



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.**



**Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.**

**Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias.**

**Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI.**

---

**Papel de la proteasa Lon en la expresión transcripcional del sistema toxina-antitoxina SehAB de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**Santa Lourdes Jazmin Mejia Ventura.**

**Director: Dr. Miguel Ángel De la Cruz Villegas.**

**Asesor interno: M. en C. Rosalva Rangel Corona.**

**Ciudad de México, febrero 2018.**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que la alumna **MEJIA VENTURA SANTA LOURDES JAZMIN**, con número de cuenta **309262930**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **20 de febrero de 2018** a las **09:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

**PRESIDENTE** Dra. LUCILA ÁLVAREZ BARRERA

*Lucila Álvarez Barrera*

**VOCAL** Dr. MIGUEL ÁNGEL DE LA CRUZ VILLEGAS\*

*Miguel Ángel de la Cruz Villegas*

**SECRETARIO** M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA

*Rosalva Rangel Corona*

**SUPLENTE** Dr. RODRIGO ANIBAL MATEOS NAVA

*Rodrigo Anibal Mateos Nava*

**SUPLENTE** M. en C. REYNALDA ROLDÁN PEREZ

*Reynalda Roldán Pérez*

El título de la tesis que presenta es: **Papel de la proteasa Lon en la expresión transcripcional del sistema toxina-antitoxina SehAB de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium.**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Ciudad de México, a 16 de enero de 2018

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
DIRECTOR



RECIBI  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
JEFE DE CARRERA

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios por permitirme la vida, la salud y las circunstancias para cumplir una más de mis metas.*

*A mi madre Dolores Ventura Rosas por su amor y apoyo incondicional durante toda mi vida porque siempre alentó mis sueños y aspiraciones sin ninguna objeción, por confiar en mi capacidad, aunque yo misma dudara en algunos momentos, porque nunca dejó que me rindiera y me enseñó que si algo sale mal se puede volver a empezar. Gracias por ser una excelente amiga, compañera y consejera, madre eres una inspiración para mí.*

*A mis abuelos Agripina Acosta, Juan Mejía y María Isabel Rosas por todo su apoyo, amor y sobre todo porque son un ejemplo de constancia, esfuerzo y disciplina.*

*A mis hermanos Juan, Ángel y Gabriel por su cariño y amor. Me han demostrado que cada día se puede mejorar, gracias por todos esos momentos graciosos, felices y otros no tanto yo sé que suelo ser una persona difícil de tratar.*

*A mi padre Juan Antonio Mejía Acosta porque me enseñó el valor de la perseverancia a pesar de las circunstancias y por alentar mi coraje de una forma u otra para alcanzar mis objetivos.*

*A mis tíos: Arnulfo, Juanita, Martín, Virginia y a mis primos sobre todo a Sarahí y Tania porque con el tiempo se han convertido en una parte importante de mi vida.*

*A mis queridas amigas Dalía Gutiérrez y Karen Flores por su linda amistad que llenó mi vida de divertidas anécdotas y aunque nos hayamos distanciado ya que nuestros sueños nos llevaron por distintos rumbos nuestra amistad sigue presente, también son un ejemplo de perseverancia y dedicación.*

*A mi querido "abuelito" Brian Santiago por su cariño, confianza y por estar en momentos difíciles escuchándome con paciencia. La circunstancia nos ha separado, pero siempre tendrás un lugar especial en mi corazón.*

*A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas desde mi ingreso a la ENP 7 fomentaron en mí el sentimiento de pertenencia.*

*A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por brindarme un lugar en sus instalaciones para adquirir conocimientos y desarrollarme para convertirme en una profesional.*

*A mis compañeros del L4 en la UMIEZ en FES Zaragoza: Anne, Isaac, Carmen, Ángel, José Carlos, Leticia, Ana, Gaby, por esas tardes de uno, las bromas, las pelis y el ambiente de confianza y amistad en especial al "α lobo": Marco, Itzel y Sergio Téllez por toda su confianza y esos momentos graciosos sobre todo a Sergio Téllez por su confianza, su cariño y su apoyo en muchos sentidos.*

*A mi director de tesis el Dr. Miguel Ángel De la Cruz Villegas por darme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto y abrirme las puertas de su laboratorio, por su apoyo, su confianza, su asesoría, su paciencia y su tiempo brindado.*

*Al Dr. Miguel Ángel Ares Jiménez por su apoyo, su asesoría y sus consejos dados durante la realización de este trabajo.*

*A Jorge Soria y Carlos Manzano por sus consejos y su asesoría durante el trabajo experimental.*

*A mi asesora la M. en C. Rosalva Rangel Corona por brindarme su apoyo y mi primera oportunidad de estar en un laboratorio de investigación.*

*A los miembros del jurado: el Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava, la M. en C. Reynalda Roldán Pérez y la Dra. Lucila Álvarez Barrera por su tiempo y sus sugerencias para la elaboración de este escrito.*

*Al M. en C. Edgar Torres por sus consejos y su asesoría durante mi estancia en el L4 de la UMIEZ en FES Zaragoza.*

*Al Dr. Arturo Valle y al Dr. Rodrigo Aníbal Mateos por todo su apoyo y su asesoría durante la realización de mi servicio social.*

*A Don José Chavarría por su excelente trabajo y sus consejos durante mi estancia en el L4 de la UMIEZ en FES Zaragoza.*

## **LUGAR DE TRABAJO**

**Este trabajo se realizó en el laboratorio de Microbiología Molecular de la Unidad de investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (UIMEIP) de la Unidad de Medicina de Alta Especialidad (UMAE) del Hospital de Pediatría “Silvestre Frenk Freud” del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Este proyecto de investigación fue financiado por el Fondo de Investigación en Salud (FIS) del IMSS (FIS/IMSS/PROT/G15/1398) y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el proyecto 256263 de Ciencia Básica (CB-2015-01).**

## ÍNDICE

1	RESUMEN .....	1
2	INTRODUCCIÓN .....	2
2.1	Enterobacterias .....	2
2.2	El género <i>Salmonella</i> .....	5
2.3	Identificación de <i>Salmonella</i> .....	6
2.4	Patología y manifestaciones clínicas .....	7
2.4.1	Gastroenteritis .....	8
2.4.2	Septicemia .....	8
2.4.3	Fiebre entérica .....	8
2.4.4	Colonización asintomática.....	8
2.5	Patogénesis de <i>Salmonella</i> .....	9
2.6	Tratamiento, medidas preventivas y profilaxis.....	12
2.7	Factores de virulencia de <i>S. Typhimurium</i> .....	12
2.7.1	Plásmido de virulencia .....	12
2.7.2	Islas de patogenicidad .....	13
2.7.3	SPI-1 .....	14
2.7.4	SPI-2.....	14
2.7.5	Regulación genética de SPI-1 y SPI-2 .....	15
2.7.6	Sistemas de secreción tipo III (SST3) .....	16
2.7.7	Sistemas toxina- antitoxina.....	19
2.7.8	Clasificación de los sistemas TA .....	20
2.8	Sistemas toxina-antitoxina tipo II y virulencia.....	22
2.9	El sistema TA SehAB es requerido para la virulencia de <i>S. Typhimurium</i> .....	23
2.10	La proteasa Lon.....	24
3	JUSTIFICACIÓN.....	27
4	HIPÓTESIS .....	28
5	OBJETIVOS .....	28
5.1	Objetivo general .....	28
5.2	Objetivos específicos .....	28

<b>6</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
6.1	Material biológico .....	29
6.2	Cultivo y condiciones de crecimiento .....	29
6.2.1	Inducción de SPI-1 .....	29
6.2.2	Inducción de SPI-2 .....	29
6.3	Extracción y cuantificación de ARN .....	30
6.3.1	Rompimiento celular .....	30
6.3.2	Precipitación del ARN .....	31
6.3.3	Purificación del ARN .....	31
6.4	Síntesis de ADNc .....	31
6.5	Amplificación de los genes mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real .....	32
6.6	Determinación de la expresión genética relativa .....	33
6.7	Análisis estadístico de los resultados .....	33
<b>7</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
7.1	Extracción de ARN total de <i>S. Typhimurium</i> crecida en diferentes condiciones	34
7.2	Efecto de las condiciones de crecimiento sobre la expresión del operón bicistrónico <i>sehAB</i> de <i>S. Typhimurium</i> .....	35
7.3	Efecto de la proteasa Lon sobre la expresión de los genes <i>sehAB</i> de <i>S. Typhimurium</i> .....	37
<b>8</b>	<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
8.1	La expresión del operón bicistrónico <i>sehAB</i> muestra una expresión diferencial dependiente de las condiciones de cultivo .....	38
8.2	La proteasa Lon controla positivamente la expresión del operón <i>sehAB</i> .....	39
<b>9</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>42</b>
<b>10</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>43</b>
<b>11</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>44</b>

## FIGURAS

Figura 1. Modelo tridimensional de la cubierta o envoltura celular de una bacteria gram negativa.....	3
Figura 2. Morfología bacteriana de la familia <i>Enterobacteriaceae</i> .....	4
Figura 3. Modelo de invasión del epitelio intestinal por <i>S. Typhimurium</i> . ....	11
Figura 4. Organización genética de SPI-1 y SPI-2. ....	15
Figura 5. Representación esquemática del sistema de secreción tipo III (SST3) codificado por SPI-1 y SPI-2.....	18
Figura 6. Estructura de los distintos tipos de sistemas TA clasificados en función de la naturaleza y modo de acción de antitoxina.....	21
Figura 7. Representación esquemática de la organización genética del sistema <i>sehAB</i> . ....	23
Figura 8. Diversidad de sustratos y funciones biológicas de la proteasa Lon.....	25
Figura 9. Electroforesis mostrando el ARN total de las cepas silvestre y mutante $\Delta lon$ de <i>S. Typhimurium</i> en las diferentes condiciones de cultivo.....	35
Figura 10. Niveles de expresión relativa de los genes <i>sehA</i> y <i>sehB</i> en la cepa silvestre de <i>S. Typhimurium</i> crecida en medio LB en fase logarítmica, medio LB en fase estacionaria y medio mínimo .....	36
Figura 11. Niveles de expresión relativa de los genes <i>sehA</i> y <i>sehB</i> en las cepas silvestre y mutante $\Delta lon$ de <i>S. Typhimurium</i> crecidas en medio mínimo .....	37

## CUADROS

Cuadro 1. Enfermedades y síntomas causados por salmonelosis. ....	7
Cuadro 2. Concentración y pureza de ARN.....	34

## 1 RESUMEN

Las bacterias del género *Salmonella* infectan una variedad de hospederos, desde aves hasta mamíferos y son importantes patógenos para el ser humano. Los principales factores de virulencia de *Salmonella* se encuentran localizados en las islas de patogenicidad (SPIs), donde las más estudiadas son las islas de patogenicidad 1 y 2. Además de ambas islas de patogenicidad, los sistemas toxina-antitoxina (TA) han sido descritos como factores de virulencia importantes en bacterias patogénicas. Las toxinas de estos sistemas tienen diversas actividades, desde RNasas hasta inhibidores de ADN girasa, siendo su efecto en la célula principalmente bacteriostático. Debido a la efectividad limitada de los medicamentos actuales y al aumento de la tolerancia y la resistencia a múltiples fármacos, existe una necesidad creciente de nuevos agentes antimicrobianos, la investigación de los sistemas TA puede proporcionar estrategias antimicrobianas alternativas. *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium (*S. Typhimurium*), es el serotipo de *Salmonella* más estudiado y se utiliza como modelo de estudio de regulación genética y de infección usando el ratón como modelo animal. Uno de estos, el sistema SehAB, fue requerido para la virulencia de *S. Typhimurium*, específicamente en la replicación de esta bacteria en ganglios linfáticos mesentéricos. A nivel de expresión genética, se sabe que la antitoxina SehB, reprime su expresión a nivel transcripcional uniéndose a su propio promotor.

Lon es una proteasa dependiente de ATP la cual está involucrada en la degradación de proteínas naturalmente inestables involucradas en una gran variedad de procesos biológicos, también desempeña un papel importante en el control de calidad de las proteínas, se ha descrito a Lon como una proteasa de estrés debido a que puede ser inducida en respuesta a condiciones desfavorables. Interesantemente, se ha descrito que la proteasa Lon degrada específicamente a las antitoxinas, sin embargo, no se ha descrito si esta proteasa está involucrada en la regulación de la expresión del sistema SehAB.

Este trabajo se enfocó en el papel de la proteasa Lon en la expresión transcripcional del sistema *sehAB* que codifica para el sistema toxina-antitoxina tipo II SehAB en *S. Typhimurium*.

Las bacterias silvestre y mutante  $\Delta lon$  se crecieron en medio LB en fase logarítmica y estacionaria, las cuales son condiciones de inducción de SPI-1 y SPI-2, respectivamente. Además, se utilizó el medio mínimo que mimetiza las condiciones intracelulares, el cual favorece la expresión de los genes de SPI-2 y reprime los genes de SPI-1. Nuestros resultados mostraron que la ausencia de la proteasa Lon disminuyó la expresión del operón *sehAB* en las condiciones de crecimiento evaluadas, indicando que Lon juega un papel importante en la expresión del sistema *sehAB* en condiciones de estrés.

## 2 INTRODUCCIÓN

### 2.1 Enterobacterias

Las enterobacterias son microorganismos ubicuos y que se encuentran en el suelo, el agua, la vegetación y formando parte de la flora intestinal normal de casi todos los animales incluido el ser humano. Compuesta por bacterias anaerobias facultativas (Winfield y Groisman, 2003), Gram negativas de 1.0 a 60  $\mu\text{m}$ , algunas poseen movilidad por flagelos peritricos muchas de ellas forman cápsula, la mayoría produce fimbrias y pilis, ninguna fábrica esporas, fermentadoras de glucosa de donde obtienen ácido pirúvico como producto final y muchas de ellas también producen gas. Todas son oxidasas negativas, varias de ellas reducen los nitratos a nitritos y son catalasa positiva (Romero, 2007; Puerta y Mateos, 2010).

Su estructura celular se caracteriza por una estructura multilaminar Figura1.

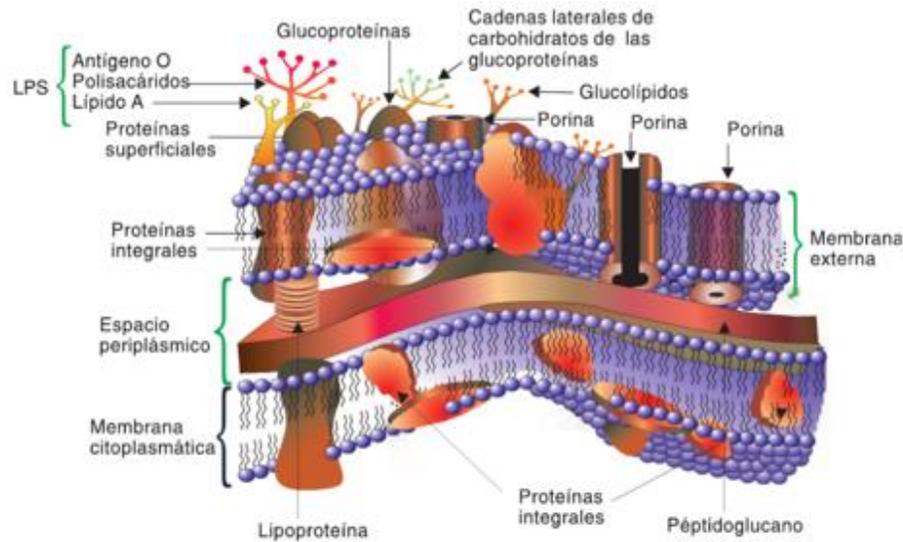


Figura 1. Modelo tridimensional de la cubierta o envoltura celular de una bacteria gram negativa. Tomado de Montoya, 2008.

