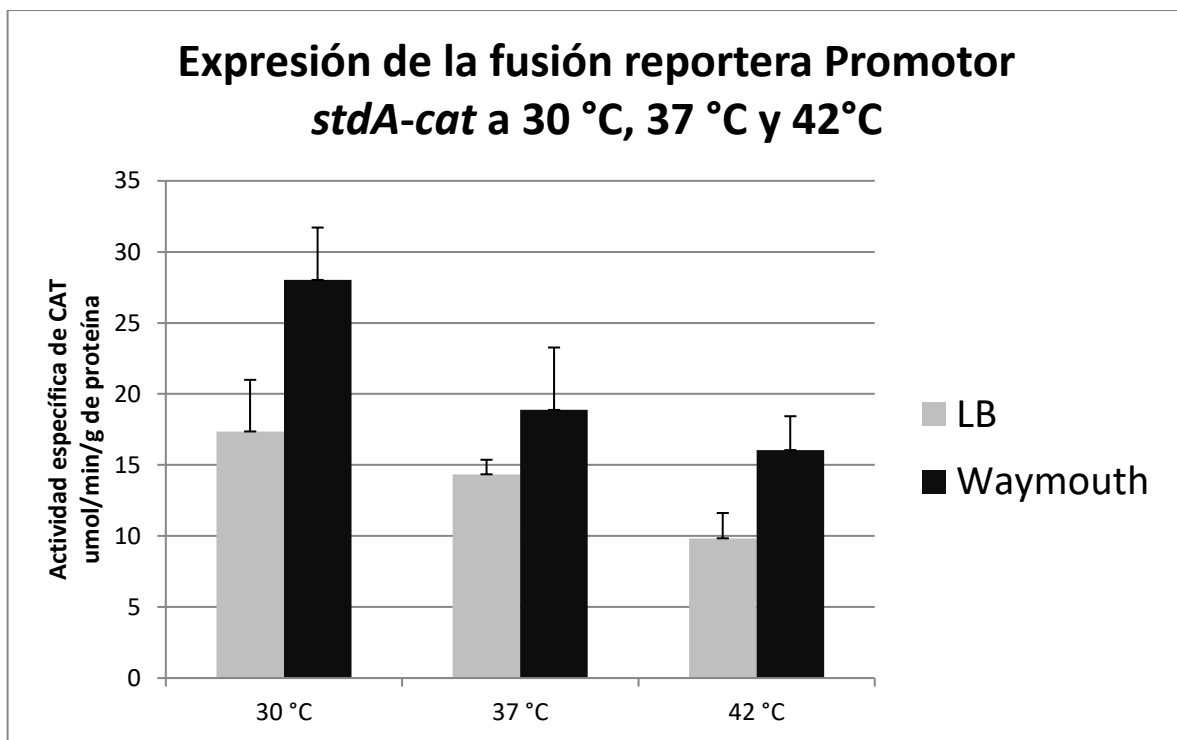


Figura 37. Niveles de expresión de CAT en medios LB y WM a pH 7.4 a 30 °C, 37 °C y 42 °C. Unidades del reportero CAT en medio LB (□) y en WM (■) a temperaturas de 30 °C, 37 °C y 42 °C. Las barras representan la media de tres experimentos con sus respectivas desviaciones estándar.

16.14. Ensayos de expresión de CAT en diferentes concentraciones de FeCl₃·6H₂O en medio LB y WM a 42 °C

De las diferentes proteínas reguladoras que el programa Bprom de Softberry (Solovyev & Salamov, 2010; Softberry, 2011) propuso que podían interactuar con el primer promotor de la predicción digital, se eligió a Fur. Esta proteína está involucrada en la excreción y recuperación del hierro (Fe) por parte de la bacteria, debido a que se ha reportado que participa no solo en los procesos dependientes de hierro, si no que a su vez tiene una función regulatoria en una variedad de genes que van desde los que se dedican a la sobrevivencia de *Salmonella* al pH ácido del estómago hasta la regulación de la invasión de la bacteria a células no fagocíticas (Hall & Foster, 1996; Hantke, 2001; Tiss *et al.*, 2005; Teixidó *et al.*, 2011; Moest & Méresse, 2013). En ensayos hechos por Dostal *et al.*, 2014

reportaron que las concentraciones intestinales de Fe modifican la invasividad de la bacteria. Sus resultados indican que a concentraciones mayores de 250 μM de Fe, *S. Typhimurium* persiste adherida a las células Caco-2 y HT29/MTX pero que no las invade. En la figura 38 se presentan los resultados obtenidos para cada una de las concentraciones de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tanto para el WM como para el LB. Los valores que se presentan en la gráfica son las medias de tres experimentos y sus respectivas desviaciones estándar (Puente *et al.*, 1996).

La expresión de la fusión ya había mostrado una diferencia clara entre el medio WM y el LB a 42 °C aun antes de que se agregara Fe a los medios. Sin embargo, el Fe ocasionó una elevación en la actividad del reportero en el medio WM con valores mayores a 80 unidades y desviaciones no mayores a 17 unidades en todo el rango de concentraciones usadas, que al compararlas con el control representan un aumento de más del 250 % en las unidades de CAT. De manera interesante, si las medias obtenidas en el WM con $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se comparan con la media del LB control (sin $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) el porcentaje de incremento en la expresión de CAT es de más del 800 %.

Más aun, en el LB suplementado con $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, los valores de las medias no son mayores de 16 unidades de actividad y las desviaciones presentan valores menores de 5. Ninguna de las concentraciones de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ usadas en el LB presenta una diferencia en la expresión del gen reportero comparada con el LB control (sin $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).

Considerando lo anterior se llega a la conclusión de que las concentraciones de hierro, en un rango de 250 μM y hasta 1000 μM ; y la composición química del medio WM permiten la expresión de CAT por parte de la cepa SEpJM13. Con lo cual se puede inferir que el gen *stdA* cromosómico de *S. Enteritidis* se está transcribiendo bajo las condiciones de

crecimiento establecidas para este experimento. Mientras que en el medio LB no se observa un cambio en la expresión del gen reportero en ninguna concentración de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ comparada con el control.

