

Protocolo molecular para obtener cepas vacunales atenuadas en su virulencia de *Salmonella entérica* Serotipo Enteritidis 82139

Liliana V. Villanueva Alva¹; Rafael Rotger Anglada¹;
Raúl A. Beltrán Orbegoso²

¹Laboratorio de Microbiología Molecular, liliana_villanueva_alva@hotmail.com; ¹Universidad Complutense de Madrid. España; ²Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Trujillo. Perú; r_bel_orbe@hotmail.com

Recibido: 09-12-11

Aceptado: 07-07-12

RESUMEN

Se presenta el Protocolo Molecular para obtener cepas vivas atenuadas en su virulencia a partir de *Salmonella entérica* Serotipo Enteritidis 82139 (*S. enteritidis* 82139), como modelo de elaboración de una cepa vacunal y la propuesta de modelos de biorreactores con fines de su producción. Se diseñó y seleccionó las cepas mutantes que permiten determinar la función génica de *dsbA*, *dle* y *dlp* en la capacidad de movilidad y de invasión bacteriana intracelular. Se obtuvieron cepas simples mutantes: 82139 C, 82139 I, 82139 2; cepas dobles mutantes: 82139 2C, 82139 2I y 82139 CI y la cepa triple mutante: 82139 2CI, con sus cepas control de expresión *dle*:82139 2CI pSTB1*dle* y 82139 pSTB1. Para la obtención y construcción de las cepas mutantes se usaron las técnicas: PCR, Electroforesis, electroelución, secuenciación, clonación, extracción plasmídica, miniprés y maxiprés de vectores monocopia y multicopia, recombinación genética por transformación y transducción, titulación de fagos, construcción de vectores, técnicas de interrupción y complementación génica. La cepa doble mutante 82139 2C, carente de los genes *dsbA* y *dlp* y la triple mutante 82139 2CI carente de los genes *dsbA*, *dlp* y *dle*, se constituyen en potenciales recursos genéticos para ser usados como cepas vacunales debido a que los genes mencionados codifican las proteínas TDOR: DsbA, Dlp y Dle, respectivamente. El trabajo establece las bases para proponer un protocolo Celular para ensayos *in vitro* en la determinación de infecciones bacterianas en líneas celulares y que reemplace a los ensayos *in vivo*.

Palabras clave: Proteínas TDOR DsbA, Dlp y Dle en *Salmonella entérica*, Serotipo Enteritidis 82139.

ABSTRACT

A molecular procedure is proposed to obtain alive attenuated no virulent strains from *Salmonella entérica* Serotype Enteritidis 82139, as a vaccine elaboration model and production scale bioreactor models as well. A factorial design allowed the mutant strains selection, which facilitated the genetic role of *dsbA*, *dle* y *dlp* genes in the bacterial motility and invasiveness activities. It was obtained the single mutant strains 82139 C, 82139 I, 82139 2; the double mutant strains 82139 2C, 82139 2I y 82139 CI, and a triple mutant 82139 2CI. As *dle* expression control strains were used the following: 82139 2CI pSTB1*dle* y 82139 pSTB1. To obtain and construct the mutant strains, it was used several genetic engineering tools such as PCR, electrophoresis, electroelution, sequencing, cloning, minipres and maxipres mono and multicopy plasmid extraction, transformation and transduction, fage doses, vector construction and genic complementation and recombination techniques. This work establishes the basis to formulate cellular assays to test *in vitro* bacterial infections in cellular lines and additional assays such as immunological one to confirm its use as vaccinal strain, and to propose large scale bioreactor models.

Key words: TDOR proteins DsbA, Dlp y Dle *Salmonella enteric*, Serotype Enteritidis 82139.