La membrana interna (o citoplasmática) consiste en una doble capa de fosfolípidos que regula el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas. La capa siguiente consiste en un péptidoglucano delgado junto con un espacio periplásmico que contiene una elevada concentración de proteínas. La membrana externa compleja consiste en otra doble capa de fosfolípidos que incluyen lipopolisacárido (LPS) (en la parte más externa, son un importante factor de virulencia de estas bacterias), lipoproteínas (que están fijadas al péptidoglucano) proteínas multiméricas (que facilitan el paso de diversas sustancias incluidos los antibióticos) y proteínas de la membrana externa. Entre estas proteínas hay algunos organelos complejos que irradian hacia el exterior: los flagelos, estructuras que se utilizan para la locomoción y que provienen de una estructura basal localizada en la membrana interna; las fimbrias que son apéndices pilosos más cortos, rectos y delgados, oscilan entre 2 a 4 nm de diámetro, están compuestos de una proteína llamada pilina y tienen una importante función como adhesina; y los pilis sexuales, estructuras presentes en las bacterias que contienen plásmidos conjugativos y que las bacterias utilizan para mediar la transferencia conjugativa de ADN del plásmido.

En la figura 2, se puede observar la estructura general de las enterobacterias en la cual podemos ubicar: el flagelo, la pared celular, la membrana citoplasmática, los pilis, así como otros componentes fundamentales de la familia *Enterobacteriaceae* (Tortora *et al.*, 2007; Puerta y Mateos, 2010).

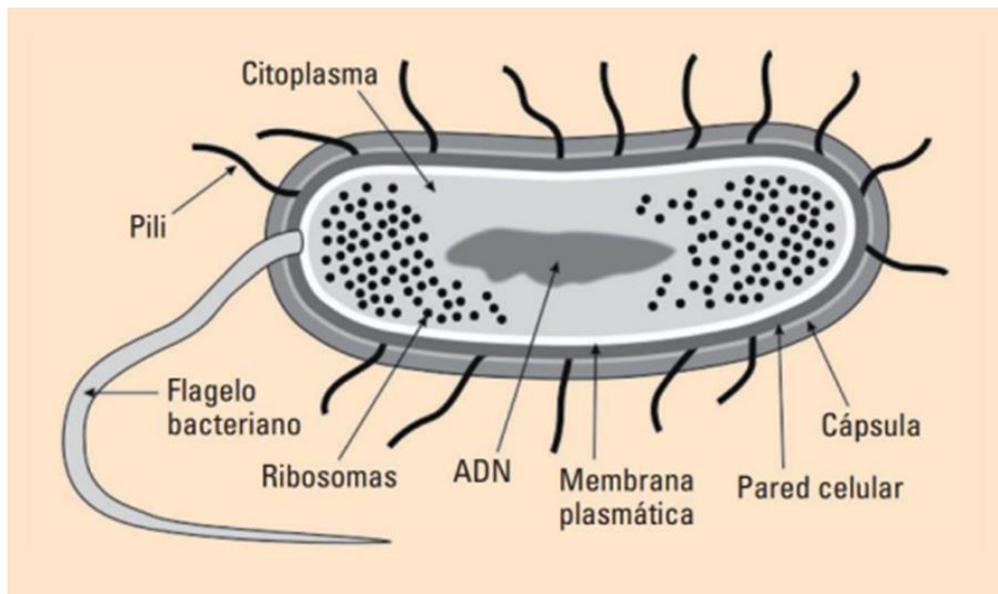


Figura 2. Morfología bacteriana de la familia *Enterobacteriaceae*. Tomado de Puerta y Mateos, 2010.

Desde el primer aislamiento de *Salmonella* comunicado en 1884 por Gafky (*Bacterium Typhosum*) y en 1886 por Salmon y Smith (*Salmonella choleraesuis*) el desarrollo de la nomenclatura del género *Salmonella* ha sido muy complejo. Las *Salmonellas* son las enterobacterias más complejas, con más de 2500 serotipos descritos en el esquema actual de Kauffmann- White. Antes del 1º de julio de 1983, se utilizaban 3 especies de *Salmonella* para identificar a este género bacteriano: *S. choleraesuis*, *S. typhi* y *S. enteritidis*, donde la mayoría de los serotipos identificados pertenecían a esta última especie (Koneman, 2008).

En la actualidad todas las especies y subgrupos de *Salmonella* y *Arizona* se consideran de la misma especie, pero pueden separarse en siete taxones que representan seis subgrupos. La única excepción es *S. bongori*, antes conocido como subgénero V, el cual por la hibridación de ADN-ADN es una especie distinta. Por lo tanto, existen dos especies y seis subespecies de *S. enterica* en el sistema actual utilizado por los CDC (Koneman, 2008).

## 2.2 El género *Salmonella*

El género *Salmonella* contiene dos especies: *enterica* y *bongori*. *S. enterica* se divide a su vez en seis subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (V) (Tindall *et al.*, 2005; Grimont y Weill, 2007). La especie *S. enterica* engloba más de 2,500 serotipos clasificados en base a sus antígenos y flagelo (Grimont y Weill, 2007). La subespecie I de *S. enterica* contiene más de 1,500 serotipos. La otra especie del género *Salmonella*, *S. bongori*, se considera el representante no patógeno del género (Fookes *et al.*, 2011). La serotipificación de *Salmonella*, se basa en tres antígenos principales: somáticos (O), flagelares (H) y la cápsula Vi (Vi), donde los antígenos son sustancias de naturaleza química compleja, que una vez en el organismo estimulan una respuesta del sistema inmunológico (Freifelder, 1981). Los antígenos somáticos (O) son lipopolisacaridos componentes de la membrana celular externa y se han identificado aproximadamente 60 antígenos diferentes. Los antígenos flagelares (H) son proteínas localizados en el flagelo móvil. El antígeno de la cápsula (Vi) es un polisacárido termolábil localizado en la capsula, se encuentra en el serotipo Typhi y en algunas cepas del serotipo Paratyphi. La nomenclatura actual de los serotipos de *Salmonella* establece que se escriba el género (en cursiva) seguido del serotipo, por ejemplo, *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium deberá escribirse *Salmonella* Typhimurium o *S. Typhimurium* (Romero, 2007).

### 2.3 Identificación de *Salmonella*

*Salmonella* fue nombrada en honor al microbiólogo estadounidense, D.E. Salmon. Desde el punto de vista bioquímico, en general son a la vez lactosa y sacarosa negativas, fermentan glucosa con producción de ácido y gas (excepto *S. Typhi*).

También fermentan L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, L-ramnosa, D-sorbitol, trehalosa, D-xilosa y D-dulcitol. Las bacterias del género *Salmonella* son oxidasas negativas, catalasas positivo, indol y Voges-Proskauer (VP) negativo, rojo de metilo y citrato de Simmons positivo, urea negativa y producen sulfuro de hidrógeno (Terragno *et al.*, 2003).

Dentro del complejo mundo de las enterobacterias, la prueba de H<sub>2</sub>S es un indicador clave para poder identificar al género *Salmonella*.

El principio se basa en determinar si se ha liberado enzimáticamente ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) gaseoso a partir de los aminoácidos azufrados para producir una reacción coloreada visible, negra, en presencia de un sistema indicador H<sub>2</sub>S (Maccfaddin, 2003).

La proteólisis de las proteínas produce aminoácidos individuales, ciertas bacterias heterotróficas pueden liberar enzimáticamente el azufre de los dos aminoácidos azufrados (-SH), produciendo H<sub>2</sub>S gaseoso. Peptona, cisteína, metionina y tiosulfato son fuentes de azufre, pero diferentes especies usan distintos compuestos o aminoácidos azufrados para producir H<sub>2</sub>S. Las enzimas responsables de esta actividad son la cisteína desulfhidrasa, antes denominada cisteinasa y la tiosulfato reductasa (Maccfaddin, 2003).

Por consiguiente, el H<sub>2</sub>S gaseoso puede ser producido por la reducción de una fuente de azufre inorgánica como el tiosulfato (-S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) o por la reducción del azufre orgánico proporcionado por el grupo funcional R<sub>1</sub>-SH del aminoácido cisteína que está presente en la peptona (Maccfaddin, 2003).

## 2.4 Patología y manifestaciones clínicas

El género *Salmonella* son organismos que permanecen viables bajo diferentes condiciones ambientales. Sobreviven a la refrigeración, algunas veces a la congelación en ovoproductos no pasteurizados (Pascual, 2015) y permanecen viables por varias horas en las manos contaminadas de humanos. Pueden resistir al calentamiento y permanecer viables cuando los alimentos contaminados son cocinados menos de 12 min a temperaturas menores a 56.5 °C (Romero y Herrera, 2002).

Las bacterias del género *Salmonella* están bien adaptadas para proliferar tanto en seres humanos como en animales. Todas las infecciones por *Salmonella* comienzan con la ingesta de la bacteria en agua o alimentos contaminados. La dosis infectante varía de  $10^3$  a  $10^6$  unidades formadoras de colonias (UFC) (Castañeda *et al.*, 2013). Los serotipos *S. Typhi* y *S. Paratyphi* proliferan de manera exclusiva en los humanos.

El resto de los serotipos denominados *Salmonella* no tifoidea o NTS, colonizan el aparato digestivo de varias especies de mamíferos, reptiles, aves e insectos (Longo y Fauci, 2013) y están compuestos por patógenos que causan enfermedad en animales endotermos, entre los cuales se incluye el ser humano (Grimont y Weill, 2007; Bäumlér *et al.*, 2011). El cuadro 1 muestra los serotipos asociados a salmonelosis tifoidea y no tifoidea:

Cuadro 1. Enfermedades y síntomas causados por salmonelosis

Serotipos de <i>S. enterica</i> .	Hospedero	Enfermedades y síntomas.
<b>Tifoideo</b>		
<b>Typhi y Paratyphi</b>	Restringido a humanos	Fiebre entérica, dolor abdominal, diarrea transitoria, salpullido maculopapular color salmón en el torso.
<b>No tifoideo</b>		
<b>Typhimurium Enteriditis</b>	Amplio rango.	Gastroenteritis: dolor abdominal, vómito y diarrea inflamatoria.

Existen cuatro diferentes formas de infección por *Salmonella*: gastroenteritis, septicemia, fiebre entérica y colonización asintomática.

#### **2.4.1 Gastroenteritis**

Los síntomas suelen aparecer entre las 6 y las 48 h siguientes de la ingestión de agua o alimentos contaminados con una sintomatología de náuseas, vómito y diarrea no sanguinolenta son también frecuentes la fiebre y los espasmos abdominales (Murray *et al.*, 2013).

#### **2.4.2 Septicemia**

Todas las especies de *Salmonella* pueden dar origen a bacteriemia, aunque las infecciones por *S. Typhi* y *S. Paratyphi* son las que con mayor frecuencia la producen. El riesgo es más alto en pacientes pediátricos, geriátricos e inmunodeprimidos (Murray *et al.*, 2013). La bacteriemia de baja densidad evoluciona a menudo de manera asintomática en cambio la bacteriemia de alta densidad se presenta con signos de infección sistémica y genera náuseas, dolor abdominal, escalofríos, vómito y diarrea (Archundia, 2014).

#### **2.4.3 Fiebre entérica**

*S. Typhi* produce una enfermedad febril conocida como fiebre tifoidea. Una forma leve de esta enfermedad, la fiebre paratifoidea, se produce por *S. Paratyphi*. Los pacientes presentan fiebre que va aumentando progresivamente con síntomas inespecíficos como cefalea, mialgia malestar general y anorexia (Murray *et al.*, 2013).

#### **2.4.4 Colonización asintomática**

Las especies de *Salmonella* responsables de producir la fiebre tifoidea y paratifoidea se mantienen por la colonización del ser humano. La colonización crónica durante más de un año después de una enfermedad sintomática se produce en el 1.5% de los pacientes y la vesícula biliar es el reservorio de ellos (Murray *et al.*, 2013).

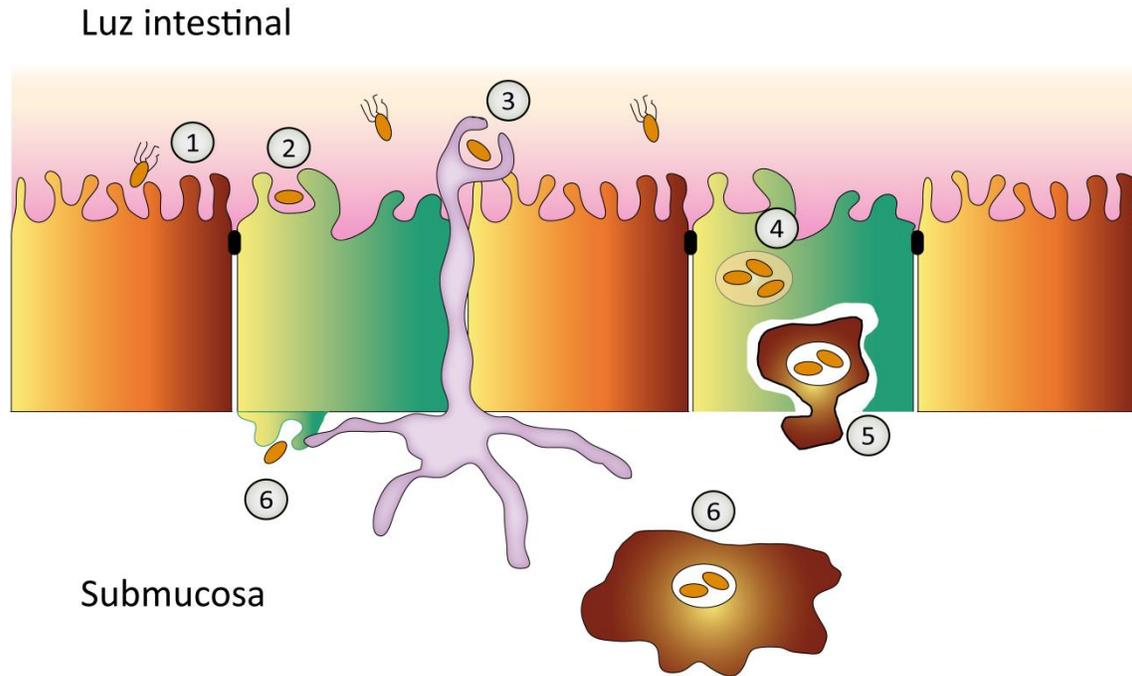
En pacientes inmunocompetentes, los serotipos causantes de NTS dan lugar a diarrea (generalmente limitante y no invasiva) acompañada de dolor abdominal, náuseas y vómitos, que rara vez suponen un grave riesgo para la salud, por lo que no se suele prescribir el tratamiento con antibióticos (Coburn *et al.*, 2007). Únicamente en un porcentaje inferior al cinco por ciento de los pacientes, la infección por NTS traspasa el tracto digestivo y da lugar a bacteriemia. Un fenómeno añadido es la colonización asintomática del individuo una vez superada la enfermedad, hecho que facilita la dispersión del patógeno (Crawford *et al.*, 2010).