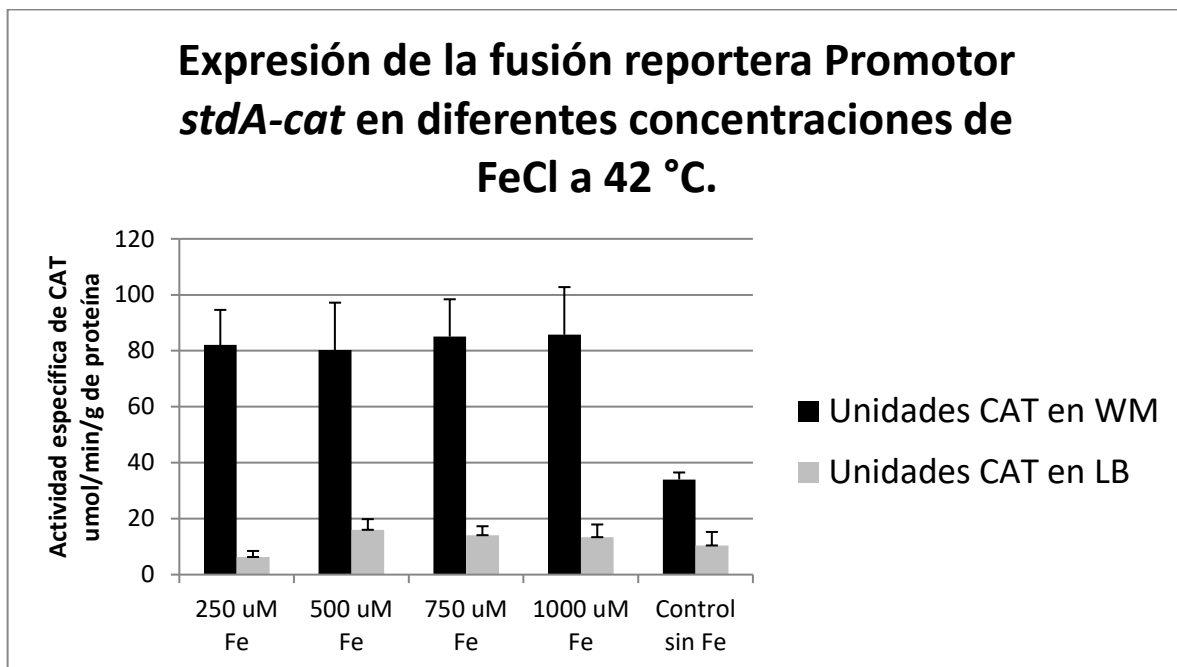


Figura 38. Niveles de expresión de CAT en medios WM (■) y LB (□) a pH 7.4 a 42 °C con diferentes concentraciones de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Las concentraciones de hierro empleadas se indican en el eje de las X. Las barras representan la media de tres experimentos con sus respectivas desviaciones estándar

16.15. Ensayos de expresión de CAT en diferentes concentraciones de Lisina en medio LB y WM a 42 °C

Se utilizó clorhidrato de lisina tomando con base al siguiente razonamiento: Jakomin *et al.*, 2008 describieron el regulador positivo de la transcripción de *stdA*, nombrándolo como HdfR. Los autores mencionan que el regulador pertenece a la familia de proteínas reguladoras de tipo LysR y que muy probablemente su actividad reguladora la realice directamente modificando la activación de los reguladores negativos de *stdA* que son Dam, SeqA y RosE (Balbontín *et al.*, 2006; Chessa *et al.*, 2008; Jakomin *et al.*, 2008). Entonces, debido a que algunos de los reguladores de la familia LysR pueden ser dependientes de

lisina, se decidió probar con diferentes concentraciones de lisina en los medios LB y WM.(Schell, 1993; Maddocks & Oyston, 2008)

En la figura 39 se presentan los resultados obtenidos para cada una de las concentraciones de lisina tanto para el LB como para el WM. Los valores que se presentan en la gráfica son las medias de tres experimentos y sus respectivas desviaciones estándar (Puente *et al.*, 1996).

Los resultados obtenidos en los ensayos de expresión de CAT en los medios LB y WM suplementados con lisina en un rango de concentraciones de 250 μg y hasta 1000 μg no mostraron cambio alguno comparado con el control, que era medio sin lisina. Además de que la variabilidad en este ensayo fue elevada para el LB. Por lo que se concluye que la expresión del gen *stdA* es independiente de la concentración de lisina para ambos medios LB y WM para las condiciones estandarizadas en este trabajo; y a la temperatura de 42 °C.