I. INTRODUCCIÓN

En la última década la *Salmonella* se ha convertido en el centro de atención de numerosos grupos de investigación que tratan de estudiar su capacidad patogénica desde el punto de vista genético y molecular. El género *Salmonella* comprende más de 2200 serovares distintos, algunos de los cuales pueden infectar un amplio rango de hospedador. *S. enteritidis*, por ejemplo, es capaz de infectar un gran número de aves y mamíferos, incluyendo al hombre (Jimenez y Jimenez, 1998; Rotger y col, 1995; Perea, 1992; Rotger y Casadesús, 1999; Sanchez-Jimenez y Cardona – Castro, 2003; Heras y col, 2010; Medina y col, 1996).

Para conocer el mecanismo funcional de los genes implicados en su patogenicidad se requirió de la manipulación genética y con ello, a la clonación. Estos grandes retos de la biología molecular y celular han despertado el interés de seguir con los estudios sobre la capacidad patogénica de *S. enteritidis* (Tortora y col, 1993).

Se Considera a **DsbA** como la principal proteína periplásmica tioldisulfuro óxido reductasa del sistema de proteínas TDOR **Dsb**, necesaria en la funcionalidad de toxinas, fimbrias, flagelos y componentes de sistema de secreción de proteínas tipo III, cuyo productor *dsbA* es de importancia patogénica, presente en toda bacteria gram negativa, entre la ya demostrada su actividad en *Shigella flexneri*, así como Ipa Chomóloga a SipCen *Salmonella*, que permiten el mantenimiento de las membranas vacuolares, evitando la lisis de las profusiones y con ello al aumento de la patogenicidad, así como también de otros efectores moleculares esenciales para la invasión en células epiteliales. Así también existe DsbA en algunas bacterias Gram positivas (Dongxia y col, 2008; Zheng y col, 1997; Gallant y col, 2004; Koreaki– Ito y Keinji –Inaba, 2008; Tsuyoshi y col, 2004; Watson y col; 2008).

Para el estudio de la funcionalidad del gen *dle* como otro de los genes codificadores de enzimas perteneciente a la familia TDOR, se decidió la verificación de su funcionalidad por dos estrategias génicas, por efecto de la inactivación génica (en ausencia del gen) y por efecto de complementación génica en triple mutante (en presencia del gen). El objetivo principal del presente trabajo de investigación fue proponer un Protocolo Genético – Molecular para obtener cepas vivas atenuadas en su virulencia a partir de *Salmonella enteritidis* 82139 para su posible uso como Modelo de Elaboración de una cepa vacunal y los Tipos de biorreactores con fines de su producción.

Las técnicas moleculares permitirán también obtener otras cepas vivas atenuadas (inactivadas) de *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium* y *Salmonella heidelberg* incluso, de distintos géneros, como son bacterias patógenas gram negativas del enterón tales como: *Vibrio*, *Shigella*, *Yersinia*, *E. coli* enteropatógeno 0158 y *E. coli* entero hemorrágico H7: 0157.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Objeto de estudio

El material biológico estuvo constituido por:

La cepa nativa y de control fue *Salmonella enteritidis* 82139 portadora de plásmido.

Las cepas mutantes fueron:

82139 I (*Salmonella enteritidis* *dle::aph3'* conteniendo el plásmido, *dlp*),

82139 C (cepa control, *Salmonella enteritidis* curada en ausencia de genes plasmídicos implicados en la virulencia, tal como, *spv*, así como de *dlp*).

82139 2 (*Salmonella enteritidis* *dsbA::cat*)

82139 2 I (*Salmonella enteritidis* con doble interrupción *dsbA/-dle-*, en presencia de los genes plasmídicos, como son de mayor importancia *spv* y *dlp*)

82139 2C (*Salmonella enteritidis* curada / libre de plásmido y *dsbA-*).

82139 CI (*Salmonella enteritidis* curada / libre de plásmido y *dle-*).

82139 2CI (*Salmonella enteritidis* curada / libre de plásmido, *dlp-* y de genes cromosómicos *dsbA-* y *dle-*).