## 2.5 Patogénesis de *Salmonella*

El tiempo de incubación de *Salmonella* transcurre entre 6-72 h dependiendo de la susceptibilidad del hospedador y el número de bacterias ingeridas. En su camino hacia el intestino *S. Typhimurium* se enfrenta al pH ácido del estómago activando respuestas que aseguran el mantenimiento de un pH fisiológico en su interior (Foster y Hall, 1991). En el intestino delgado, *S. Typhimurium* atraviesa la mucosa que separa el lumen del epitelio intestinal y contacta con los enterocitos (Figura 3). Aunque *S. Typhimurium* infecta activamente enterocitos, la penetración de la barrera intestinal se produce principalmente por las células M, células epiteliales con microvellosidades muy pequeñas (Romero y Herrera, 2002), localizadas en las placas de Peyer (Jones *et al.*, 1994). En su interacción con esta célula diana, *S. Typhimurium* inyecta, a través de sistemas de secreción tipo III (Galán y Collmer, 1999), diversos efectores que dan lugar a la reestructuración del citoesqueleto celular, y al incremento de la movilidad de la membrana citoplasmática (McGhie *et al.*, 2009). Este proceso provoca la internalización de la bacteria en una vacuola especializada denominada “*Salmonella* containing vacuole” o SCV (García-del Portillo y Finlay, 1994). En el interior de las células M o enterocitos, la bacteria englobada en la SCV se desplaza hasta la membrana basolateral.

Una vez finalizado este fenómeno de transcitosis, *S. Typhimurium* es fagocitada por células del sistema inmune como macrófagos o células dendríticas. *S. Typhimurium* podría utilizar los macrófagos a manera de vehículo para su propagación a través de la sangre hasta órganos diana como el bazo y el hígado, en los que prolifera activamente (Vázquez-Torres *et al.*, 2000).

Tras la invasión de la célula eucariota, la SCV se integra en la ruta fagocítica destinada a la fusión con lisosomas contenedores de enzimas capaces de eliminar a la bacteria. *S. Typhimurium* interrumpe parcialmente esta fusión mediante la translocación de diversas proteínas efectoras en el hospedador (García-del Portillo y Finlay, 1995; Steele-Mortimer, 2008; Figueira y Holden, 2012). Desde la SCV, *S. Typhimurium* induce la formación de una red de filamentos de actina, que engloban y ayudan al mantenimiento estructural de esta vacuola (Meresse *et al.*, 2001). La SCV migra posteriormente a una localización perinuclear en estrecho contacto con el aparato de Golgi, para regular el tráfico vesicular y asegurarse el aporte de nutrientes y membranas que necesita (Salcedo y Holden, 2003). En células epiteliales, *S. Typhimurium* induce además la formación de largos filamentos denominados SIFs (del inglés Salmonella-Induced Filaments) que parten desde la SCV y se extienden a lo largo de la célula (García-del Portillo *et al.*, 1993a). La función de estas complejas estructuras, ricas en glicoproteínas de membrana lisosomales, podría estar relacionada también con la captación de nutrientes (García-del Portillo *et al.*, 1993b).



Leyenda

- |  |            |  |                   |  |                   |
|--|------------|--|-------------------|--|-------------------|
|  | Enterocito |  | Célula fagocítica |  | Célula dendrítica |
|  | Célula M   |  | SCV               |  | S. Typhimurium    |
|  |            |  | Unión estrecha    |  |                   |

Figura 3. Modelo de invasión del epitelio intestinal por *S. Typhimurium*. 1. La bacteria se adhiere al epitelio intestinal empleando moléculas de superficie como las adhesinas. 2. Tras la inyección de factores de virulencia por sistemas de secreción tipo III, *S. Typhimurium* altera la dinámica del citoesqueleto de la célula eucariota (especialmente el de actina), para promover la internalización de la bacteria. 3. En una ruta alternativa, la bacteria puede ser captada directamente en el lumen por las células dendríticas residentes en la submucosa. 4. Tras su internalización *S. Typhimurium* se localiza en una vacuola (SCV). 5. La SCV se desplaza hacia la membrana basolateral, donde puede liberar las bacterias que contiene hacia la submucosa. 6. Finalmente, las bacterias liberadas a la submucosa son captadas por células fagocíticas. Modificado de Sansonetti, 2002.

## 2.6 Tratamiento, medidas preventivas y profilaxis

Los antibióticos utilizados para el tratamiento de la fiebre tifoidea han sido: cloranfenicol, ampicilina, cotrimoxazol, quinolonas y cefalosporinas de tercera generación, aunque se han descrito cepas resistentes al cloranfenicol, la ampicilina y el cotrimoxazol (Jurado *et al.*, 2010).

Las precauciones para evitar la salmonelosis están basadas en medidas sociosanitarias, con buen control de las aguas residuales, sistemas de abastecimiento de aguas y manipulación de alimentos. Extremar la higiene personal teniendo especial cuidado con el lavado de manos. En caso de viaje a las zonas endémicas o en situaciones de catástrofes se recomienda la inmunización, ya que se dispone de dos tipos de vacunas que aseguran una protección eficaz durante dos años. La vacuna parenteral está elaborada con antígeno Vi. La vacuna oral con una mutante atenuada, no estando por tanto indicada en casos de inmunodeficiencia, por ejemplo, personas infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), o mujeres embarazadas (Jurado *et al.*, 2010).

## 2.7 Factores de virulencia de *S. Typhimurium*

*S. Typhimurium* utiliza distintos mecanismos para invadir las células diana, captar nutrientes y suprimir la respuesta inmune. Los principales factores de virulencia de *S. Typhimurium* están codificados en islas de patogenicidad (*Salmonella*-Pathogenicity Islands o SPIs), y en el plásmido de virulencia pSLT (Fábrega y Villa, 2013). Otros factores de virulencia de *S. Typhimurium* están codificados en otras regiones del cromosoma, estando relacionados con la quimiotaxis, la adhesión a la célula diana y la formación de estructuras como las fimbrias y flagelos (Fábrega y Villa, 2013).

### 2.7.1 Plásmido de virulencia

Determinados serotipos de la subespecie de *S. enterica*, poseen plásmidos de 50-90 Kb (dependiendo del serotipo) que codifican factores de virulencia. Aunque varían en tamaño,

todos ellos poseen una región común bien conservada de 8 Kb en la que se encuentra el operón *spvRABCD* (Rotger y Casadesús, 1999).

*spvR* codifica un regulador de la transcripción, mientras que *spvB* y *spvC* codifican las dos únicas proteínas efectoras descritas en este plásmido. SpvB interviene en la reorganización del citoesqueleto de actina que promueve la formación de los SIFs y la estabilización de la SCV (Lesnick *et al.*, 2001). SpvC atenúa el proceso inflamatorio gracias a la inhibición de rutas celulares que disparan la producción de citocinas proinflamatorias (Mazurkiewicz *et al.*, 2008; Haneda *et al.*, 2012).

Estos plásmidos específicos de cada serotipo contienen además los genes *pef*, que codifican para proteínas implicadas en la formación de fimbrias. Estas estructuras son importantes para la adhesión de la bacteria a las células eucariotas (Bäumler *et al.*, 1996) y la formación de biopelículas (Ledebouer *et al.*, 2006), las cuales son comunidades bacterianas importantes en la colonización y persistencia tanto en superficies abióticas como bióticas (González-Escobedo y Gunn, 2013). Además de estos plásmidos de virulencia, se han identificado plásmidos que contienen genes, los cuales codifican para resistencia a antibióticos (Herrero *et al.*, 2008; Harmer *et al.*, 2014).

### **2.7.2 Islas de patogenicidad**

La mayoría de los genes que se requieren para la virulencia de *Salmonella* están codificados en regiones particulares del genoma, estas son conocidas como islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPIs). SPI-1 y SPI-2 han sido las mejores caracterizadas y las más estudiadas, además de que son las únicas que codifican cada una para un sistema de secreción tipo III (SST3) (Marcus *et al.*, 2000). SPI-1 es necesaria para la invasión eficiente del epitelio intestinal y SPI-2 es esencial para la replicación y supervivencia de *Salmonella* en macrófagos, así como la progresión de una infección sistémica (Hansen- Wester y Hensel, 2001).

### 2.7.3 SPI-1

SPI-1 se ubica a 63 centisomas del cromosoma, tiene un tamaño de 40 kb (Mills *et al.*, 1995). Como se observa en la figura 4, SPI-1 contiene 31 genes que pueden ser divididos en categorías que incluyen: genes que codifican para el SST3, denominados *inv-spa*, genes que codifican para proteínas involucradas en la translocación de las moléculas efectoras dentro del citoplasma de la célula del hospedero y genes que codifican para las proteínas efectoras y sus chaperonas (Galán y Curtiss, 1989), asimismo, se localiza en todos los miembros de género *Salmonella*, probablemente fue adquirida en la evolución temprana de *S. enterica* por transferencia de genes, de manera horizontal, lo que se propone al determinar su % de G-C que es del 42-47% mientras que el del cromosoma de *Salmonella* es del 52-54%; además el tamaño, ordenamiento y orientación de los genes *inv/spa* en SPI-1 es similar a los genes de invasión del plásmido de virulencia de *Shigella* (Groisman y Ochman, 1997).

### 2.7.4 SPI-2

Esta isla se localiza en el centisoma 31 del cromosoma, contiene 44 genes y su tamaño es de alrededor de 40 Kb, una porción de 25 kb que codifica para SST3 se encuentra solo en *Salmonella enterica* y su contenido de G+C es de 43% (Figura 4). Se han descrito cuatro tipos de genes, agrupados en cuatro operones: el operón *ssa* (genes que codifican al aparato de SST3), el operón *ssr* (que codifica para proteínas reguladoras), el operón *ssc* (que codifica para proteínas cheperonas y el operón *ttr*, el cual codifica para la tetraionato reductasa (Hensel *et al.*, 1999).

Los genes de SPI-1 se expresan *in vivo* en el momento que *Salmonella* se encuentra en el lumen intestinal del hospedero y se reprime en el tiempo que la bacteria se localiza dentro de los macrófagos (Haraga *et al.*, 2008; Fábrega y Villa, 2013), e *in vitro* sí se crece en medio rico en nutrientes Luria-Bertani (LB) (Hansen- Wester y Hensel, 2001).

En contraste, la expresión *in vivo* de los genes de SPI-2 se lleva a cabo en caso de que *Salmonella* se encuentre en el lumen intestinal y cuando está dentro de las células hospederas, como en los macrófagos (Hansen-Wester y Hensel, 2001). En condiciones de laboratorio, la expresión de los genes de SPI-2 se induce en medio mínimo con bajas concentraciones de calcio, magnesio y potasio.

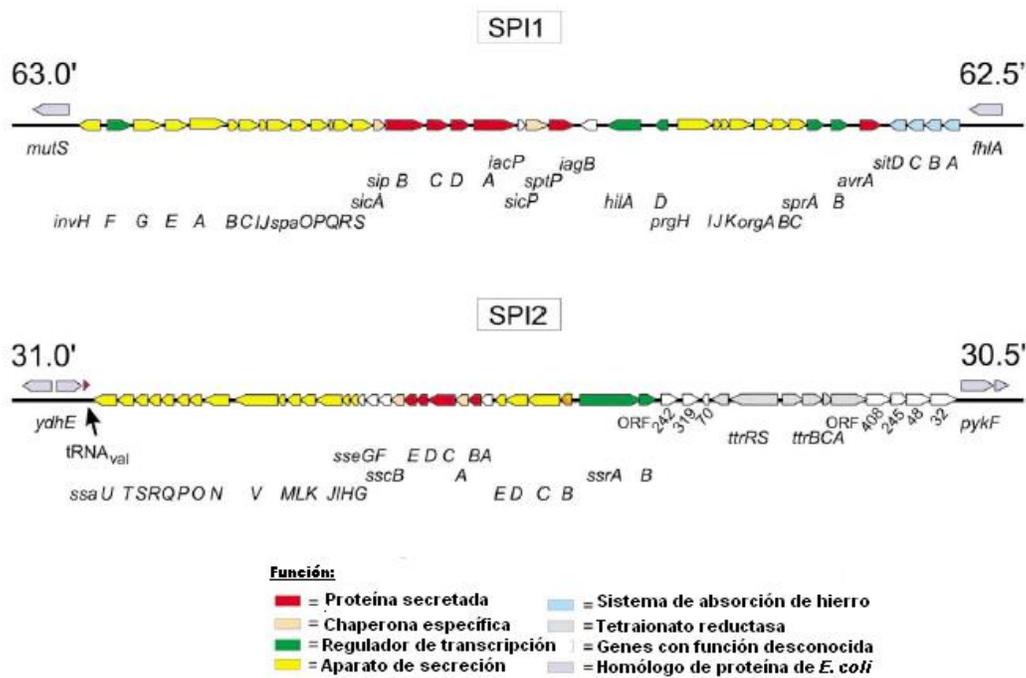


Figura 4. Organización genética de SPI-1 y SPI-2. Las distintas funciones de los genes de SPI-1 y SPI-2 están representadas por diferentes colores. Tomado de Hansen-Wester y Hensel, 2001.

**2.7.5 Regulación genética de SPI-1 y SPI-2**

*Salmonella* ha adquirido diversos mecanismos complejos capaces de controlar la expresión de sus genes de virulencia en el tiempo y lugar apropiado esto requiere la integración de mecanismos de regulación que controlen la expresión de los genes en respuesta a estímulos ambientales.

SPI-1 codifica para los reguladores transcripcionales HilA, HilC, HilD e InvF (Ellermeier y Slauch, 2007). La expresión de los genes que participan en SPI-1 se induce en cascada cuando HilD induce la expresión de HilA que pertenece a la familia OmpR/ToxR.

Entonces HilA activa directamente la expresión de algunos genes de SPI-1, como los operones que conforman el aparato de secreción del SST3 *pgr/org* e *inv/spa* y el que codifica para InvF, un regulador también miembro de la familia AraC, encargado de la activación del resto de los genes SPI-1, como son los operones que codifican a las proteínas efectoras *sic/sip* y del translocon (SipBCD) (Ellermeier y Slauch, 2007).

SPI-2 codifica para un sistema de dos componentes SsrA/B, donde SsrA es la proteína cinasa sensora de la membrana y SsrB es el regulador de la respuesta (Ochman *et al.*, 1996). SsrB induce directamente la expresión de todos los genes encontrados en SPI-2 (Fass y Groisman, 2009). En condiciones de laboratorio, la expresión de los genes de SPI-2 se induce en medio mínimo con bajas concentraciones de calcio, que involucra a los reguladores OmpR, PhoP y SlyA. Además del medio mínimo, la expresión de SPI-2 se observa en medio LB en fase de crecimiento estacionaria por un mecanismo dependiente de HilD (Hansen-Wester y Hensel, 2001).