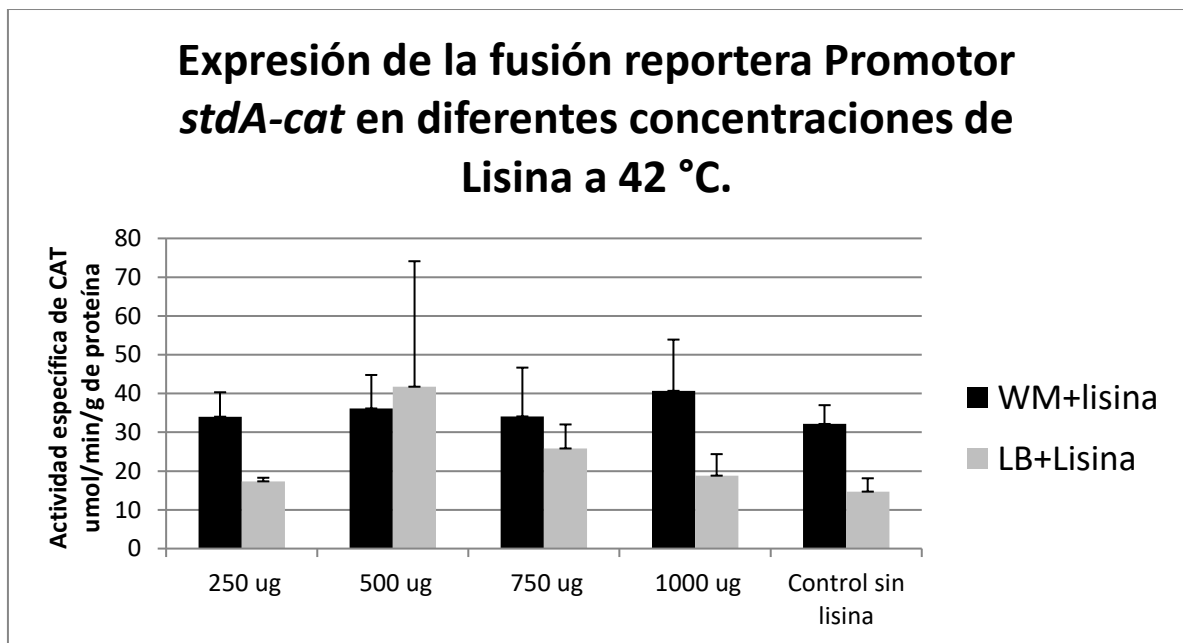


Figura 39. Niveles de expresión de CAT en medios WM (■) y LB (□) a pH 7.4 a 42 °C con diferentes concentraciones de lisina. La concentración final de lisina en $\mu\text{g}/\text{ml}$ está indicada para cada par de barras, en el eje de las X.

Las barras representan la media de tres experimentos con sus respectivas desviaciones estándar.

17. Discusión

En el presente trabajo se demostró la activación de la región promotora del gen *stdA* por medio de una fusión reportera a CAT, para ello se evaluaron diferentes condiciones ambientales, siendo la óptima el uso del medio de cultivo celular WM a temperatura de 42 °C y en concentraciones crecientes de FeCl₃-6H₂O en un intervalo de 250-1000 μM, que ocasionó un aumento de más del 800 % en la expresión del reportero comparada con el medio LB control. Estos resultados se pueden correlacionar con lo reportado por Dostal *et al.*, 2014 quienes demostraron que el aumento en la concentración de hierro permitía un incremento de 8 veces en la adherencia de la bacteria al cultivo celular, pero con una disminución de 7 veces en la invasividad. En este trabajo, a partir de los resultados solo se puede inferir que la transcripción del gen *stdA* se está llevando a cabo.

Shippy *et al.* 2013, demostraron que la fimbria Std de SE es necesaria para la adherencia a células epiteliales y la mucosa intestinal de las aves, además observaron que la mutante Δ *stdA* es ineficiente en la invasión de células T84 de epitelio intestinal. Este efecto en la invasión no fue estudiado más a fondo en el reporte y se sugirió que era debido a la eliminación de *stdA* del cromosoma de la bacteria.

En los ensayos de mapeo del inicio de transcripción del gen *stdA* que reporta Jakomin *et al.*, 2008 se ofrece la secuencia de la región promotora, que al compararla con la secuencia reportada de *stdA* en SE 125109 mediante un alineamiento *in silico*, éste queda a unas cuantas pares de bases del codón de inicio del gen *stdA*, por lo que nos preguntamos; si la eliminación de *stdA* en el ensayo de Shippy *et al.* 2013 mantuvo apagados los demás genes que forman parte del operón en el cromosoma de SE fagotipo 8 o si éstos se transcribieron, con lo cual la invasividad podría verse afectada por la expresión de los genes *stdE* y *stdF*,

los cuales regulan negativamente al mensajero de *hilD* (López-Garrido & Casadesús, 2012); lo que pudo dar origen a la disminución en la capacidad de invasión de células no fagocíticas.

La síntesis de la fimbria Std fue reportada por Chessa *et al.*, 2008, ST solo sintetizó la fimbria mutando genes de regulación general como son *dam* y *seqA* además de *rosE*, los cuales regulan negativamente el operón Std (Balbontín *et al.*, 2006; Chessa *et al.*, 2008). Con la eliminación de estos tres reguladores se logró expresar la fimbria Std en condiciones de laboratorio en las que normalmente no se había reportado que la fimbria se expresa. En este trabajo se evaluaron las condiciones ambientales de crecimiento de SE 49214 en las que la región arriba corriente de *stdA* permitiera inferir la transcripción del gen. Las concentraciones de FeCl₃-6H₂O en un intervalo de 250-1000 µM y el uso del medio Waymouth demostraron que el reportero CAT se logró expresar, estos datos sirven como punto de partida para investigar otras condiciones que permitan la expresión del gen *stdA* en *Salmonella* Enteritidis, sin tener que deletar genes de regulación general en la bacteria.

En el presente trabajo, los ensayos de expresión de CAT en los que se compararon los medios M9MM, LB, DMEM y WM, los dos medios que mostraron mejores resultados fueron el LB y WM. Como muestran los resultados de la actividad específica de CAT en LB, siempre los valores de la media estuvieron 200 % por debajo de los resultados obtenidos en el medio WM. Estos valores pueden deberse a la composición de los dos medios, aunque se considera que el medio LB es un medio enriquecido, se ha reportado que su mayor aporte de moléculas para ser metabolizadas por la bacteria son los aminoácidos en forma de péptidos de diferentes longitudes, pocos aminoácidos simples y una cantidad pobre de carbohidratos. (Thomas, 2015) Esto nos indica que la bacteria solo puede realizar

un metabolismo basado en carbohidratos por cierto tiempo, mientras los nutrientes estén disponibles, pero al ya no tener disponible esa fuente de carbono, la bacteria cambia su metabolismo y comienza a usar los péptidos y los aminoácidos como donadores de esqueletos carbonados para la producción de energía. Sezonov, Joseleau-Petit y D'Ari, 2007 demostraron que en el medio LB, *Escherichia coli* solo tiene disponibles los carbohidratos en el medio hasta que alcanza un valor de absorbancia de 0.300 a una DO_{600nm} o en la etapa temprana de la fase logarítmica; después de eso el microorganismo tiene que variar su metabolismo y basarlo en el uso de aminoácidos lo cual no permite que la bacteria crezca por encima de un valor de absorbancia de 7 a una DO_{600nm}. A diferencia del medio LB, el medio WM posee una cantidad de glucosa de 5 g/L, que permite que la bacteria tenga disponible por más tiempo al carbohidrato en su curva de crecimiento. No existe literatura que reporte la utilización del WM para el crecimiento de SE por lo que este estudio es un primer acercamiento.