82139 2CI pSTB1 *dle* (*Salmonella enteritidis*, cepa complementada)

82139 2CI pSTBlue1 (*Salmonella enteritidis*, cepa control de la expresión fenotípica de invasión del gen *dle*)

Todas las cepas pertenecen al Laboratorio de Microbiología II de la Línea de *Salmonella* de la Universidad Complutense de Madrid. Las cepas fueron conservadas a -70°C y -20°C en viales con medio LB y glicerol al 20% y 50%, respectivamente.

2.2. Métodos y técnicas

Método estadístico para la selección de las cepas mutantes diseñadas a partir de *s. enteritidis* 82139 portadora de plásmido

Diseño experimental: diseño factorial completo.

El Diseño Factorial 2^k , $2^3=8$ permitió la Selección y el Diseño de la construcción de 8 simples, dobles y triples cepas mutantes que determinarían la función génica de cada gen en estudio codificador de proteínas TDOR: DsbA, Dlp y Dle con respecto a la capacidad de movilidad y a la vez de forma interrelacionada de manera simultánea y en las mismas condiciones *in vivo* en *in vitro* (Hernández y col, 1999; Calzada 1964; Douglas 1991).

2^k , $2^3=8$ donde:

2, es el nivel de factor: Ausencia y Presencia

K=3, es el N° del factor, N° de proteínas en estudio:

DsbA (1), Dlp (2) y Dle (3):

	A			
	a ₀		a ₁	
	b ₀	b ₁	b ₀	b ₁
c ₀	a ₀ b ₀ c ₀	a ₀ b ₁ c ₀	a ₁ b ₀ c ₀	a ₁ b ₁ c ₀
c ₁	a ₀ b ₀ c ₁	a ₀ b ₁ c ₁	a ₁ b ₀ c ₁	a ₁ b ₁ c ₁

Donde: a = DsbA, b = Dlp y c = Dle

o = nivel bajo, SUPRESIÓN (ausencia)

1 = nivel alto, EXPRESIÓN (presencia)

Estrategia de uso de los protocolos moleculares

- Extracción de ADN plasmídico de *Escherichiacoli*. Se usaron los métodos del Maxiprep (Birboim y Doly, 1979) y el Método Miniprep.- extracción rápida (Birboim y Doly, 1979, citado por Mendoza del Cueto; 2002).

Electroforesis en geles de agarosa. Se realizó según las técnicas descritas por Sambrook y col (1989), citado por Mendoza del Cueto (2002). La concentración normal de agarosa D-1, baja EEO (Pronadisa) fue de un 0,7-0,8%, aunque se han empleado rangos variables entre 0,7% y 2% dependiendo del tamaño de las bandas de DNA objeto de análisis.

Extracción de DNA a partir de geles de agarosa. Las muestras de DNA se sometieron a electroforesis en geles de agarosa especial para electroforesis de ácidos nucleicos, SEA KEM *GTG*, suministrada por la marca comercial FMC BioProducts. Se tiñó el gel con Bromuro de Etidio en un baño durante 15 minutos, tras esto se irradia con luz Ultravioleta mediante una lámpara o transiluminador, se cortan las bandas que interesan por tamaño y se introducen en un eppendorf.

Electrolución de DNA. Para la elución del DNA se siguieron las instrucciones de los fabricantes del *Sephaglas Band Kit* (Farmacia). El Kit especial de filtración unen DNA por uniones electrostáticas.

Obtención de Células Competentes de *Escherichiacoli*.

Se empleó el método de Mandel y Higa (1970), citado por Mendoza del Cueto (2002).

1. Se preparó un preinóculo sembrando una colonia en 2 ml de LB, suplementado con el antibiótico correspondiente, e incubar a 37°C con agitación durante toda la noche.
2. Se inoculó 10 ml de LB, en matraz de 250 ml, (dilución 1:25). Crecer a 37°C con agitación hasta alcanzar una DO 600 nm entre 0,45 y 0,55.
3. Se dejó enfriar en hielo durante 15 min y luego centrifugar durante 10 min a 10 000 rpm y 4°C .
4. Se eliminó el sobrenadante (trabajar a partir de este momento a temperaturas de $0-4^{\circ}\text{C}$).