Gran número de proteínas reguladoras, específicas de *Salmonella* han sido implicadas en la expresión de los genes SPI-1 y SPI-2, los cuales principalmente controlan la expresión de *hilA* (SPI-1) y *ssrAB* (SPI-2) (Fass y Groisman, 2009).

### **2.7.6 Sistemas de secreción tipo III (SST3)**

SPI-1 y SPI-2 contienen un gran número de genes que codifican sistemas de secreción de tipo III (SST3) para las proteínas de virulencia. Los SST3 son máquinas moleculares complejas encontradas en gran número de patógenos Gram-negativos de seres humanos, animales y plantas.

Los SST3 son estructuras en forma de aguja con una composición de aproximadamente 20 proteínas de virulencia, o proteínas efectoras que son translocadas desde la bacteria hasta el citoplasma de la célula huésped (Hansen-Wester y Hensel, 2001).

Una vez dentro de la célula eucariótica, las proteínas efectoras liberadas por la bacteria producen rearrreglos en el citoesqueleto de las células epiteliales del hospedero, lo cual permite a la bacteria introducirse en ellas.

Los SST3 codificados por SPI-1 y SPI-2 son estructuralmente similares, pero difieren en la condición de expresión y función de las proteínas efectoras (Figura 5).

Otro grupo de proteínas constituyen el translocon, el cual se piensa está relacionado con la translocación de proteínas efectoras mediante la formación de un poro de translocación (Kimbrough y Miller, 2002). Las proteínas efectoras tienen señales específicas blanco localizadas en su extremo amino terminal que las orienta hacia el SST3 (Miao y Miller, 2000). Además de esta señal para la secreción, varios efectores tienen un sitio de unión para chaperonas específicas, cuya función se cree es estabilizar y dirigir a su sustrato hacia el aparato de translocación.

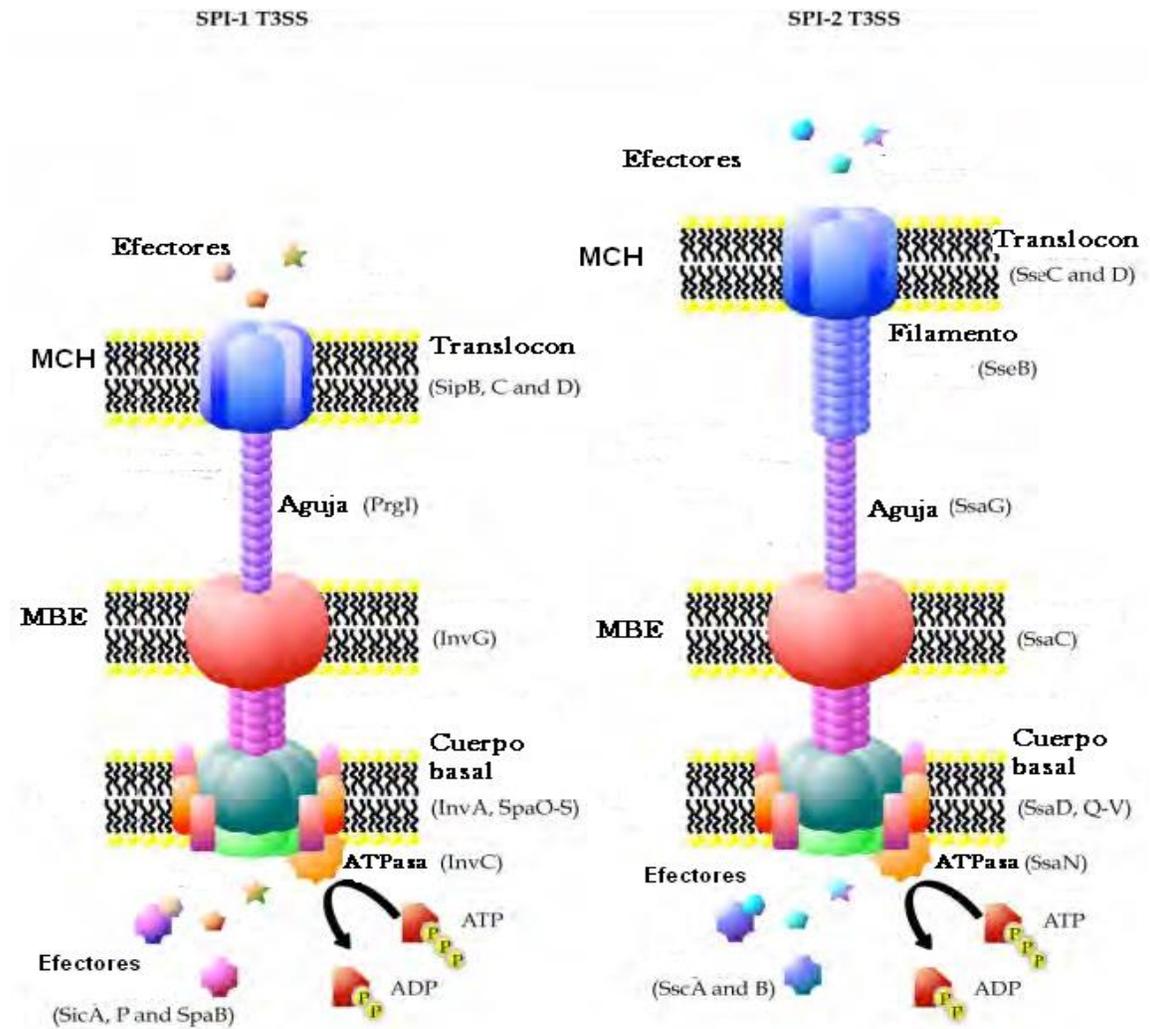


Figura 5. Representación esquemática del sistema de secreción tipo III (SST3) codificado por SPI-1 y SPI-2. El SST3 tanto de SPI-1 como de SPI-2 consiste en anillos que proporcionan un camino continuo a través de la membrana interna (MBI) y la membrana externa (MBE) de la bacteria hasta la membrana de la célula huésped (MCH). Tomado de Wisner *et al.*, 2012.

### 2.7.7 Sistemas toxina- antitoxina

Casi todas las bacterias poseen genes cuya expresión puede Inhibir el crecimiento celular e incluso dan lugar a la muerte celular cuando se sobreexpresan. Entre ellos, los sistemas de toxina-antitoxina (TA) contribuyen en gran medida a la maquinaria reguladora epigenética que controla la supervivencia bacteriana (Engelberg-Kulka *et al.*, 2006). En general, un sistema TA se define como un operón bicistrónico, que codifica una antitoxina y una toxina, no necesariamente en este orden. Primero fueron reportados a manera de sistemas de adicción que conducían al mantenimiento de plásmidos (Gerdes *et al.*, 1986).

Más tarde, también fueron descubiertos en los genomas cromosómicos, donde suelen desempeñar un papel en la estabilización del cromosoma bacteriano (Wozniak y Waldor, 2009). Básicamente, las toxinas dentro de los sistemas de TA suelen conducir a la inhibición del crecimiento celular interfiriendo con procesos tales como replicación del ADN, traducción, división celular y síntesis de ATP (Wen *et al.*, 2014).

Estos sistemas presentan algunas características comunes:

- i) Los genes de la antitoxina y la toxina se encuentran solapados, al menos parcialmente, o muy próximos el uno del otro (Hayes, 2003; Gerdes *et al.*, 2005).
- ii) La antitoxina es bioquímicamente más inestable que la toxina, por lo que es necesaria una producción constante de la primera para mantener silenciada la segunda. Esta cualidad es la que permite actuar a los sistemas TA como sistemas de estabilidad y/o adicción. Sí la célula que porta el operón (por ejemplo, en un plásmido) lo pierde, la antitoxina es rápidamente degradada (por RNasas o proteasas según el sistema). Por el contrario, la toxina, bioquímicamente más estable, queda libre para atacar su diana celular, provocando un efecto bacteriostático y/o bacteriolítico (dependiendo del sistema y la situación) en la célula.
- iii) La antitoxina actúa comúnmente como autorrepresor del operón. En general, salvo en los sistemas TA tipo I y III, la antitoxina cumple una función de represor “débil” incapaz de impedir completamente la transcripción del operón.

Las antitoxinas de naturaleza proteica poseen generalmente dos dominios claramente diferenciados: un dominio N-terminal de interacción con ADN y una región C-terminal necesaria para la interacción y neutralización de la toxina. En ausencia de toxina, las antitoxinas suelen interaccionar con secuencias nucleotídicas discretas en la región promotora operadora del operón TA, sin embargo, esta unión proteína-ADN es lábil.

iv) Tras actuar sobre sus dianas celulares, las toxinas producen un retraso en el crecimiento o la muerte celular (Engelberg-Kulka *et al.*, 2006). Esta cualidad crea la adicción de estos sistemas en la célula, pues la pérdida del sistema TA resulta en un ataque por la toxina. A pesar de este efecto negativo de la adicción, esta toxicidad puede llegar a ser beneficiosa para la célula ante determinadas situaciones de estrés.

### **2.7.8 Clasificación de los sistemas TA**

Los sistemas TA se clasifican atendiendo a la naturaleza bioquímica y mecanismo de acción de la antitoxina. Así, podemos distinguir sistemas tipo I, II, III, IV y V. En los sistemas TA tipo I y III, la antitoxina es un ARN, mientras que en el resto (II, IV y V) la antitoxina es una proteína (Wen *et al.*, 2014). Las antitoxinas de los sistemas tipo I son ARNs antisentido que hibridan con el ARNm codificante de la toxina (Gerdes *et al.*, 1986; Fozo *et al.*, 2008), bloquean la traducción de este ARNm y forman un ARN de doble cadena que es degradado por RNasa III (Franch *et al.*, 1999). En los sistemas TA tipo III la antitoxina es también un ARN, aunque en este caso, la neutralización se produce por una interacción ribo-proteica con la toxina (ARN-proteína), quedando bloqueado el centro catalítico de la toxina (Fineran *et al.*, 2009).

En el resto de los sistemas (II, IV y V), la antitoxina es una proteína, y al igual que ocurre con los sistemas I y III, estos difieren en el mecanismo de neutralización. En los sistemas TA tipo II la neutralización tiene lugar por una interacción proteína-proteína entre toxina y antitoxina (Yamaguchi e Inouye, 2011). En los tipo IV la antitoxina impide la acción de la toxina mediante un bloqueo del sustrato diana (Masuda *et al.*, 2012). Por último, el sistema tipo V, es el único caso descrito hasta la fecha en el que la antitoxina tiene actividad catalítica; es una RNasa que degrada el ARNm de su toxina e impide así su traducción (Wang *et al.*, 2011).

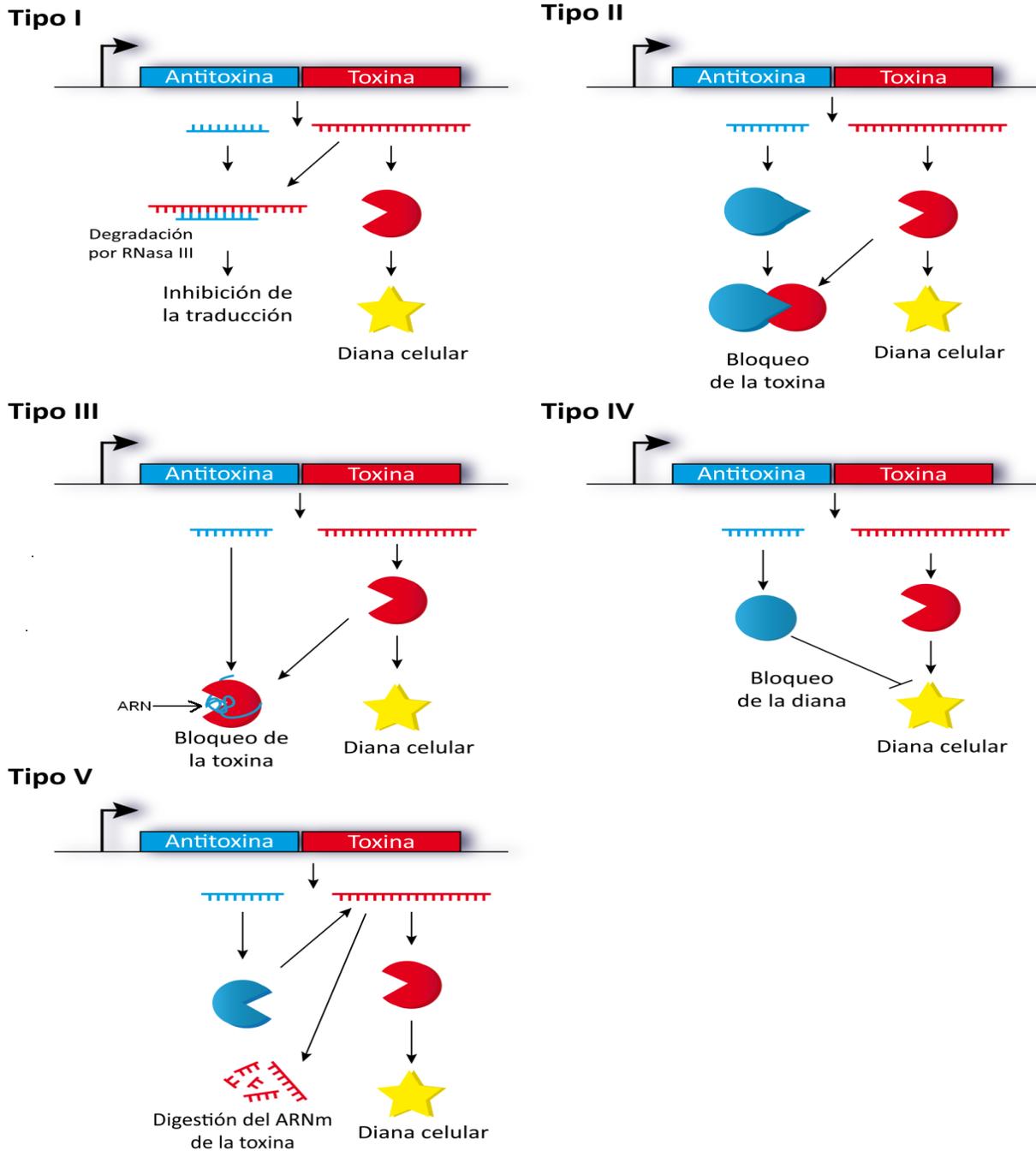


Figura 6. Estructura de los distintos tipos de sistemas TA clasificados en función de la naturaleza y modo de acción de la antitoxina. De arriba abajo se esquematizan los sistemas TA tipo I, II, III, IV y V. En los sistemas TA tipo I y III, las antitoxinas son moléculas de ARN; la diferencia radica en el mecanismo de neutralización de la toxina: en los sistemas TA tipo I la molécula de ARN de la antitoxina hibrida con el ARNm que codifica la toxina, con lo que previene su traducción y promueve la degradación del ARN de doble cadena por RNasa III. En los sistemas TA tipo II, IV y V, la antitoxina es una proteína. Al igual que en el caso de los tipos I y III, la diferencia radica en el mecanismo de neutralización: i) en los sistemas TA tipo II la antitoxina bloquea la toxina por una interacción proteína-proteína; ii) las antitoxinas de los sistemas TA tipo IV bloquean la diana de la toxina, impidiendo que ésta ejerza su efecto tóxico; iii) en los sistemas TA tipo V la antitoxina es una RNasa que degrada el ARNm que codifica la toxina. Tomado de Lobato 2015.