Es interesante considerar que tanto el medio LB y el medio WM contienen cantidades de Fe desconocidas. A pesar de que en la fórmula del medio WM no se reporta ningún compuesto férrico, no se descarta la presencia de trazas en el medio de cultivo. Por lo anterior, una de las modificaciones que podrían realizarse a futuro de este trabajo, sería la eliminación del hierro del medio, empleando reactivos quelantes, con lo cual se podría tener una base cero en hierro para poder hacer los crecimientos en gradientes crecientes de Fe como lo reportó Dostal *et al.*, 2014.

En este estudio se trabajó con *Salmonella* Enteritidis 49214, la cual se transformó con el plásmido pJM13, a diferencia de los trabajos de Chessa *et al.*, en los que se utilizó una cepa de *Salmonella* Typhimurium con baja virulencia. La cepa SEpJM13 no posee modificaciones cromosómicas en cuanto a sus reguladores Dam, SeqA y RosE, por el

contrario, estos reguladores negativos de la expresión de Std deben estar presentes y ser funcionales en la bacteria. Aun bajo estas condiciones logramos la activación de la fusión *stdA-cat*, con lo que se puede inferir que la transcripción del gen *stdA* da inicio. Este trabajo abre la puerta a que se realicen ensayos de RT-PCR cuantitativo para monitorear al transcrito mensajero del gen *stdA*, así como ensayos de inmunodetección con los cuales se demuestre la expresión de la proteína StdA.

De acuerdo a las observaciones de Jakomin *et al.*, 2008 la proteína HdfR puede funcionar como regulador positivo de la expresión del operón fimbrial *stdABCDEF*. Este regulador pertenece a la familia de los LTTR's, representados por más de 40 tipos diferentes de proteínas, que tienen unos 20 diferentes compuestos conocidos que pueden funcionar como inductores, como por ejemplo: el cis-cis muconato, el salicilato, el p-toluenosulfonato y el pentaclorofenol o el triclorofenol (Schell, 1993; F.Wendisch, 2007; Maddocks & Oyston, 2008; Fernandez-López *et al.*, 2015). Se propone que para estudios subsecuentes con la cepa SEpJM13 se estudie el efecto de dichos inductores al suplementarlos al medio WM y medir la expresión de CAT.

Se comprobó que la expresión del promotor del operón Std es independiente de la concentración de lisina que se probó en este ensayo, sin embargo se debe de tomar en cuenta que en la fórmula del medio WM ya existe una cantidad considerable de lisina de 1311 μM , que sumada a las concentraciones agregadas de 250-1000 μM ocasiona que el medio tenga una concentración final por arriba de los 2 mM. Por ello no se puede descartar que el exceso de este aminoácido en el medio provocara un efecto de saturación en la bacteria. Por lo anterior, el uso de algún medio de cultivo carente de lisina podría ser un buen candidato para comprobar si la saturación del medio fue la responsable de que no

existieran cambios en la expresión de CAT entre los medios suplementados con lisina y los medios controles sin lisina. Aunque cabe la posibilidad de que la lisina no sea el inductor buscado.

No se encontró en la literatura que fue consultada, un reporte del uso del medio WM para crecimiento bacteriano o en el que se describa su utilización para la activación de la región promotora de *stdA*. Este trabajo es el primero en reportar este tipo de efecto positivo en la transcripción del operón *stdABCDEF*. Por lo anterior se propone un estudio a fondo sobre que componentes del medio, aunado a las condiciones de crecimiento ya descritas y a las concentraciones de hierro empleadas, permitirían diseñar un medio de cultivo específico para la expresión de Std.

También se observó que a la temperatura de 30 °C la expresión del promotor en los medios base LB y WM fue mayor que en las temperaturas de 37 °C y 42 °C. Este fenómeno no fue estudiado a detalle ya que las temperaturas de los hospedadores mamíferos y las aves son de 37 y 42 °C respectivamente, se ha reportado que la capacidad de invasión de ST es dependiente de la temperatura ya que los reguladores de la SPI I disminuyen su actividad a 42 °C por lo que la temperatura de las aves inhibe de forma innata la capacidad de invasividad de la bacteria (Troxell *et al.*, 2015). Aunque no se descarta la posibilidad de realizar estudios a futuro, en los que se utilice como base la temperatura de 30 °C y en gradientes decrecientes, ya que estas temperaturas son más cercanas a las que se enfrenta la bacteria en el medio externo, en donde la adherencia y la formación de biopelículas son importantes para la sobrevivencia ante las condiciones adversas del medio ambiente fuera del hospedero (Groisman & Mouslim, 2006; López-Garrido *et al.*, 2015); con estos antecedentes, estudios posteriores podrán emplear el medio WM, las concentraciones de FeCl₃-6H₂O que se estandarizaron en este trabajo y proceder a evaluar algunos otros

inductores conocidos para determinar si ejercen algún efecto sobre el regulador positivo HdfR.

18. Conclusiones

- I Se realizó el análisis virtual de la región promotora del gen *stdA*, que sirvió como referencia para el diseño de los experimentos y la decisión de usar concentraciones de Fe como inductor de la expresión de la fimbria.
- II Se generó una fusión reportera de *stdA-cat* y se corroboró su secuencia en el plásmido pJM13.
- III Se demostró que el uso del medio Waymouth activa la expresión de CAT en la cepa SEpJM13, por lo que se puede inferir la transcripción del gen *stdA* a nivel cromosómico.
- IV Se demostró que la expresión de CAT en WM a temperatura de 30 °C y a 42 °C es mayor que en LB.
- V Se demostró que el uso de FeCl₃-6H₂O en medio WM a concentraciones de 250 μM y hasta 1000 μM aumenta la expresión de la fusión reportera por parte de la cepa SEpJM13 (sin existir diferencias claras en este rango de concentraciones) comparadas con el medio WM control.
- VI Se probaron diferentes concentraciones de lisina tanto en LB como en WM, pero la expresión del reportero CAT no muestra una diferencia con los medios controles.