5. Se resuspendió las células en una gota del sobrenadante y añadir 20 ml de CaCl₂ 30 mM enfriado en hielo. Incubar 15-20 min en hielo.
6. Se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min y a 4°C. Eliminar el sobrenadante.
7. Se resuspendió el precipitado en 4 ml de CaCl₂ 100 mM y glicerol al 15%, previamente enfriado. Emplear una pipeta para resuspender las células e incubar unos minutos en hielo aumenta la competencia.
8. Se repartió la suspensión de células en alícuotas de 200 µl y congelar inmediatamente en nitrógeno líquido. Conservar a -70°C.

Transformación en Células Competentes de *Escherichiacoli*

1. Se descongeló las células competentes incubándolas en hielo durante 10-15 min.
2. Se añadió no más de 15 µl de DNA, 50 µl de tampón de transformación, previamente enfriado, y se llevó a incubar 25 min en hielo.
3. Inmediatamente se incubó 2 min a 37°C y 10 min a temperatura ambiente.
4. Se añadió 1 ml de LB e incubar durante 1 hora a 37°C con agitación.
5. Luego se procedió sembrar en placas de LB agar, con el antibiótico correspondiente, no más de 100 µl de transformación por placa.

Método de Electroporación para la obtención de mutantes de *Salmonella*

A) Preparación de Células Electrocompetentes

1. Se preparó un preinóculo sembrando una colonia en 3 ml de medio LB e incubando a 37°C en agitación durante toda la noche.
2. En un matraz conteniendo 250 ml de LB con los antibióticos correspondientes se inoculó 250 µl del cultivo anterior.
3. Se incubó el matraz a 37°C y en agitación constante (200 rpm), hasta que se alcanza una DO₆₀₀ de 0,75.
4. Se introdujo el matraz en un baño de hielo durante 10 min. para detener el crecimiento del cultivo (A partir de este paso todo el proceso se debe realizar a 4°C).
5. Se recogió 200 ml del cultivo en las botellas de centrifuga *Beckman* de 250 ml previamente enfriadas, y se centrifugó durante 10 min a 6000 rpm y a 4°C.
6. Con cuidado de no resuspender el sedimento y solo eliminar el sobrenadante, se resuspendió con cuidado con 2 ml de agua estéril previamente enfriada, una vez resuspendido se transvasó la suspensión a una botella más pequeña de 30 ml (también de la casa *Beckman*) previamente enfriada y se centrifugó nuevamente en las condiciones anteriores.
7. Nuevamente se eliminó el sobrenadante, y se resuspendió en 2 ml de agua estéril y enfriada, tras lo cual se centrifugó durante 15 min a 6000 rpm y a 4°C.
8. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 0,2 ml de agua estéril y enfriada para luego trasvasar el cultivo a un Eppendorf enfriado y se centrifugó 1 min a 13 000 rpm.
9. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 250 µl de agua estéril. Se distribuyó en alícuotas de 70 µl a tubos Eppendorf agregando un 20% de glicerol. Mediante un vortex inmediatamente se mezcló homogéneamente y se llevó a conservación a -70°C por tiempo indefinido.

B) Electroporación de *Salmonella*

1. Se incubó las células electrocompetentes en hielo durante 10 min para que se descongelen.
2. Se añadió una cantidad de plásmido entre 2 y 0,5 µl, dependiendo de su concentración y pureza, a los 70 µl de células y transferir la mezcla a una cubeta de electroporación previamente enfriada.
3. A continuación se generó una descarga eléctrica en el electroporador a 2,5 µF, 129 ohmios y 1,5 Kv. El electroporador empleado fue un Electrocell Manipulator 600 fabricado por BTX, San Diego.
4. Inmediatamente se añadió 1 ml de LB a la cubeta y se transfirió la suspensión a un Eppendorf, se agitó 37°C durante una hora. Tras la incubación las células se recogieron por centrifugación y se siembran en medio selectivo.