## 2.8 Sistemas toxina-antitoxina tipo II y virulencia

En los sistemas TA tipo II el complejo TA se une a secuencias palindrómicas de la región promotora y reprime su propia expresión. En situaciones de estrés, la antitoxina es degradada más rápidamente que la toxina por proteasas como Lon y ClpP (Christensen-Dalsgaard *et al.*, 2010). Para el caso de las toxinas, se han descrito varios mecanismos de acción que confieren toxicidad a la célula bacteriana inhibiendo su crecimiento. Por ejemplo, la toxina CcdB actúa inhibiendo la ADN girasa, una proteína involucrada en el superenrollamiento del ADN. Otras toxinas como MazF tienen propiedades de ribonucleasas, degradando el ARN mensajero (ARNm). En algunas toxinas esta actividad enzimática es dependiente de la interacción con alguna subunidad ribosomal. Además, existen otras toxinas que actúan como interferasas que bloquean la traducción interactuando con el ARNm y el ribosoma (Gerdes *et al.*, 2005). Los sistemas TA tipo II son ampliamente prevalentes en bacterias y se ha propuesto que sean benéficos en condiciones hostiles favoreciendo la persistencia. Sin embargo, las circunstancias bajo las cuales los sistemas TA tipo II son activados y favorecen la persistencia no están del todo descritas. En el 2005, en una búsqueda de más de 100 genomas procarióticos se encontró que los sistemas TA tipo II fueron abundantes en bacterias de vida libre pero raramente encontrados en bacterias asociadas a hospederos (Pandey y Gerdes, 2005). Ese estudio concluyó que los sistemas TA son elementos de respuesta a estrés que incrementaban la viabilidad de los procariotes de vida libre, pero recientemente un estudio genómico comparativo reveló que la presencia de los sistemas TA estaba significativamente asociada con la patogenicidad de bacterias epidémicas (Georgiades y Raoult, 2011). *Yersinia pestis*, el agente de la peste bubónica humana, codifica al menos para 10 sistemas TA tipo II cromosomales (Goulard *et al.*, 2010). *Mycobacterium tuberculosis* tiene al menos 60 sistemas TA tipo II, mientras que la bacteria saprófita *Mycobacterium smegmatis* tiene solo dos (Pandey y Gerdes, 2005). *Rickettsia* spp. que son bacterias intracelulares estrictas, presentaron hasta 14 sistemas TA y fueron capaces de inducir muerte celular en células endoteliales (Audoly *et al.*, 2011). En *Escherichia coli* uropatógena (UPEC), un sistema TA tipo II promovió la colonización de la vejiga y los riñones de ratón (Norton y Mulvey, 2012).

## 2.9 El sistema TA SehAB es requerido para la virulencia de *S. Typhimurium*

Recientemente describimos el papel del sistema TA tipo II SehAB en la virulencia de *S. Typhimurium* (De la Cruz *et al.*, 2013). SehAB está codificado en el operón bicistrónico *sehAB* (STM4031-STM4030.S), donde *sehA* codifica para la toxina y el gen *sehB* para la antitoxina (Figura 7). La ausencia de la antitoxina SehB ( $\Delta sehB$ ) afectó el crecimiento de *S. Typhimurium* durante el crecimiento en medio LB; interesantemente, la doble mutante  $\Delta sehAB$  tuvo un crecimiento similar a la cepa silvestre, indicando que el efecto visto en la mutante  $\Delta sehB$  era por la expresión de la toxina SehA.

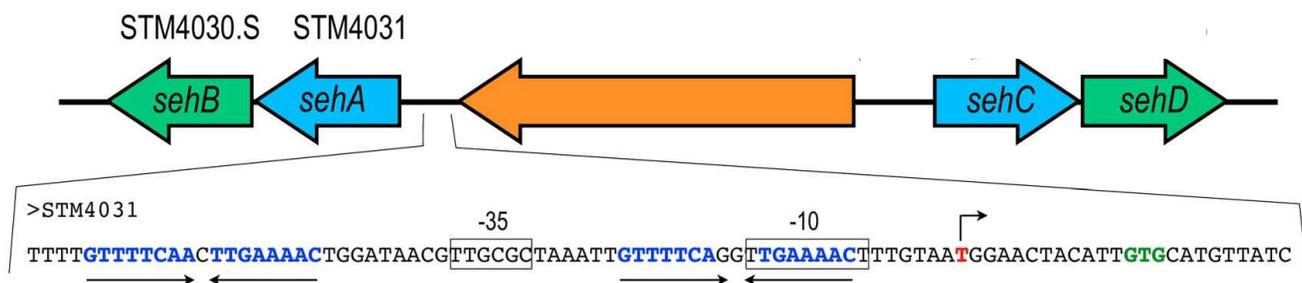


Figura 7. Representación esquemática de la organización genética del sistema *sehAB*. En la figura se muestra la región promotora, también las cajas -10 y -35, inicio de transcripción, así como las secuencias palindrómicas. Tomado de De la Cruz *et al.*, 2013.

Las antitoxinas tipo II además de interactuar con la toxina, son capaces de actuar como represores transcripcionales de su propia expresión. La expresión del sistema *sehAB* fue desreprimida en la mutante antitoxina  $\Delta sehB$  mostrando que SehB autoreprime su propia expresión. La antitoxina SehB se unió específicamente a su propio promotor.

La caracterización en el fenotipo de la virulencia, en modelo ratón, mostró que la mutante antitoxina  $\Delta sehB$  estuvo muy afectada en la replicación comparada a la cepa silvestre cuando fue inoculada por vía i.p. mostrando valores de atenuación muy similares a la mutante *ssaV*, que afecta el ensamblaje del sistema de secreción tipo III codificado en la isla de patogenicidad 2 (SPI-2). Interesantemente ni la mutante toxina  $\Delta sehA$  o la doble mutante TA  $\Delta sehAB$  estuvieron atenuadas en la virulencia con respecto a la cepa silvestre.

Por otro lado, la inoculación por vía oral mostró que además de la mutante antitoxina  $\Delta sehB$ , la mutante en el sistema TA  $\Delta sehAB$ , estuvo atenuada en la virulencia. Estos datos mostraron que el sistema TA  $SehAB$  es requerido cuando *Salmonella* entra por vía natural al hospedero (De la Cruz *et al.*, 2013).

## 2.10 La proteasa Lon

Lon es una serín-proteasa citoplasmática, dependiente de ATP, que medía la degradación selectiva de proteínas tanto plegadas como mal plegadas, formando parte del proteosoma bacteriano. Lon se identificó por primera vez en *Escherichia coli* (Swamy y Goldberg, 1981), descubriéndose proteínas homólogas en muchos organismos, desde procariotas a eucariotas. Lon es un oligómero de subunidades idénticas (~87 kDa), donde cada subunidad contiene tres dominios: el dominio amino-terminal, posiblemente implicado en el reconocimiento del sustrato (Ebel *et al.*, 1999), el dominio ATPasa central (dominio A) que contiene el ATP vinculante (Fischer y Glockshuber, 1994) y el dominio carboxi-terminal (dominio P) que contiene el sitio activo proteolítico formado por una díada catalítica serina-lisina (Amerik *et al.*, 1991). La proteasa Lon tiene funciones pleiotrópicas en bacterias, tanto patógenas como no patógenas, controlando diversos procesos celulares por medio de la degradación proteolítica de diferentes proteínas relacionadas con: metabolismo, replicación, transcripción, patogenicidad, motilidad, componentes de la envoltura celular, control de calidad de proteínas, etc. (Figura 8).

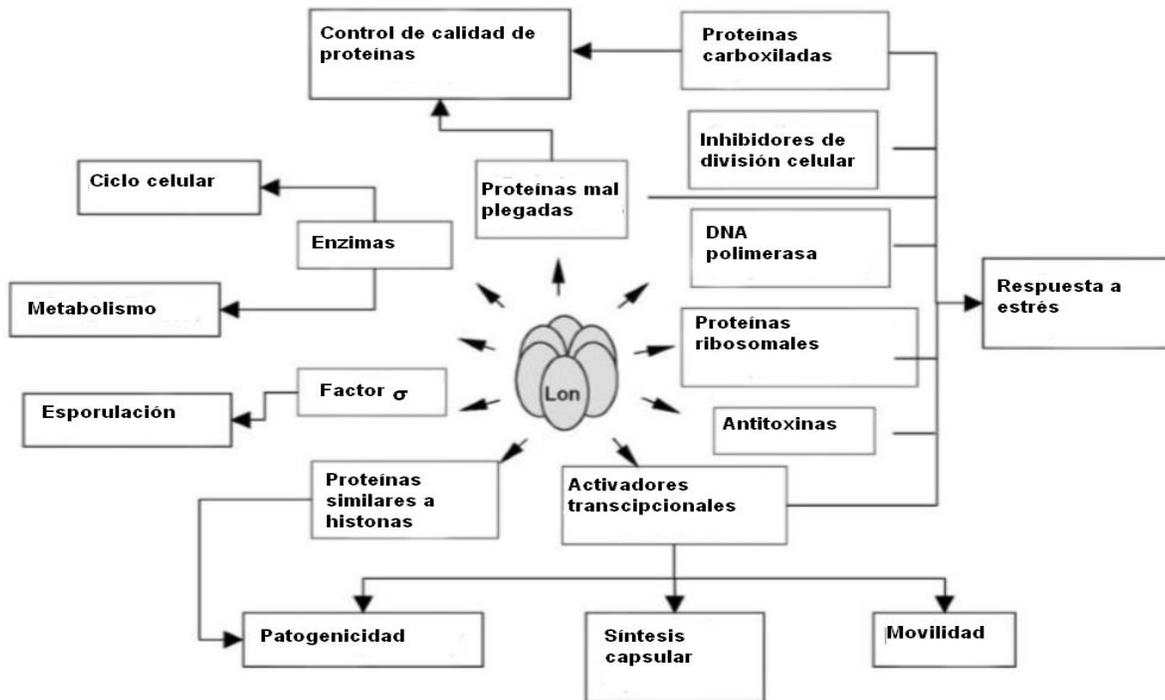


Figura 8. Diversidad de sustratos y funciones biológicas de la proteasa Lon. Tomado de Tsilibaris *et al.*, 2006.

Lon participa en la producción de polisacáridos capsulares, debido a que degrada a RcsA, la cual es un activador transcripcional de los genes que codifican para la capsula. Lon es requerida para la homeostasis celular y para sobrevivir a daños en el ADN y a estrés ambiental. Es capaz de degradar polipéptidos hasta pequeñas cadenas de 5 a 10 aminoácidos (Tsilibaris *et al.*, 2006). Estas proteasas también son conocidas como proteínas de estrés, las cuales son inducidas en respuesta a condiciones desfavorables (Gottesman, 1996).

En *Salmonella*, Lon regula negativamente la eficacia de invasión de células epiteliales (Takaya *et al.*, 2002), donde una mutante en *lon* incrementa la transcripción de los genes de SPI-1.

Interesantemente en términos de los sistemas TA tipo II, la proteasa Lon degrada específicamente las antitoxinas de diferentes sistemas como RelBE, HipBA, HicBA, ChpAK/MazF, ChpBK, CcdAB, entre otras, donde la actividad de la toxina perteneciente a los cuatro primeros inhibe la síntesis de proteínas mientras que CcdAB está involucrado en el mantenimiento del plásmido F mediante la muerte postsegregacional, actuando como un regulador positivo de la expresión genética, debido a que en ausencia de la proteasa Lon, la antitoxina se acumula y autoreprime su propia transcripción (Christensen *et al.*, 2003; Madl *et al.*, 2006; Overgaard *et al.*, 2009; Christensen-Dalsgaard *et al.*, 2010; Hansen *et al.*, 2012; Muthuramalingam *et al.*, 2016).

### 3 JUSTIFICACIÓN

La vía más frecuente de contaminación por *Salmonella* en seres humanos es fundamentalmente la ingestión de alimentos procedentes de animales contaminados como carne no cocinada y huevo. Se estima que *Salmonella* no tifoidea afecta anualmente a decenas de millones de personas de todo el mundo y provoca más de cien mil defunciones (OMS, 2013). Estos altos números de infecciones hacen hincapié en la importancia de este patógeno intracelular. La mortalidad por esta bacteria es principalmente un problema de salud en los países en desarrollo, pero la morbilidad debida a infecciones agudas por esta tiene un impacto socioeconómico importante en los países industrializados.

*S. Typhimurium* es el serotipo más estudiado debido a su relevancia clínica, su capacidad de infectar una amplia gama de animales y su susceptibilidad a la manipulación genética.

Los sistemas toxina-antitoxina tipo II han emergido como factores de virulencia determinantes en muchas bacterias patógenas, incluyendo *Salmonella*. La regulación de la transcripción de estos ha sido poco estudiada y uno de los factores que controla su expresión es la proteasa Lon. SehAB es un sistema toxina-antitoxina tipo II que controla la virulencia de *S. Typhimurium* y no existen reportes acerca de la función de Lon en la expresión de este. Los datos generados en este trabajo nos ayudarán a entender la relevancia de la proteasa Lon en el control transcripcional de SehAB y su papel en la patogenicidad de *S. Typhimurium*.

## 4 HIPÓTESIS

Debido a que las antitoxinas tipo II son susceptibles a la degradación proteolítica mediada por la proteasa Lon, la ausencia de esta proteasa provocará una acumulación de la antitoxina SehB, que al actuar como represor transcripcional, disminuirá la expresión del operón bicistrónico *sehAB* en *S. Typhimurium*.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

- Analizar la expresión del sistema toxina-antitoxina SehAB de *S. Typhimurium* en ausencia de la proteasa Lon.

### 5.2 Objetivos específicos

- Determinar la expresión del operón bicistrónico *sehAB*, mediante PCR en tiempo real, de *S. Typhimurium* en condiciones de inducción de SPI-1 y de SPI-2.
- Cuantificar la expresión del operón bicistrónico *sehAB* en los fondos genéticos silvestre y mutante *lon* de *S. Typhimurium*.

## 6 MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Material biológico

Para este trabajo se emplearon las siguientes cepas:

Cepa	Descripción	Referencia
14028s	<i>S. Typhimurium</i> wt.	De la Cruz <i>et al.</i> , 2015.
DTM61	<i>S. Typhimurium</i> $\Delta lon$ .	De la Cruz <i>et al.</i> , 2015.