19. Prospectiva

- I Corroborar la expresión de *stdA* en la cepa SEpJM13 utilizando las técnicas de qPCR, inmunodetección de la proteína o purificación de la fimbria.
- II Utilizar los inductores reportados en la literatura para los LTTR's y probar su efecto sobre la expresión del gen *stdA*.
- III Determinar experimentalmente el sitio de inicio de la transcripción de *stdA* bajo las condiciones empleadas y definir si corresponden a los identificados en el programa Bprom.
- IV Buscar otros reguladores implicados en la expresión de la fimbria Std.
- V Determinar la capacidad de adherencia de la cepa SEpJM13 en células LMH-1.
- VI Analizar el transcriptoma de la cepa SEpJM13 en las condiciones descritas en este trabajo para tener un mejor entendimiento de los cambios globales que ocurren en la bacteria.
- VII Demostrar si solo la sobreexpresión de la fimbria Std disminuye la invasividad de SE 49214, mediante la recombinación de un promotor inducible en el cromosoma de la bacteria.

20. Referencias bibliográficas

- [CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2014. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States , 2014 : Annual Report.
- [EFSA] European Food Safety Authority. 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses , zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014 European Food Safety Authority European Centre for Disease Prevention and Control. 13. DOI: 10.2903/j.efsa.2015.4329.
- [ERS] Economic Research Service [USDA]U.S. Department of Agriculture. 2013. Cost of foodborne illness estimates for Salmonella (nontyphoidal).
- [LEDS] The Laboratory-based Enteric Disease Surveillance. 2016. National Enteric Disease Surveillance : Salmonella Annual Report , 2013.
- [SINAVE) Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiologica. 2016. Boletín Epidemiológico. 32:64.
- [WHO] World Health Organization. 2015. Who estimates of the global burden of foodborne diseases.
- Allen-Vercoe E., Woodward MJ. 1999. The role of flagella, but not fimbriae, in the adherence of Salmonella enterica serotype Enteritidis to chick gut explant. *Journal of Medical Microbiology* 48:771–780. DOI: 10.1099/00222615-48-8-771.
- Álvarez-Ordóñez A., Begley M., Prieto M., Messens W., López M., Bernardo A., Hill C. 2011. Salmonella spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract. *Microbiology* 157:3268–3281. DOI: 10.1099/mic.0.050351-0.

- Balbontín R., Rowley G., Pucciarelli MG., López-Garrido J., Wormstone Y., Lucchini S., García-Del Portillo F., Hinton JCD., Casadesús J. 2006. DNA adenine methylation regulates virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Journal of Bacteriology* 188:8160–8168. DOI: 10.1128/JB.00847-06.
- Barrow PA. 2000a. The paratyphoid salmonellae. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 19:351–375. DOI: 10.1590/S1516-635X2009000100010.
- Barrow PA. 2000b. The paratyphoid salmonellae Description of the disease in poultry. 19:351–375.
- Barrow GI., Feltham RKA. 2003. *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*. New York: Cambridge University Press.
- Bäumler AJ., Tsolis RM., Heffron F. 1996a. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infection and Immunity* 64:1862–1865.
- Bäumler AJ., Tsolis RM., Heffron F. 1996b. The lpf fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:279–83. DOI: 10.1073/pnas.93.1.279.
- Blackall PJ., Soriano-Vargas E. 2013. *Diseases of*. Ames, Iowa. DOI: 10.1016/B978-1-4557-0297-8.00402-X.
- De Buck J., Van Immerseel F., Haesebrouck F., Ducatelle R. 2004. Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by *Salmonella*. *Journal of Applied*

Microbiology 97:233–245. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02294.x.

Chessa D., Winter MG., Jakomin M., Bäumlér AJ. 2009. Salmonella enterica serotype Typhimurium Std fimbriae bind terminal alpha(1,2)fucose residues in the cecal mucosa. *Molecular Microbiology* 71:864–875. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06566.x.

Chessa D., Winter MG., Nuccio SP., Tükel Ç., Bäumlér AJ. 2008. RosE represses Std fimbrial expression in Salmonella enterica serotype Typhimurium. *Molecular Microbiology* 68:573–587. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06185.x.

Chousalkar K., Gole VC. 2016. Salmonellosis acquired from poultry. *Current Opinion in Infectious Diseases* 29:1. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000296.

Clayton DJ., Bowen AJ., Hulme SD., Buckley AM., Deacon VL., Thomson NR., Barrow P a., Morgan E., Jones M a., Watson M., Stevens MP. 2008a. Analysis of the role of 13 major fimbrial subunits in colonisation of the chicken intestines by Salmonella enterica serovar Enteritidis reveals a role for a novel locus. DOI: 10.1186/1471-2180-8-228.

Clayton DJ., Bowen AJ., Hulme SD., Buckley AM., Deacon VL., Thomson NR., Barrow P a., Morgan E., Jones M a., Watson M., Stevens MP. 2008b. Analysis of the role of 13 major fimbrial subunits in colonisation of the chicken intestines by Salmonella enterica serovar Enteritidis reveals a role for a novel locus. *BMC Microbiology* 8:228. DOI: 10.1186/1471-2180-8-228.

Cogco G., Vázquez M., Pérez A., Andrade G., Gutiérrez-cogco L., Montiel-vázquez E.