Obtención de la cepa doble mutante 82139 2CI (*Salmonella enteritidis* curada y con interrupción de genes cromosómicos *dsbA* y *dle*) utilizando Fago P22 mediante el Método de Transducción

Método protocolizado por el laboratorio perteneciente a la línea de investigación de Salmonella

Producción de Fagos

- De un pre inóculo de la cepa *S. enteritidis* 82139 I, a partir de 10ml en caldo LB Km+ en tubo, incubados a 37°C durante o/n con sistema de agitación. Se cogió solo 2.5 ml. (250 μ l) que fueron inoculados en un matraz conteniendo 250 ml. de LB Km+, en una proporción de (1:100).
- Se llevó a incubación a 37°C durante 2 horas por 200 RPM en sistema de aireación y agitación. Se dejó que el inóculo llegue a D.O. de 0,4 aproximadamente en 2 horas específico para *Salmonella enteritidis*.
- Se agregó al Inóculo bacteriano 1 ml del Stook Madre de Fagos. Se dejó incubar a 37°C durante 4 horas a 200 RPM en sistema de aireación agitación.
- Terminado el tiempo se detuvo el proceso y agregar 1 ml de Cloroformo.
- Se centrifugó a 3000 RPM durante 35 minutos. E inmediatamente se procedió a recoger 10 ml de sobrenadante y se filtró empleando filtro para bacterias y guardar a 4°C. Este proceso también es empleado en Titulación de Fagos Frescos (virus que transfieren genes Hasta 1% del genoma bacteriano, que por error o al azar entra a la cápside del virus). Para Transducción se requiere de más de 10¹⁰ UFP / mL. Se recomienda el uso de concentraciones de 10¹¹ UFP / 10mL.

Titulación de Fagos a partir de lisados

- A partir de un Stock de FAGOS FRESCOS de Fagos P22 se sembró unos 100 ul (0.1mL) de un cultivo saturado de la estirpe indicadora, se preparó las respectivas diluciones de 10⁻¹ hasta 10⁻⁹ y se sembró de cada dilución 10 ul por el Método de la gota en una placa de LB conteniendo el antibiótico necesario que previamente se había sembrado por el método de superficie el cultivo bacteriano (*Salmonella enteritidis* 81239 I Km+).
- Se dejó incubar a 37°C durante 16 horas (o/n).
- Se realizó el recuento de placas líticas formada en cada gota sembrada, tomando en cuenta la respectiva dilución empleada y que la concentración óptima para infecciones es de concentraciones entre 10⁹ a 10¹⁰ UFP/ml. Cada placa se origina a partir de una única partícula viral presente en la mezcla. Y cada partícula viral infecta a una bacteria y desarrolla un ciclo de infección.

Obtención de la cepas dobles mutantes 82139 2CI por el Método de Transducción

PRIMERA FASE

- Se sembró una alícuota de la célula bacteriana 82139 I (estirpe donadora) en un matraz con 25 mL de caldo LB y su marcador molecular (antibiótico) y se dejó incubar a 37°C x 3 h.
- Transcurrido éste tiempo se agregó 500 μ l del Stock Madre de fagos P22 (obtenidos a una concentración de 10⁹ UFP/ ml en el cultivo joven de la cepa 82139 I) y se dejó 4h más en incubación a 37^a y en sistema de aireación agitación a 200 rpm (**proceso lítico**).
- Terminado el tiempo de incubación, se detuvo el proceso agregando 1ml. de cloroformo, se transvasó 10ml. en un tubo y se llevó a centrifugar a 3 000 rpm durante 35 min. Se recogió, filtró y guardó el sobrenadante a 4°C **listo para iniciar la segunda fase no lítica**; también de este procedimiento se puede realizar titulación al Stook de Fagos frescos y conservar como Stock madre joven.