### 6.2 Cultivo y condiciones de crecimiento

#### 6.2.1 Inducción de SPI-1

Las cepas de *S. Typhimurium* silvestre y mutante  $\Delta lon$  fueron crecidas a una temperatura de 37 °C en una incubadora elíptica a 150 rpm en 5 mL de medio LB (1% de triptona (Sigma-Aldrich), 1% de cloruro de sodio (NaCl) (Sigma-Aldrich), 0.5% de levadura (Sigma-Aldrich)) y antibiótico kanamicina (Km) a una concentración de 20 µg/mL para la cepa mutante durante toda la noche. Se obtuvo la densidad óptica (D.O.) con 800 µL del cultivo crecido toda la noche a una absorbancia de 600 nm y se realizaron los cálculos para obtener una D.O. inicial de 0.05 en 20 mL de medio LB. Se inoculó la cantidad necesaria de la bacteria y se creció durante 3 h a 150 rpm y 37 °C hasta alcanzar una D.O. entre 1.4-1.5. Se tomaron 10 mL del cultivo y se centrifugó en un tubo cónico de 15 mL a 4000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se decantó el medio y se guardó la pastilla bacteriana a -70 °C hasta la extracción de ARN.

#### 6.2.2 Inducción de SPI-2

Para la inducción de SPI-2 se usaron dos medios de cultivo: LB y medio mínimo. Para el cultivo en medio LB se usó el mismo procedimiento de inducción de SPI-1, con excepción que la bacteria creció toda la noche hasta alcanzar una D.O. de 1.9-2.0.

Para el crecimiento en medio mínimo se realizó lo siguiente: a partir del pre-inóculo crecido toda la noche en medio LB, se tomaron 2 mL y se centrifugó a 12000 rpm por 1 min, se decantó el medio LB y la pastilla bacteriana fue resuspendida en 2 mL de medio mínimo. Posteriormente, se centrifugó nuevamente a 12000 rpm 1 min, se decantó el medio y la pastilla resultante se resuspendió en 1 mL de medio mínimo el cual se inoculó en 30 mL de medio mínimo y se dejó creciendo a 37 °C a 1500 rpm durante 24 h. Se centrifugaron 10 mL del cultivo en tubos de 15 mL a 4000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se decantó el medio para obtener la pastilla bacteriana y esta se guardó a -70 °C hasta la extracción de ARN.

### **6.3 Extracción y cuantificación de ARN**

La extracción del ARN total de *S. Typhimurium* se realizó por el método de fenol ácido, llevándose a cabo de la siguiente manera:

#### **6.3.1 Rompimiento celular**

El cultivo de bacterias (10 mL) se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min. Se desechó el sobrenadante y la pastilla obtenida se resuspendió en 500 µL de solución de lisis (0.5% de dodecil sulfato de sodio (SDS) (Sigma-Aldrich), 10 mM de acetato de sodio (CH<sub>3</sub>COONa) (Sigma-Aldrich), 10 mM de ácido etilén-diamino tetra-acético (EDTA) (Sigma-Aldrich)) y se colocaron en tubos con tapón de rosca de 2 mL. Las bacterias se rompieron con vortex de la siguiente manera: 3 ciclos de 1 min a velocidad máxima seguido de 1 min en incubación en hielo.

Después, al lisado celular se añadieron 500 µL de fenol ácido (Sigma-Aldrich) precalentado a 65 °C y se agitaron vigorosamente los tubos. A continuación, se incubaron durante 5 min a 65 °C en el thermoblock. Posteriormente de la incubación, se centrifugaron a 16000 x g durante 5 min a 4 °C y se recuperó el lisado celular en tubos limpios. A cada tubo se les agregó dos volúmenes de etanol absoluto frío (Sigma-Aldrich), dejando precipitar el ARN a -20 °C toda la noche.

### **6.3.2 Precipitación del ARN**

Los tubos obtenidos en la fase anterior se centrifugaron a 16000 x g durante 10 min a 4 °C. El etanol se eliminó teniendo cuidado de no llevarse la pastilla obtenida y se lavaron con 1 mL de etanol al 70%, se centrifugaron a 16000 x g durante 5 min. El etanol se eliminó de la pastilla y se secó en campana por 10 min. Se resuspendió en 100 µL de agua DEPC (Invitrogen™) para evitar degradación del ARN.

### **6.3.3 Purificación del ARN**

A los tubos del paso anterior se les adicionaron 10 µL de Buffer para DNasa y 1 µL de DNasa TURBO 10X (Ambion), posteriormente se incubaron a 37 °C durante 30 min. Pasado el tiempo de incubación, a cada tubo se le adicionaron 10 µL del agente de inactivación de la DNasa y se mezclaron suavemente, después se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugaron a 8000 x g durante 2 min. La fase acuosa que contenía al ARN se transfirió a un tubo nuevo (100 µL).

Para comprobar la ausencia de ADN en las muestras de ARN total, se tomaron 2 µL de cada ARN, para emplearlo en una PCR para lo cual se utilizaron iniciadores específicos para el gen del ARNr 16S de *S. Typhimurium* (STM16SF: 5' TGCCTGATGGAGGGGGATAA 3' y STM16R: 5' TTCACAACACGAGCTGACGA 3'); como control positivo de la reacción de PCR, se empleó ADN genómico de la cepa silvestre.

En forma simultánea se estableció la integridad del ARN, en este caso 1 µL de la muestra se analizó en el bioanalizador mediante el uso de "chip" Prokaryote ARN Nano de Agilent Technology y se cuantificó mediante el Nano Drop ND-1000. Finalmente, el ARN se mantuvo a -70 °C hasta su uso.

## **6.4 Síntesis de ADNc**

En todo momento se emplearon los reactivos del kit Invitrogen™; se procedió a realizar la mezcla de reacción que estaba formada de la siguiente manera: 1 µg del ARN molde, 3 µL de

iniciadores al azar (50 ng/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L de dNTP's (10 mM) y agua DEPC a un volumen final de 10  $\mu$ L. La muestra se incubó a 65 °C durante 5 min y posteriormente se colocó en el hielo. A esta mezcla se le agregaron 2  $\mu$ L de regulador RT™ 10X, 4  $\mu$ L de cloruro de magnesio MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1  $\mu$ L de RNasa OUT (40 U/ $\mu$ L) y 2  $\mu$ L de ditiotreitól DTT 0.1 M.

La muestra se incubó a 25 °C durante 2 min, al término de la incubación se adicionó 1  $\mu$ L de la enzima Super Script II™ (50 U/ $\mu$ L) y se llevó a cabo en el termociclador Eppendorf™ flexid Mastercycler® nexus GSX1 con el siguiente ciclo de temperaturas: 25 °C durante 10 min, 42 °C durante 50 min y 70 °C durante 15 min. La mezcla se colocó en el hielo durante 5 min y posteriormente se agregó 1  $\mu$ L de la enzima RNasa H (20 U/ $\mu$ L) y se incubó a 37 °C durante 20 min. Al final se almacenó a -70 °C hasta su uso.

## **6.5 Amplificación de los genes mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real**

Para la realización de la PCR en tiempo real, se empleó el termociclador LightCycler 480 (Roche); y el sistema de detección fue el fluorocromo SYBR® Green I. Las reacciones para los ensayos de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en placas de plástico de 96 pozos especiales para el equipo Lightcycler®480.

La mezcla de reacción para cada pozo consistió en:

- 1.5  $\mu$ L de agua grado PCR contenida en el kit comercial.
- 1.0  $\mu$ L de la mezcla de los iniciadores 20  $\mu$ M.
- 5.0  $\mu$ L de "LightCycler® 480 SYBR Green I Master" 10X.
- 2.5  $\mu$ L de ADNc.

Cada reacción se realizó por triplicado.

Con la mezcla de reacción se llenó cada pozo de la placa, se selló con una lámina plástica adherente y se centrifugo a 1500 x g por 2 min. Después se colocó en el equipo LightCycler® 480 (Roche) aplicando en seguida el programa recomendado por el manual del usuario, el cual se describe a continuación: un ciclo a 95 °C durante 5 min, 45 ciclos en las siguientes condiciones: 95 °C durante 10 s, temperatura de alineamiento correspondiente para cada par de iniciadores durante 10 s y 72 °C durante 10 s (en este punto se realiza la medición de la fluorescencia), posteriormente un ciclo en las siguientes condiciones: 95 °C durante 5 s a una temperatura de 4.4 °C/s, 65 °C durante 1 min a una temperatura de 2.2 °C/s y 97 °C durante 5 s (durante esta fase se medirá la fluorescencia en forma continua para construir la curva de disociación), y un ciclo final de enfriamiento a 40 °C durante 10 s.

## 6.6 Determinación de la expresión genética relativa

El método descrito por Livak y Schmittgen (2001), se utilizó para determinar la expresión genética en unidades de expresión relativa mediante la aplicación de la fórmula matemática  $2^{-\Delta CT}$ . La  $\Delta CT$  se determinó al restar el valor de CT (*crossing threshold*) del gen en estudio menos el valor de CT del gen normalizador *rrsH* (16S ARNr).

## 6.7 Análisis estadístico de los resultados

Con la finalidad de detectar diferencias significativas en la expresión genética de las diferentes cepas de *S. Typhimurium*, se efectuó un análisis paramétrico de varianza unifactorial (One Way ANOVA) y comparación múltiple de Tukey empleando para ello el software estadístico GraphPad PRISM 5.0. Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

Los resultados se graficaron en escala logarítmica debido a que los valores de expresión relativa están en el orden de magnitud de  $10^2$ - $10^4$ .

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Extracción de ARN total de *S. Typhimurium* crecida en diferentes condiciones

Una vez que se realizó la extracción, se evaluó la concentración y pureza de los ARN de la cepa silvestre y mutante  $\Delta lon$  usando el equipo Nano Drop ND-1000. Como se muestra en el cuadro 2, se obtuvieron concentraciones de ARN en un rango entre 300-1300 ng/ $\mu$ L y una pureza entre 2-2.2, según el cociente de absorción A260/280 nm.

Cuadro 2. Concentración y pureza de ARN

Condición	WT	$\Delta lon$
<b>Medio LB (logarítmica)</b>	765 ng/ $\mu$ L	1063 ng/ $\mu$ L
<b>A260/280 nm</b>	2.2	2.2
<b>Medio LB (estacionaria)</b>	722 ng/ $\mu$ L	912 ng/ $\mu$ L
<b>A260/280 nm</b>	2.1	2.2
<b>Medio mínimo</b>	725 ng/ $\mu$ L	325 ng/ $\mu$ L
<b>A260/280 nm</b>	2.1	2.1

Asimismo, se evaluó la integridad de los ARN por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 2% en condiciones desnaturalizantes. Como ARN de referencia se usó el ARN total de *E. coli* observando el patrón de migración de los ARNr 23S y 16S (Figura 9).

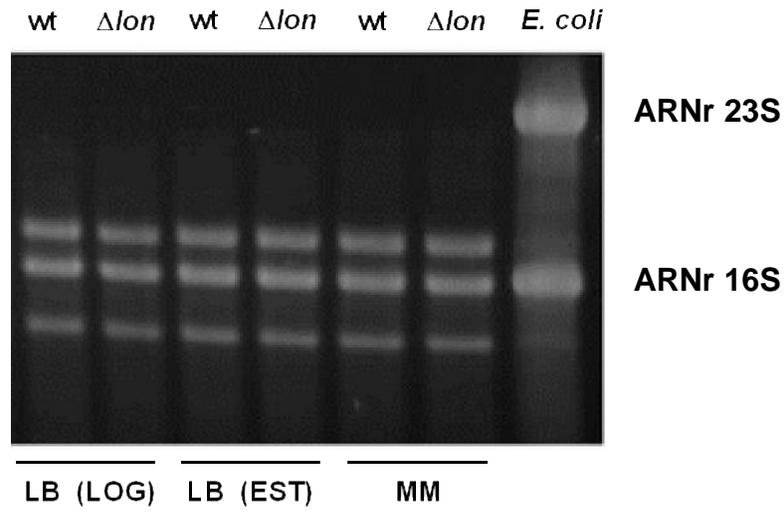


Figura 9. Electroforesis mostrando el ARN total de las cepas silvestre y mutante  $\Delta lon$  de *S. Typhimurium* en las diferentes condiciones de cultivo: medio LB en fase logarítmica (LB LOG), medio LB en fase estacionaria (LB EST) y medio mínimo (MM). Como control se usó el ARN total de *E. coli*. En las cepas de *Salmonella* se observan tres bandas dado que 23S se fracciona en dos dando como resultado una banda por debajo y otra por encima de 16S.

## 7.2 Efecto de las condiciones de crecimiento sobre la expresión del operón bicistrónico *sehAB* de *S. Typhimurium*

Previamente fue reportado que la expresión del operón *sehAB* se incrementó cuando *S. Typhimurium* creció en medio mínimo, comparada al crecimiento en medio LB en fase logarítmica (De la Cruz *et al.*, 2013). Estos niveles de expresión fueron determinados por medio de la cuantificación de los niveles de fluorescencia del reportero plasmídico *sehAB-gfp* en la cepa silvestre de *S. Typhimurium*. Para corroborar estas observaciones, la expresión del operón bicistrónico *sehAB* fue cuantificada a nivel cromosomal por medio de qPCR.

Además del crecimiento en medio LB en fase logarítmica y medio mínimo, la expresión del operón bicistrónico *sehAB* se analizó en medio LB en fase estacionaria, la cual es una condición de inducción de SPI-2, dependiente de la expresión de SPI-1 (Bustamante *et al.*, 2008).

La cuantificación de la expresión por medio de qPCR mostró que en medio LB en fase estacionaria los genes *sehA* y *sehB* se indujeron 12 y 17 veces, respectivamente, con respecto al medio LB en fase logarítmica (Figura 10). La expresión del operón bicistrónico *sehAB* se incrementó dramáticamente cuando *S. Typhimurium* creció en medio mínimo, alrededor de 70 veces con respecto al crecimiento en medio LB en fase logarítmica. Comparando los niveles de expresión del operón *sehAB* en medio mínimo *versus* LB en fase estacionaria, la expresión de los genes *sehA* y *sehB* incrementó 6 y 4 veces, respectivamente.

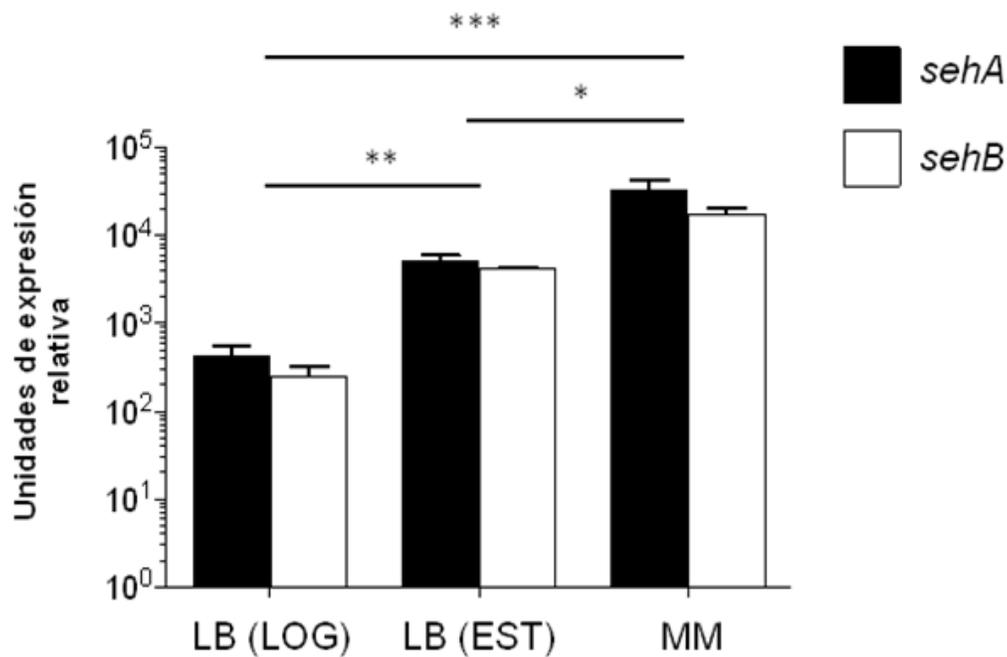


Figura 10. Niveles de expresión relativa ( $\log_{10}$ ) de los genes *sehA* (negro) y *sehB* (blanco) en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* crecida en medio LB en fase logarítmica (LB LOG), medio LB en fase estacionaria (LB EST) y medio mínimo (MM). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ : diferencias estadísticamente significativas con respecto a LB (LOG).