2000. Serotipos de Salmonella identificados en los servicios de salud de México.
- Crawford RW., Reeve KE., Gunn JS. 2010. Flagellated but not hyperfimbriated Salmonella enterica serovar typhimurium attaches to and forms biofilms on cholesterol-coated surfaces. *Journal of Bacteriology* 192:2981–2990. DOI: 10.1128/JB.01620-09.
- Deiwick J., Salcedo SP., Boucrot E., Gilliland SM., Henry T., Petermann N., Waterman SR., Gorvel JP., Holden DW., Méresse S. 2006. The translocated Salmonella effector proteins SseF and SseG interact and are required to establish an intracellular replication niche. *Infection and Immunity* 74:6965–6972. DOI: 10.1128/IAI.00648-06.
- Dostal A., Gagnon M., Chassard C., Zimmermann MB., O’Mahony L., Lacroix C. 2014. Salmonella adhesion, invasion and cellular immune responses are differentially affected by iron concentrations in a combined in vitro gut fermentation-cell model. *PLoS ONE* 9. DOI: 10.1371/journal.pone.0093549.
- Edwards RA., Schifferli DM., Maloy SR. 2000. A role for Salmonella fimbriae in intraperitoneal infections. *Pnas* 97:1258–1262. DOI: 10.1073/pnas.97.3.1258.
- EFSA. 2014. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014 European Food Safety Authority European Centre for Disease Prevention and Control. *EFSA Journal* 13:4329. DOI: 10.2903/j.efsa.2015.4329.
- F.Wendisch V. 2007. *Amino Acid Biosynthesis – Pathways, Regulation and Metabolic Engineering*. DOI: 10.1007/978-3-540-48596-4.
- Fernandez-López R., Ruiz R., de la Cruz F., Moncalián G. 2015. Transcription factor-based

biosensors enlightened by the analyte. *Frontiers in Microbiology* 6:1–21. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00648.

Gantois I., Ducatelle R., Pasmans F., Haesebrouck F., Gast R., Humphrey TJ., Van Immerseel F. 2009. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis: Review article. *FEMS Microbiology Reviews* 33:718–738. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2008.00161.x.

Garrity GM. 2005. *BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology*. East Lansing, MI: Springer.

GenomeNet. Available at <http://www.genome.jp/>

Grimont PAD., Weill F-X. 2007. ANTIGENIC FORMULAE OF THE SALMONELLA SEROVARS. *WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella*:166.

Groisman E a., Mouslim C. 2006. Sensing by bacterial regulatory systems in host and non-host environments. *Nature reviews. Microbiology* 4:705–9. DOI: 10.1038/nrmicro1478.

Guard J., Gast RK., Guraya R. 2010. Colonization of avian reproductive-tract tissues by variant subpopulations of *Salmonella* enteritidis. *Avian diseases* 54:857–61. DOI: 10.1637/9069-091109-Reg.1.

Hall HK., Foster JW. 1996. The role of Fur in the acid tolerance response of *Salmonella* typhimurium is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. *Journal of Bacteriology* 178:5683–5691.

- Hantke K. 2001. Iron and metal regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 4:172–177. DOI: 10.1016/S1369-5274(00)00184-3.
- Haraga A., Ohlson MB., Miller SI. 2008. Salmonellae interplay with host cells. *Nature Reviews Microbiology* 6:53–66. DOI: 10.1038/nrmicro1788.
- Havelaar AH., Kirk MD., Torgerson PR., Gibb HJ., Hald T., Lake RJ., Praet N., Bellinger DC., Silva NR De. 2015. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. :1–23. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001923.
- Jakomin M., Chessa D., Bäumler AJ., Casadesús J. 2008. Regulation of the Salmonella enterica std fimbrial operon by DNA adenine methylation, SeqA, and HdfR. *Journal of Bacteriology* 190:7406–7413. DOI: 10.1128/JB.01136-08.
- LaRock DL., Chaudhary A., Miller SI. 2015. Salmonellae interactions with host processes. *Nature Reviews Microbiology* 13:191–205. DOI: 10.1038/nrmicro3420.
- Leon M., Michell A., Chaussabel D. 2013. Incidence , clinical presentation , and antimicrobial resistance trends in Salmonella and Shigella infections from children in Yucatan , Mexico. 4:1–10. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00288.
- Linke D., Goldman A. 2011. *Bacterial Adhesion*. Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer. DOI: 10.1007/978-94-007-0940-9.
- López-Garrido J., Casadesús J. 2012. Crosstalk between virulence loci: Regulation of Salmonella enterica pathogenicity island 1 (SPI-1) by products of the std fimbrial operon. *PLoS ONE* 7:17–19. DOI: 10.1371/journal.pone.0030499.

- López-Garrido J., Puerta-Fernández E., Cota I., Casadesús J. 2015. Virulence gene regulation by L-arabinose in *Salmonella enterica*. *Genetics* 200:807–819. DOI: 10.1534/genetics.115.178103.
- Maddocks SE., Oyston PCF. 2008. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* 154:3609–3623. DOI: 10.1099/mic.0.2008/022772-0.
- Martínez LC., Banda MM., Fernández-Mora M., Santana FJ., Bustamante VH. 2014. HilD induces expression of *Salmonella* pathogenicity Island 2 genes by displacing the global negative regulator H-NS from *ssrAB*. *Journal of Bacteriology* 196:3746–3755. DOI: 10.1128/JB.01799-14.
- Martínez LC., Yakhnin H., Camacho MI., Georgellis D., Babitzke P., Puente JL., Bustamante VH. 2012. Integration of a complex regulatory cascade involving the SirA/ BarA and Csr global regulatory systems that controls expression of the *Salmonella* SPI-1 and SPI-2 virulence regulons through HilD. *Molecular Microbiology* 80:1637–1656. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07674.x.Integration.
- Moest TP., Méresse S. 2013. *Salmonella* T3SSs: Successful mission of the secret(ion) agents. *Current Opinion in Microbiology* 16:38–44. DOI: 10.1016/j.mib.2012.11.006.
- NCBI.PrimerBlast. Available at https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome
- Norris TL., Kingsley R a., Bümler a J. 1998. Expression and transcriptional control of the *Salmonella typhimurium* *Ipf* fimbrial operon by phase variation. *Molecular*

microbiology 29:311–320. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.00934.x.