SEGUNDA FASE - TRANSDUCCIÓN DEL DNA

- Paralelo a la primera fase se preparó **un cultivo bacteriano de la cepa receptora** en 3ml. en caldo LB, con el marcador molecular correspondiente para la **cepa 82139 2C**, y se lo dejó en incubación por 3 horas a 37°C en sistema de agitación y aireación. Luego de la incubación se procedió a sembrar la cepa obtenida 82139 2C por el método en superficie en placas (03) con medio sólido LB haciendo uso de bolillas de vidrio. Luego del sembrado las placas fueron llevadas a incubación a 37°C durante o/n (16 horas).
- **De un cultivo de células donadoras 82139 I** se tomó 500 ul y se homogenizó con 500 ul del stook de fagos joven titulado (obtenidas en la primera fase conteniendo 10¹¹UFP/10mL; que fueron obtenidos a partir del mismo cultivo bacteriano 82139 I, bacteria donadora). Y está mezcla se agregó en una placa de LB conteniendo el indicador selectivo "**en forma de cama**", en las placas de 82139 2C hasta conseguir la total distribución homogénea.

- Se dejó durante 1 min de contacto con el medio sólido y luego se procedió a extraer con ayuda de una pipeta el líquido sobrenadante del cultivo. Posteriormente, se deja la placa secar a temperatura ambiente (10 minutos).
- Una vez que la mezcla se haya secado en su totalidad se llevó la placa a incubación a 37°C y durante 16 horas (o/n) y puesta la placa en incubación de forma invertida.

TERCERA FASE: OBTENCION DE MUTANTES

- **Determinación de presencia de transductantes resistentes o inmunes a nuevas infecciones con P22.** Se realizó por selectividad de siembras selectivas en medio verde y conteniendo el antibiótico selectivo. La estrategia utilizada en el presente trabajo experimental fue la selección de transductantes libres de fagos que asegure que el gen transmitido se haya recombinado con el cromosoma bacteriano. La selección se logró sembrando las colonias obtenidas de la transducción en placas conteniendo medio verde para fagos. En este tipo de placas, los pseudolisógenos son de color verde oscuro y las colonias libres de P22 selectivas son de color verde claro.

Existe diferencia de color en el cultivo, el color verde oscuro se debe a la existencia de lisis en las colonias de pseudolisógenos; dicha lisis acidifica la colonia y hace virar el compuesto indicador. Generalmente se necesitan dos o tres siembras sucesivas en placas verdes para detectar aislados libres de fago. Dichos aislados se forman por segregación espontánea de células libres de profago. Se considera que un transductante está "limpio" cuando en el aislamiento correspondiente no aparece ninguna colonia de color verde oscuro, tomando en la totalidad de las placas, colonias de color verde claro.

Las colonias resultantes 82139 2CI doble mutantes se logró utilizando el método descrito en el medio verde conteniendo además el marcador molecular de las mutaciones de su respectivo antibiótico específico; Kanamicina para el gen *dle* y cloramfenicol para *dsbA*. La Técnica resultó 100% efectiva al tipo de mutante esperada. La cepa doble mutante fue determinada inicialmente por el crecimiento en presencia de los dos antibióticos Kanamicina y cloramfenicol y luego por PCR. La cepa fue utilizada en el estudio de la funcionalidad de Dle y su interrelación con DsbA y Dlp, tres proteínas periplasmicas TDOR vía oxidativa.

Secuenciación automatizada del DNA

Para la extracción del DNA plasmídico se utilizó el método de lisis alcalina de Birboim y Doly (1979) citado por Mendoza del Cueto 2002, y modificando por Villanueva L. y R. Rotger (2003) añadiendo RNasa inmediato a solución de lisis I, proceso en frío.