### 7.3 Efecto de la proteasa Lon sobre la expresión de los genes *sehAB* de *S. Typhimurium*

Para analizar el efecto de la proteasa Lon sobre la expresión del operón *sehAB*, se cuantificó la transcripción de los genes *sehA* y *sehB* en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y en la derivada mutante  $\Delta lon$  en medio mínimo, el cual fue el medio de cultivo en el que observamos mayor expresión de los genes. En la ausencia de la proteasa Lon, los genes *sehA* y *sehB* se reprimieron 25 y 15 veces, respectivamente con respecto a la cepa silvestre (Figura 11).

Estos datos confirman que Lon tiene un papel positivo en la expresión del operón *sehAB*, similar a lo que se ha reportado para otros genes toxina-antitoxina.

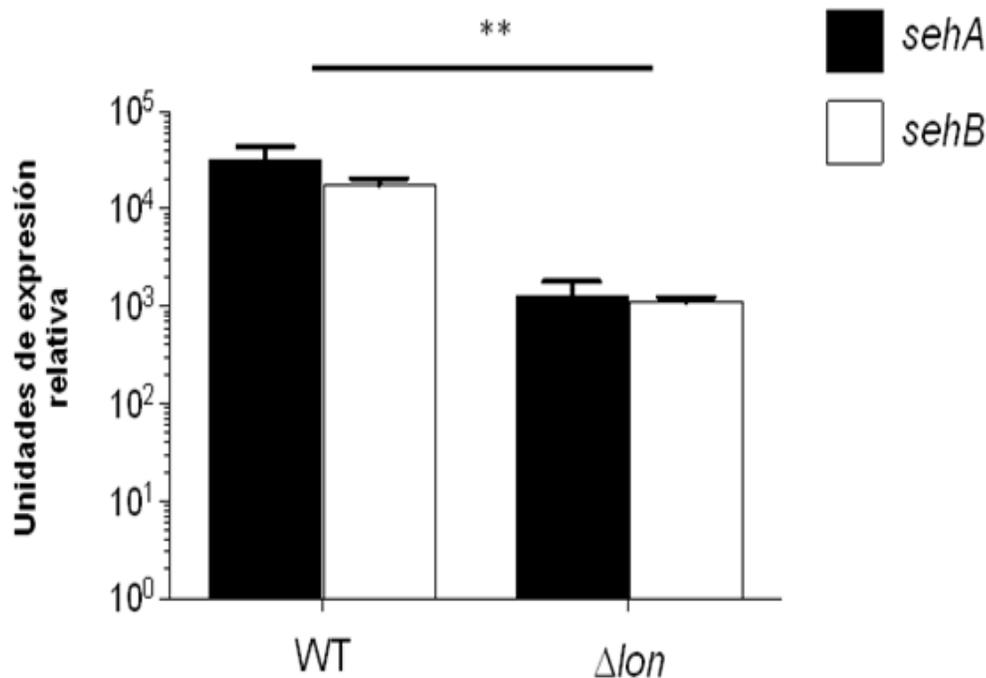


Figura 11. Niveles de expresión relativa (log10) de los genes *sehA* (negro) y *sehB* (blanco) en las cepas silvestre y mutante  $\Delta lon$  de *S. Typhimurium* crecidas en medio mínimo. \*\*  $p < 0.01$ : diferencias estadísticamente significativas con respecto a cepa silvestre (WT).

## 8 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 8.1 La expresión del operón bicistrónico *sehAB* muestra una expresión diferencial dependiente de las condiciones de cultivo

Los principales determinantes de virulencia de *S. Typhimurium* están codificados en SPI-1 y SPI-2, donde la expresión de cada isla puede ser analizada cuando la bacteria crece en medio LB y medio mínimo, respectivamente. El medio LB (medio rico) mimetiza las condiciones extracelulares que experimentaría *Salmonella* cuando llega al lumen intestinal, mientras que el medio mínimo (bajas concentraciones de fosfato y magnesio) asemeja las condiciones intracelulares, específicamente las vacuolas que contienen a *Salmonella* (SCV) (Bustamante *et al.*, 2008). Con respecto a la expresión de sistema TA tipo II *SehAB*, su expresión fue altamente inducida cuando *S. Typhimurium* creció en medio mínimo comparada al crecimiento exponencial en medio LB (Figura 10), soportando la noción que estos genes son expresados en condiciones intracelulares probablemente en funciones relacionadas con la sobrevivencia y replicación dentro de las células eucarióticas. Reportes previos, tanto de nuestro laboratorio como de otros grupos han mostrado que el sistema *sehAB* se expresa en el macrófago (Eriksson *et al.*, 2003; De la Cruz *et al.*, 2013; Silva-Herzog *et al.*, 2015). En término de las toxinas del loci TA, estas proteínas contribuyen a la tolerancia hacia estreses ambientales experimentados por la bacteria (Maisonneuve y Gerdes, 2014), controlando directa o indirectamente el crecimiento, bloqueando diferentes procesos celulares esenciales, como la replicación del ADN o la traducción de los ARNm (Sat *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2014). Por lo que pensamos que la expresión de *sehA* es mayor en medio mínimo.

Además de las dos condiciones de crecimiento clásicas analizadas, la expresión del operón *sehAB* se cuantificó en bacterias crecidas en medio LB en fase estacionaria, condiciones ya reportadas que indican que también induce la expresión de SPI-2, pero dependiente de la expresión de HlID, el regulador central de SPI-1 (Bustamante *et al.*, 2008).

Interesantemente, la expresión de *sehAB* se incrementó en fase estacionaria comparada a la fase exponencial (Figura 10), similar a la expresión que muestran los genes de SPI-2 en las mismas condiciones de crecimiento. El patrón de expresión similar que muestra *sehAB* con los genes de SPI-2 abre la posibilidad de analizar si este sistema TA es controlado por reguladores de SPI-1 y SPI-2 como HilD y SsrB, respectivamente.

## 8.2 La proteasa Lon controla positivamente la expresión del operón *sehAB*

La proteasa Lon desempeña un papel importante en el control de calidad de las proteínas. Un número creciente de proteínas reguladoras se han identificado a manera de sustratos de Lon, indicando así que además de su función de control de calidad, esta proteasa degrada las proteínas naturalmente inestables que están involucradas en gran variedad de procesos biológicos (Tsilibaris *et al.*, 2006).

En lo que se refiere al control transcripcional de los sistemas TA tipo II, Lon es necesaria para la activación de algunos sistemas TA cromosómicos en *E. coli* tal es el caso de la transcripción del operón *relBE*. La degradación de la antitoxina RelB por parte de la proteasa Lon, activa la expresión de RelE, ya que RelB autorregula negativamente su propia transcripción (Christensen *et al.*, 2001). En HipBA, otro sistema TA tipo II, Lon es la principal proteasa responsable de la degradación de la antitoxina HipB (Hansen *et al.*, 2012).

Además de los sistemas cromosómicos, el papel de Lon se ha descrito en genes TA codificados en plásmidos. El sistema CcdAB, el cual está codificado en el plásmido conjugativo F, está formado por la toxina CcdB y la antitoxina CcdA y se reportó que la proteasa Lon degradó específicamente la antitoxina CcdA, incrementando la transcripción del operón *ccdAB* (Van Melderen *et al.*, 1994).

Ya que la proteasa Lon regula la expresión de los sistemas TA tipo II por medio de la proteólisis de la antitoxina, se evaluó la transcripción del operón bicistrónico *sehAB* de *S. Typhimurium*, en ambos genes *sehA* y *sehB* tanto en el fondo silvestre como usando una mutante nula en el gen  $\Delta lon$ . La ausencia de la proteasa Lon disminuyó la expresión de ambos genes *sehA* y *sehB* cuando *S. Typhimurium* creció en medio mínimo (Figura 11), corroborando el papel positivo que tiene Lon sobre los sistemas TA tipo II. En términos de estabilidad, la antitoxina SehB es mucho menos estable que la toxina SehA, sugiriendo que SehB podría ser degradada directamente por Lon. Estos datos junto a los experimentos de qPCR apuntan a que Lon degradaría a la antitoxina SehB en *S. Typhimurium*, ya que en la mutante  $\Delta lon$  la antitoxina SehB se acumularía y reprimiría su propia transcripción.

Los resultados generados en esta tesis corroboran el papel relevante de la proteasa Lon para degradar a la antitoxina. Se sabe que la interacción antitoxina-toxina, permite la formación de un complejo represor completamente funcional, reduciéndose así la transcripción de ambos genes. Sin embargo, este efecto represor puede ser ejercido solamente con la presencia de la antitoxina. La formación del complejo TA permite mantener niveles de toxina en la célula lo suficientemente bajos como para no interferir con el crecimiento normal de ésta, pero lo suficientemente altos tales que le permitan responder rápidamente ante situaciones en las que el sistema debe activarse, por ejemplo, estrés o pérdida de plásmidos (Zielenkiewicz y Ceglowski, 2005).

Interesantemente, la proteasa Lon no degrada a todas las antitoxinas tipo II, mostrando que la degradación proteolítica es específica. En *Staphylococcus aureus*, Lon no afectó la estabilidad de las antitoxinas pertenecientes a los sistemas MazEF, Axe1-Txe1 y Axe2-Txe2 (Donegan *et al.*, 2010). Similarmente, en *Pseudomonas putida* (una bacteria no patógena del suelo), Lon no participa en la proteólisis de la antitoxina GraA (Tamman *et al.*, 2015).

Con base a los resultados obtenidos de la expresión del sistema *sehAB* de la mutante *lon*, se podría sugerir que Lon es la principal proteasa que degrada la antitoxina SehB.

La expresión del sistema SehAB, se incrementó cuando *S. Typhimurium* creció en medio mínimo, apuntando a que la actividad proteolítica de Lon sobre la antitoxina SehB sería mayor en esta condición de crecimiento, lo cual provocaría que la toxina SehA tuviera una función importante en la virulencia de *S. Typhimurium*, como la sobrevivencia de esta bacteria en ganglios linfáticos mesentéricos (De la Cruz *et al.*, 2013).

## 9 CONCLUSIONES

- El operón bicistrónico *sehAB* de *S. Typhimurium* presentó altos niveles de expresión cuando la bacteria creció en medio mínimo, el cual es una condición de estrés que favorece la expresión de SPI-2.
- La ausencia de la proteasa Lon tiene un efecto positivo en la expresión del sistema *sehAB* de *S. Typhimurium* ya que disminuyó la expresión del módulo TA con respecto a la cepa silvestre.

## 10 PERSPECTIVAS

- Analizar la estabilidad de ambas proteínas SehA y SehB en el fondo mutante  $\Delta lon$  con respecto a la cepa silvestre.
- Determinar si la proteasa Lon afecta tanto la expresión como la estabilidad de las antitoxinas de los otros sistemas TA codificados en el cromosoma de *S. Typhimurium*.

## 11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Amerik, A., Antonov, V., Gorbalen., A., Rotanova, V., Shimbarevich, V., 1991. Site-directed mutagenesis of La protease: A catalytically active serine residue. FEBS. Lett. 287, 211-214.

Archundia, G., 2014. Cirugía 1: Educación Quirúrgica. 5ª ed. México. Mc GRAW HILL. 81.

Audoly, G., Vincentelli, R., Edouard, S., Georgiades, K., Mediannikov, O., Gimenez, G., Socolovschi, C., Mège, L., Cambillau, C., Raoult, D., 2011. Effect of rickettsial toxin VapC on its eukaryotic host. PLoS One. 6, 1-9.

Bäumler, A., Tsolis, R., Bowe, F., Kusters, J., Hoffmann, S., Heffron, F., 1996. The pef fimbrial operon of *Salmonella* Typhimurium mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. Infect. Immun. 64, 61-68.

Bäumler, J., Winter, S., Thiennimitry, P., Casadesús, J., 2011. Intestinal and chronic infections: *Salmonella* lifestyles in hostile environments. Environ. Microbiol. Rep. 3, 508-517.

Bustamante, L., Martínez, F., Santana, L., Knodler, O., Steele-Mortimer, J., Puente, L., 2008. HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105,14591-14596.

Castañeda, M., Braña, D., Cortes, C., Valdes, W., 2013. Calidad Microbiológica en la carne de pollo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México. UNAM. 4-10.

Coburn, B., Grassl, G., Finlay, B., 2007. *Salmonella*, the host and disease a brief review. Immunol. Cell. Biol. 85,112-118.

Crawford, R., Rosales-Reyes, R., Ramírez-Aguilar, M., Chapa-Azuela, O., Alpuche-Aranda, C., Gunn, J., 2010. Gallstones play a significant role in *Salmonella* spp. Gallbladder colonization and carriage. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 4353-4358.

Cheng, H., Soo, C., Islam, S., McAnulty, M., Benedik, M., Wood, T., 2014. Toxin GhoT of the GhoT/GhoS toxin/antitoxin system damages the cell membrane to reduce adenosine triphosphate and to reduce growth under stress. Environ. Microbiol. 16, 1741–1754.

Christensen, S., Pedersen, K., Hansen, F., Gerdes, K., 2003. Toxin-antitoxin loci as stress-response-elements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA. J. Mol. Biol. 332, 809-819.

Christensen, S., Mikkelsen, M., Pedersen, K., Gerdes, K., 2001. RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 14328-14333.

Christensen-Dalsgaard, M., Jorgensen, M., Gerdes, K., 2010. Three new RelE-homologous mRNA interferases of *Escherichia coli* differentially induced by environmental stresses. *Mol. Microbiol.* 75, 333-348.

De la Cruz, M., Zhao, W., Farenc, C., Giménez, G., Raoult, D., Cambillau, C., Gorvel, J., Meresse, S., 2013. A toxin-antitoxin module of *Salmonella* promotes virulence in mice. *PLoS Pathog.* 9, 1-10.

De la Cruz, M., † Pérez-Morales, D., † Palacios, J., Fernández-Mora, M., Calva, E., Bustamante, V., 2015. The two-component system CpxR/A represses the expression of *Salmonella* virulence genes by affecting the stability of the transcriptional regulator HilD. *Front. Microbiol.* 6, 807.