Nuccio S-P., Bäumler AJ. 2007. Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71:551–575. DOI: 10.1128/MMBR.00014-07.

Perez-Lopez A., Behnsen J., Nuccio S-P., Raffatellu M. 2016. Mucosal immunity to pathogenic intestinal bacteria. *Nature Reviews Immunology* 16:135–148. DOI: 10.1038/nri.2015.17.

Petrone BL., Stringer AM., Wade JT. 2014. Identification of HilD-regulated genes in salmonella enterica serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology* 196:1094–1101. DOI: 10.1128/JB.01449-13.

Pitcher DG., Saunders NA., Owen RJ. 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology* 8:151–156. DOI: 10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x.

Puente JL., Bieber D., Ramer SW., Murray W., Schoolnik GK. 1996. The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: Transcriptional regulation by environmental signals. *Molecular Microbiology* 20:87–100. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1996.tb02491.x.

Rahn K., De Grandis SA., Clarke RC., McEwen SA., Galán JE., Ginocchio C., Curtiss III R., Gyles CL. 2006. Amplification of *invA* gene of *Salmonella* by polymerase chain reaction (PCR) as a specific method for detection of *Salmonellae*. *Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran* 61:195–199. DOI:

10.1016/0890-8508(92)90002-F.

Sambrook J., Russel W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Volume 1*. Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Schell MA. 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators.

Annual review of microbiology 47:597–626. DOI:

10.1146/annurev.mi.47.100193.003121.

Sezonov G., Joseleau-Petit D., D’Ari R. 2007. Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology* 189:8746–8749. DOI: 10.1128/JB.01368-07.

Shippy DC., Eakley NM., Mikheil DM., Fadl AA. 2013. Role of StdA in adhesion of Salmonella enterica serovar Enteritidis phage type 8 to host intestinal epithelial cells.

Gut pathogens 5:43. DOI: 10.1186/1757-4749-5-43.

Softberry. 2011. Bprom. Available at <http://www.softberry.com>

Solovyev V., Salamov A. 2010. Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. In: Li RW ed. *Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies*. Agricultural Research Service, USA,.

Soto GE., Hultgren SJ. 1999. Bacterial Adhesins : Common Themes and Variations in Architecture and Assembly MINIREVIEW Bacterial Adhesins : Common Themes and Variations in Architecture and Assembly. 181:1059–1071.

Swayne DE. 2013. *Diseases of Poultry 13th EDITION*. Ames. Iowa: 13th Edition Diseases of Poultry Editor-in-Chief David E. Swayne Laboratory Director Southeast Poultry

Research Laboratory Agricultural Research Service U.S. Department of Agriculture
Athens, Georgia United States Associate Editors John R. Glisson Profess.

Teixidó L., Carrasco B., Alonso JC., Barbé J., Campoy S. 2011. Fur activates the expression of salmonella enterica pathogenicity island 1 by directly interacting with the hilD operator in Vivo and in Vitro. *PLoS ONE* 6. DOI: 10.1371/journal.pone.0019711.

Thomas E. 2015. Microbial growth and physiology: A call for better craftsmanship. *Frontiers in Microbiology* 6:1–12. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00287.

Tindall BJ., Grimont PAD., Garrity GM., Euze JP. 2005. Taxonomic Note Nomenclature and taxonomy of the genus Salmonella. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:521–524. DOI: 10.1099/ij.s.0.63580-0.

Tiss A., Barre O., Michaud-Soret I., Forest E. 2005. Characterization of the DNA-binding site in the ferric uptake regulator protein from Escherichia coli by UV crosslinking and mass spectrometry. *FEBS Letters* 579:5454–5460. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.08.067.

Troxell B., Petri N., Daron C., Pereira R., Mendoza M., Hassan HM., Koci MD. 2015. Poultry body temperature contributes to invasion control through reduced expression of Salmonella pathogenicity island 1 genes in Salmonella enterica serovars typhimurium and enteritidis. *Applied and Environmental Microbiology* 81:8192–8201. DOI: 10.1128/AEM.02622-15.

Velden AWM Van Der., Bäumlér AJ., Renée M., Heffron F. 1998. Multiple Fimbrial

Adhesins Are Required for Full Virulence of *Salmonella typhimurium* in Mice
Multiple Fimbrial Adhesins Are Required for Full Virulence of *Salmonella typhimurium* in Mice. *Infection and Immunity* 66:2803–2808.

Wallis TS., Barrow PA. 2005. *Salmonella* Epidemiology and Pathogenesis in Food-Producing Animals. *EcoSal Plus* 1967:1–31. DOI: 10.1128/ecosalplus.8.6.2.1.

Weening EH., Barker JD., Laarakker MC., Humphries AD., Tsois RM., Andreas J., Tsois M., Ba AJ. 2005. The *Salmonella enterica* Serotype Fimbrial Operons Are Required for Intestinal Persistence in Mice sth Fimbrial Operons Are Required for Intestinal Persistence in Mice. *Infection and Immunity* 73:3358–3366. DOI: 10.1128/IAI.73.6.3358.

Wiedemann A., Virlogeux-Payant I., Chaussé AM., Schikora A., Velge P. 2015. Interactions of *Salmonella* with animals and plants. *Frontiers in Microbiology* 6:1–18. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00791.

Zaidi MB., Calva JJ., Estrada-garcia MT., Leon V., Vazquez G., Figueroa G., Lopez E., Contreras J., Abbott J., Zhao S., Mcdermott P., Tollefson L. 2008. Integrated Food Chain Surveillance System for *Salmonella* spp . 14:429–435.

Zaidi MB., Campos FD., Estrada-García T., Gutierrez F., León M., Chim R., Calva JJ. 2012. Burden and transmission of zoonotic foodborne disease in a rural community in Mexico. *Clinical Infectious Diseases* 55:51–60. DOI: 10.1093/cid/cis300.