La extracción y amplificación de DNA cromosómico en la doble mutante se logró utilizando la PCR convencional llamada **PCR Star**, que permite la mayor lectura y el reconocimiento de regiones **N** no determinadas de las secuencias nucleotídicas del gen en estudio.

Para la extracción del DNA se utilizó el método de lisis alcalina de Birboim y Doly (1979) citado por Mendoza del Cueto, 2002, tratado con RNasa inmediato a la solución de lisis I.

La secuenciación automática tipo enzimático se realizó en el secuenciador *A.L.F. DNA sequencer* de la casa comercial Pharmacia LKB. Luego se procedió al estudio de su secuenciación y a la comprobación de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas.

Amplificación de DNA mediante P.C.R.Star

Se utilizó la técnica de PCR convencional modificada utilizada en la Línea de Investigación de *Salmonella* para estudios de los genes codificadores de proteínas TDOR, llamada reacción en cadena de la polimerasa PCR Star empleando el termociclador Mini Cyclyer TM – MJ Research (Hot Bonnet Heated Lid for the PTC ISO Mini Cyclyer TM). El DNA complementario (DNAc) se logró mediante la preparación de dos Stocks.

Verificación de la obtención de la doble mutante 82139 2C y la triple mutante 82139 2CI obtenida por transducción

a. Diseños de oligos

Se diseñó en el Laboratorio de la Línea de *Salmonella* – Departamento de Microbiología II – Facultad de Farmacia – UCM. Los Primers 1 y 2 para cada gen en estudio con una temperatura Tm no mayor a 64°C.

- Utilización de oligos de *del*.
Ndle: GTGACGATGAATTATGCCCG y *Cdle2*: CTTTATCATCAGTCGGCATCA
- Utilización de oligos de *dsbA*. - diseñados por Mendoza del Cueto, 2002.
NdsbA1 :GGA GAG AGT TGA TCA TGA AAA AG y *CdsbA2*: CAT CTT ATA AAA ACG CCG CTC AG.

b.- Determinación de la cepa 82139 2C y 82139 2CI, utilizando el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando un termociclador Mini Cyclor TM MJ Research.

Tratamientos enzimáticos del DNA requeridos en Clonación

Digestión con endonucleasas de restricción y Ligación de Fragmentos de DNA.

Propuesta de Modelos Biorreactores con fines de Producción de Preinóculos e inóculos de las Cepas Vacunales

- A gran escala, en la producción de pre inóculos bacterianos se propone el uso de un Biorreactor Loop de Circulación Interna, Flujo Invertido con sistema de aireación, con Agitador Hélice y Cortador de Espuma (BLIHC - 11).
- A gran escala, en la producción de los inóculos bacterianos (cepas vacunales) se propone el uso de un Biorreactor Loop de Circulación Interna, con sistema de Agitador Hélice y Cortador de Espuma (BLIHC - 11).