Donegan, N., Thompson, E., Fu, Z., Cheung, A., 2010. Proteolytic Regulation of toxin-antitoxin Systems by ClpPC in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 192, 1416-1426.

Ebel, W., Skinner, M., Dierksen, K., Scott, J., Trempy, E., 1999. A conserved domain in *Escherichia coli* Lon protease is involved in substrate discriminator activity. *J. Bacteriol.* 181, 2236-2243.

Ellermeier, J., Slauch, J., 2007. Adaptation to the host environment: Regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 24-29.

Engelberg-Kulka, H., Amitai, S., Kolodkin-Gal, I., Hazan, R., 2006. Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. *PLoS Genet.* 2, 1518-1524.

Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M., Hinton, J., 2003. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* 47, 103-118.

Fábrega, A., Villa, J., 2013. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 308-341.

Fass, E., Groisman, A., 2009. Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 199-204.

Figueira, R., Holden, D., 2012. Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors. *Microbiol.* 158, 1147-1161.

Fineran, P., Blower, T., Foulds, I., Humphreys, D., Lilley, K., Salmond, G., 2009. The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 894-899.

Fischer, H., Glockshuber, R., 1994. A point mutation within the ATP-binding site inactivates both catalytic functions of the ATP-dependent protease La (Lon) from *Escherichia coli*. *FEBS. Lett.* 356, 101-103.

Fookes, M., Schroeder, N., Langridge, G., Blondel, C., Mammina, C., Connor, T., Seth-Smith, H., Vernikos, G., Robinson, K., Sanders, M., Petty, N., Kingsley, R., Bäumler, A., Nuccio, S., Contreras, I., Santiviago, C., Maskell, D., Barrow, P., Humphrey, T., Nastasi, A., Roberts, M., Frankel, G., Parkhill, J., Dougan, G., Thomson, N., 2011. *Salmonella bongori* provides insights into the evolution of the Salmonellae. *PLoS Pathog.* 7, 1-10.

Foster, J., Hall, H., 1991. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella Typhimurium*. *J. Bacteriol.* 173, 5129-5135.

Fozo, E., Hemm, M., Storz, G., 2008. Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 579-589.

Franch, T., Thisted, T., Gerdes, K., 1999. Ribonuclease III processing of coaxially stacked RNA helices. *J. Biol. Chem.* 274, 26572-26578.

Freifelder, D., 1981. *Técnicas de bioquímica y biología molecular*. España. REVERTÉ. 597.

Galán, J., Collmer, A., 1999. Type III secretion machines bacterial devices for protein delivery into host cells. *Sci.* 284, 1322-1328

Galán, J., Curtiss, R., 1989. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella Typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 6383-6387.

García-del Portillo, F., Zwick, M., Leung, K., Finlay, B., 1993a. *Salmonella* induces the formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins in epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 10544-10548.

García-del Portillo, F., Zwick, M., Leung, K., Finlay, B., 1993b. Intracellular replication of *Salmonella* within epithelial cells is associated with filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins. *Infect. Agents Dis.* 2, 227-231.

García-del Portillo, F., Finlay, B., 1994. Invasion and intracellular proliferation of *Salmonella* within non-phagocytic cells. *Microbiol.* 10, 229-238.

García-del Portillo, F., Finlay, B., 1995. Targeting of *Salmonella* Typhimurium to vesicles containing lysosomal membrane glycoproteins bypasses compartments with mannose 6-phosphate receptors. *J. Cell. Biol.* 129, 81-97.

Georgiades, K., Raoult, D., 2011. Genomes of the most dangerous epidemic bacteria have a virulence repertoire characterized by fewer genes but more toxin-antitoxin modules. *PLoS One* 6, 1-8.

Gerdes, K., Bech, F., Jorgenson, S., Lobner-Olesen, A., Rasmussen, P., Atlung, T., Boe, L., Karlstrom, O., Molin, S., Von Meyenburg, K., 1986. Mechanism of postsegregational killing by the *hok* gene product of the *parB* system of plasmid R1 and its homology with the *relF* gene product of the *E. coli relB* operon. *EMBO. J.* 5, 2023-2029.

Gerdes, K., Christensen, S., Lobner-Olesen, J., 2005. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 371-382.

González-Escobedo, G., Gunn, J., 2013. Identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genes regulated during biofilm formation on cholesterol gallstone surfaces. *Infect. Immun.* 81, 3770-3780.

Gottesman, S., 1996. Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* 30, 465-506.

Goulard, C., Langrand, S., Carniel, E., Chauvaux, S., 2010. The *Yersinia pestis* chromosome encodes active addiction toxins. *J. Bacteriol.* 192, 3669-3677.

Grimont, P., Weill, F., 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9<sup>a</sup> ed. France. World Health Organization Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella* Pasteur Institute. 109-120.

Groisman, E., Ochman, H., 1997. How *Salmonella* become a pathogen. *Trends. Microbiol.* 5, 343-349.

Haneda, I., Shimizu, H., Ohshima, K., Iida, N., Danbara, H., Okada, N., 2012. *Salmonella* type III effector SpvC, a phosphothreonine lyase, contributes to reduction in inflammatory response during intestinal phase of infection. *Cell. Microbiol.* 14, 485-499.

Hansen, S., Vulić, M., Min, J., Yen, T., Schumacher, M., Brennan, R., Lewis, K., 2012. Regulation of the *Escherichia coli* HipBA toxin-antitoxin system by proteolysis. *PLoS One* 7, 1-9.

Hansen-Wester, I., Hensel, M., 2001. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microb. Infec.* 3, 549-559.

- Haraga, A., Ohlson, M., Mille, S., 2008. *Salmonella* interplay with host cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 53-66.
- Harmer, C., Holt, K., Hall, R., 2014. A type 2A/C2 plasmid carrying the aacC4 apramycin resistance gene and the erm (42) erythromycin resistance gene recovered from two *Salmonella enterica* serovars. *J. Anti. Microb. Chemother.* 70, 1021–1025.
- Hayes, F., 2003. Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Sci.* 301, 1496-1499.
- Hensel, M., Hinsley, A., Nikolaus, T., Sawers, G., Berks, B., 1999. The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella* Typhimurium. *Mol. Microbiol.* 32, 275-287.
- Herrero, A., Mendoza, M., Rodicio, R., Rodicio, M., 2008. Characterization of pUO-StVR2, a virulence-resistance plasmid evolved from the pSLT virulence plasmid of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrob. Agents Chem.* 52, 4514-4517.
- Jones, B., Ghori, N., Falkow, S., 1994. *Salmonella* Typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J. Exp. Med.* 180, 15-23.
- Jurado, J., Arenas, M., Doblas, D., Torre, C., 2010. Fiebre tifoidea y otras infecciones por *Salmonella*. *Med.* 10, 3497-501.
- Kimbrough, T., Miller, S., 2002. Assembly of the type III secretion needle complex of *Salmonella* Typhimurium. *Microb. Infect.* 4, 75-82.
- Koneman, W., 2008. Diagnóstico microbiológico: Texto y atlas en color. 6ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 241.
- Ledeboer, N., Frye, J., McClelland, M., Jones, B., 2006. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium requires the Lpf, Pef, and Tafi fimbriae for biofilm formation on HEp-2 tissue culture cells and chicken intestinal epithelium. *Infect. Immun.* 74, 3156-3169.
- Lesnick, M., Reiner, N., Fierer, J., Guiney, D., 2001. The *Salmonella* spvB virulence gene encodes an enzyme that ADP-ribosylates actin and destabilizes the cytoskeleton of eukaryotic cells. *Mol. Microbiol.* 39, 1464-1470.
- Livak, K., Schmittgen, T., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta C(T)) Method. *Met.* 25, 402-408.

- Lobato, D., 2015. Contribución de los sistemas toxina-antitoxina de *Salmonella enterica* serovar typhimurium en la adaptación a la vida intracelular. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Longo, L., Fauci, S., 2013. Harrison gastroenterología y Hepatología. México. Mc Graw Hill. 26-41.
- Maccfaddin, J., 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª ed. España. Editorial Médica Panamericana. 354-361.
- Madl, T., Van Melderen, L., Mine, N., Respondek, M., Oberer, M., Keller, W., Khatai, L., Zangger, K., 2006. Structural basis for nucleic acid and toxin recognition of the bacterial antitoxin CcdA. J. Mol. Biol. 364,170-185.
- Maisonneuve, E., Gerdes, K., 2014. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. Cell 157, 539-554.
- Marcus, S., Bruemell, H., Pfeiffer, C., Finlay, B., 2000. *Salmonella* pathogenicity Island: big virulence in small packages. Microb. Infect. 2, 145-156.
- Masuda, H., Tan, Q., Awano, N., Wu, K., 2012. Inouye M. YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 84, 979-989.
- Mazurkiewicz, P., Thomas, J., Thompson, J., Liu, M., Arbibe, L., Sansonetti, P., Holden, W., 2008. SpvC is a *Salmonella* effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases. Mol. Microbiol. 67, 1371-1383.
- McGhie, J., Brawn, L., Hume, P., Humphreys, D., Koronakis, V., 2009. *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. Curr. Opin. Microbiol. 12, 117-124.
- Meresse, S., Unsworth, K., Habermann, A., Griffiths, G., Fang, F., Martínez-Lorenzo, M., Waterman, S., Gorvel, J., Holden, D., 2001. Remodelling of the actin cytoskeleton is essential for replication of intravacuolar *Salmonella*. Cell. Microbiol. 3, 567-577.
- Miao, E., Miller, S., 2000. A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by *Salmonella* Typhimurium. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 7539-7544.
- Mills, D., Bajaj, V., Lee, C., 1995. A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella* Typhimurium invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* k-12 chromosome. Mol. Microbiol. 15, 749-759.

- Montoya, V., 2008. Microbiología básica para el área de la salud y afines. 2ª ed. Colombia Universidad de Antioquia. 40.
- Murray, P., Rosenthal, S., Pfaller, A., 2013. Microbiología Médica. 7ª ed. España. Elsevier. 266-775.
- Muthuramalingam, M., White, J., Bourne, C., 2016. Toxin-antitoxin modules are pliable switches activated by multiple protease pathways. *Tox.* 8, 214.
- Norton, J., Mulvey, M., 2012. Toxin-antitoxin systems are Important for niche-specific colonization and stress Resistance of uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog.* 8, 1-10.
- Ochman, H., Soncini, F., Solomon, F., Groisman, E., 1996. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 7800-7804.
- OMS. 2013. *Salmonella* (no tifoidea), SCRIBD, núm. 139. Recuperado el 1 de noviembre de 2017, de <https://es.scribd.com/document/313579967/OMS-Salmonella-no-tifoidea>.
- Overgaard, M., Borch, J., Gerdes, K., 2009. RelB and RelE of *Escherichia coli* form a tight complex that represses transcription via the ribbon-helix-helix motif in RelB. *J. Mol. Biol.* 394,183-196.
- Pandey, D., Gerdes, K., 2005. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic. Acids. Res.* 33, 966-976.
- Pascual, M., 2015. Enfermedades de origen alimentario: su prevención. España. Editorial Diaz De Santos. 27.
- Puerta, A., Mateos, F., 2010. Enterobacterias. *Med.* 10, 3426-3431.
- Romero, C., Herrera, B., 2002. Síndrome diarreico infeccioso. España. Panamericana. 118-121.
- Romero, C., 2007. Microbiología y Parasitología humana. 3ª ed. España. Editorial Médica Panamericana. 743-752.
- Rotger, R., Casadesús, J., 1999. The virulence plasmids of *Salmonella*. *Int. Microbiol.* 2, 177-184.
- Salcedo, S., Holden, D., 2003. SseG, a virulence protein that targets *Salmonella* to the Golgi network. *EMBO. J.* 22, 5003-5014.

- Sansonetti, P., 2002. Host-pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. *Gut*. 50, 2-6.
- Sat, B., Reches, M., Engelberg-Kulka, H., 2003. The *Escherichia coli mazEF* suicide module mediates thymineless death. *J. Bacteriol.* 185, 1803-1807.
- Silva-Herzog, E., McDonald, E., Crooks, A., Detweiler, C., 2015. Physiologic stresses reveal a *Salmonella* persister state and TA family toxins modulate tolerance to these stresses. *PLoS One*. 10, 1-16.
- Steele-Mortimer, O., 2008. The *Salmonella*-containing vacuole moving with the times. *Curr Opin. Microbiol.* 11, 38-45.
- Swamy, K., Goldberg, A., 1981. *E. coli* contains eight soluble proteolytic activities, one being ATP dependent. *Nat.* 292, 652-654.
- Takaya, A., Tomoyasu, A., Tokumitsu, M., Yamamoto, T., 2002. The ATP-dependent Lon protease of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium regulates invasion and expression of genes carried on *Salmonella* pathogenicity island 1. *J. Bacteriol.* 184, 224-232.
- Tamman, H., Ainelo, A., Tagel, M., Hōrak, R., 2015. Stability of the GraA antitoxin depends on growth phase, ATP level, and global regulator MexT. *J. Bacteriol.* 198, 787-796.
- Terragno, R., Caffer, M., Bruna, S., Binstein, N., 2003. Manual de procedimientos y serotipificación. México. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. 22-38
- Tindall, B., Grimont, P., Garrity, M., Euzéby, J., 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 521-524.
- Tortora, G., Funke, B., Case, C., 2007. Inducción a la microbiología. 9ª ed. España. Editorial Médica Panamericana. 249-267.
- Tsilibaris, V., Maenhaut-Michel, G., Van Melderen, L., 2006. Biological roles of the Lon ATP-dependent protease. *Res. Microbiol.* 157, 701-713.
- Van Melderen, L., Bernard, P., Couturier, M., 1994. Lon-dependent proteolysis of CcdA is the key control for activation of CcdB in plasmid-free segregant bacteria. *Mol. Microbiol.* 11, 1151 - 1157.
- Vázquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Mastroeni, P., Ischiropoulos, H., Fang, F., 2000. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. *J. Exp. Med.* 192, 227-236.

Wang, X., Kim, Y., Hong, S., Ma, Q., Brown, B., 2011. Antitoxin MqsA helps mediate the bacterial general stress response. *Nat. Chem. Biol.* 7, 359-366.

Wen, Y., Behiels, E., Devreese, B., 2014. Toxin-antitoxin systems their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. *Pathog. Dis.* 70, 240-249.

Winfield, M., Groisman, E., 2003. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3687-3694.

Wisner, A., Desin, T., White, A., Potter, A., Köster, W., 2012. The *Salmonella* pathogenicity island-1 and -2 encoded type III secretion systems. *INTECH.* 24, 475.

Wozniak, R., Waldor, M., 2009. A toxin-antitoxin system promotes the maintenance of an integrative conjugative element. *PLoS Genet.* 5, 1-10.

Yamaguchi, Y., Inouye, M., 2011. Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin-antitoxin systems. *Nat. rev.* 9, 779-790.

Zielenkiewicz, U., Ceglowski, P., 2005. The toxin-antitoxin system of the streptococcal plasmid pSM19035. *J. Bacteriol.* 187, 6094-6105.