Zaidi MB., Macías CL., Calva E. 2006. Estudios Mexicanos sobre *Salmonella*: Epidemiología, vacunas y biología molecular. *Revista Latinoamericana de*

Microbiologia 48:121–125. DOI: 10.1038/sj.icb.7100007.

Zaidi MB., McDermott PF., Fedorka-Cray P., Leon V., Canche C., Hubert SK., Abbott J., León M., Zhao S., Headrick M., Tollefson L. 2006. Nontyphoidal Salmonella from human clinical cases, asymptomatic children, and raw retail meats in Yucatan, Mexico. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 42:21–28. DOI: 10.1086/498508.

21. Anexo de medios de cultivo

- **Medio mínimo M9 (M9MM)**

Solución concentrada de sales M9	
Fosfato de sodio monobásico Na ₂ HPO ₄ -H ₂ O J.T. Baker [®]	10.167 g
Fosfato de potasio dibásico KH ₂ PO ₄ J.T. Baker [®]	4.5 g
Cloruro de sodio NaCl J.T. Baker [®]	.75 g
Cloruro de amonio NH ₄ Cl J.T. Baker [®]	1.5 g

Disolver todos los componentes en agua bidestilada y aforar a 300 ml. Esterilizar en autoclave por 15', 15 lb y 120 °C. Guardar en refrigeración hasta su uso.

Medio mínimo M 9	
Agua bidestilada	158.78 ml
Solución concentrada de sales M9	40 ml
Dextrosa 0.4 % BD Bioxon [®]	0.8 ml
Sulfato de magnesio 2 mM Merck [®]	0.4 ml
Cloruro de calcio 0.1mM Merck [®]	0.02 ml

Mezclar los componentes en un frasco estéril, mientras se mantiene un ambiente aséptico.

Guardar en refrigeración hasta su uso

- **Caldo Luria-Bertani (LB)**

Caldo Luria-Bertani	
Cloruro de Sodio NaCl J.T. Baker [®]	10 g
Caseína pancreática digerida MCD-LAB [®]	10 g

Extracto de levadura BD Difco®	5 g
Agua bidestilada	975 ml

Disolver todos los componentes y ajustar el pH a 7.4 con hidróxido de sodio. Esterilizar por autoclave durante por 15', 15 lb y 120 °C. Mantener en refrigeración hasta su uso.

- **Agar LB**

Agar Luria-Bertani

Cloruro de Sodio NaCl J.T. Baker®	10 g
Caseína pancreática digerida MCD-LAB®	10 g
Extracto de levadura BD Difco®	5 g
Agar bacteriológico MCD-LAB®	10 g
Agua bidestilada	965 ml

Disolver todos los componentes y ajustar el pH a 7.4 con hidróxido de sodio. Esterilizar por autoclave durante por 15', 15 lb y 120 °C. Mantener en refrigeración hasta su uso.

- **Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) – alto en glucosa Gibco®**

Disolver un sobre del polvo que se proporciona en agua MQ y ajustar el pH a 7.4 con bicarbonato de sodio. Esterilizar por filtración en membrana de 0.22 µm. Mantener en refrigeración hasta su uso.

- **Medio Waymouth MB752/1 (WM) Sigma-Aldrich®**

Disolver el polvo que se proporciona en el frasco en agua MQ y ajustar el pH a 7.4 con bicarbonato de sodio. Esterilizar por filtración en membrana de 0.22 µm. Mantener en

refrigeración hasta su uso.

- **Medio SOB**

Medio SOB	
Cloruro de Sodio J.T. Baker [®]	20 g
Caseína pancreática digerida MCD-LAB [®]	5 g
Extracto de levadura BD Difco [®]	0.5 g
Agua bidestilada	975 ml

Al disolver los componentes adicionar 10 ml de cloruro de potasio (KCl para una concentración final de 25mM) y aforar a 1 L. Esterilizar por 15', 15' lb a 120 °C. Antes de utilizarse agregar 5 ml cloruro de magnesio (MgCl₂ a una concentración de 2 M).

- **Medio SOC**

A un 1 L de medio SOB se le añaden 20 ml dextrosa (1 M) quedando a una concentración final de 20 mM. 1 ml del medio SOC se distribuye en viales de 1.5 ml y se refrigeran hasta su uso.

22. Anexo de soluciones

- **Solución TAE 50 X**

TAE 50 X	
Tris Base Sigma-Aldrich [®]	242 g
Ácido Etilen Diamino Tetraacético-EDTA pH 8 0.5 M Bio Basic Canda Inc. [®]	200 ml
Ácido acético glacial Reproquifin [®]	57.1 ml

Mezclar el Tris base con 500 ml de agua destilada y añadir el EDTA. Ya que todo el tris este disuelto añadir el ácido acético glacial y mezclar muy bien. Aforar a 1 L.

- **Agarosa al 1 % para electroforesis**

Disolver 1 g de agarosa ultra pura Invitrogen[®] calentar en microondas hasta disolver por completo.

- **Soluciones para lisis alcalina**

- **Solución I**

Solución I	
Dextrosa BD Bioxon [®]	50 mM
Tris-HCl pH 8	25 mM
EDTA .5 M pH 8 (Bio Basic Canda Inc. [®])	10 mM

- **Solución II**

Solución II	
NaOH 10 N J.T. Baker [®]	0.2 N
SDS 10 % IBI [®]	1 %

Preparar al momento de utilizarse.

- **Solución III**

Solución III	
Acetato de Potasio 5M J.T. Baker [®]	60 ml
Ácido acético glacial Reproquifin [®]	11.5 ml
Agua bidestilada	28.5 ml

- **Soluciones para extracción de ADN**

- **Solución de lisis**

Solución de lisis	
Tiocianato de Guanidina Sigma-Aldrich®	5 M
Ácido Etilen Diamino Tetraacético-EDTA 0.5 M pH 8 Bio Basic Canda Inc.®	0.1 M
N-Lauril sarcocinato de sodio Sigma-Aldrich®	0.16 %

- **Acetato de Amonio**

Acetato de amonio 7.4 M J.T. Baker®