III. RESULTADOS

Ya contando con las cepas de colección pertenecientes al laboratorio de investigación de *Salmonella* del Departamento de Microbiología II - UCM, de la Universidad Complutense de Madrid – España, las que fueron obtenidas a partir de *Salmonella enteritidis* 82139 portadora de plásmido: 82139 I, 82139 2, 82139 C y 82139 2C, se siguieron los estudios con la respectiva construcción de 82139 CI, 82139 2I, 82139 2CI, 82139 pSTB1*dle* y 82139 pSTB1. Se consiguió la construcción de cepas curadas con interrupción génica *dsbA*, denominada *Salmonella enteritidis* 82139 2C y de la cepa 82139 2CI denominada triple mutante, cepa curada y doblemente mutada *dsbA /del* obtenida por transducción génica de la cepa 82139 I en 82139 2C; así como también de cepas complementadas con el gen cromosómico *dle* utilizando vector multicopia denominada 82139 2CI pSTB1*dle* y 82139 2CI pSTB1 (cepa utilizada como control de expresión fenotípica del gen *dle*). Dichas cepas permitieron la comprobación de las respectivas determinaciones de expresión fenotípica de movilidad y de capacidad de invasión bacteriana con respecto al gen en estudio *dle*, *dsbA* y *dlp* presentes en *Salmonella enteritidis*. Se utilizó como cepas controles a 82139 y 82139C, cuya expresión daría un margen de orientación del comportamiento de la cepa nativa virulenta libre de interrupciones génicas. Las cepas fueron obtenidos y seleccionados haciendo uso del Diseño Factorial con fines de elaborar cepas vacunales. Para las respectivas comprobaciones del gen en estudio *dle*, así como de las respectivas mutantes con interrupción génica y complementación génica, se utilizó la ingeniería genética. Se inició con la Estrategia del uso de los Protocolos Moleculares modificado en la presente TESIS con fines de optimización adecuada para el Gn. *Salmonella*. Se procedió al estudio con la obtención del gen *dle* en la cepa de *Salmonella enteritidis* 82139 C utilizando la Técnica de PCR Star. Para la verificación de secuenciación del gen aislado por PCR se insertó el gen *dle* en un vector multicopia y se procedió a clonarlo en *E. coli* 5DH α (bacteria comercial competente para clonación) utilizando el procedimiento de clonación por Transformación y por la técnica de Tratamiento térmico para su obtención a mayor escala Izquierdo M. 2001; Hanahan D, 1985; Casadesús J, 1995. Para éste último objetivo se procedió a realizar cultivos de *E. coli* 5DH α en medio caldo Luria Bertoni (LB) conteniendo el gen *dle* y luego del proceso de incubación se procedió a aislar los plásmidos por la técnica de Miniprés, técnica rápida y utilizada en un inicio para su pronta verificación y selección de clones (Kang J. *et al*, 2001; Mendoza del Cueto, 2002). Verificado los clones se procedió su extracción plasmídica por la Técnica de Maxiprés, obteniéndose un gen altamente purificado. Para la obtención de su concentración adecuada se decidió la técnica de Elución del gen utilizando un Kit comercial. Este constructo, el vector conteniendo en su zona de inserción o llamado zona clonación el gen *dle* en estudio posteriormente se procedió a la clonación en la cepa 82139 2 con la obtención

de la cepa 82139 2I. Para la obtención de la cepa 82139 2CI se logró por otra técnica de Recombinación génica por Transducción, utilizando la cepa 82139 I en la cepa 821392C.

Para la verificación del gen en la cepa complementada 82139 2CI con *dle* se procedió su verificación del gen en el constructo del vector multicopia recurriendo a la técnica molecular de extracción del gen por la Técnica de Extracción de plásmido Maxiprés y a la técnica de elución de DNA para la obtención de un DNA purificado y concentrado, requisito para la secuenciación del gen posiblemente funcional. Este Plásmido fue llevado a secuenciar para su verificación del vector conteniendo en su zona de inserción o clonación al DNA exógeno *dle*(Fig. 1, 2, 3, 4, 5, 6).

En una cepa silvestre (nativa) 82139 se clonó por el Método de Electroporación el vector portador del constructo *dle::Kam* (extraído por el método maxiprés) obteniendo la cepa doble mutante 82139 I.

En la cepa 82139 C (cepa curada, libre de plásmido) se clonó por el Método de Electroporación el vector portador del constructo *dsbA::Clm* (extraído por el método maxiprés) obteniendo la cepa doble mutante 82139 2C. Cepa doble mutante con interrupción del gen *dsbA* y en ausencia de *dlp*.

Utilizando la cepa 82139 I (previo a la tesis) y la cepa 82139 2C se procedió por el procedimiento de Transducción génica utilizando el fago P22 específico para el Gn. *Salmonella* para la obtención de la cepa triple mutante 82139 2CI. Al igual se utilizó la cepa 82139 I en 82139 2 para la obtención de la cepa 82139 2I. Para su verificación de la triple mutante se procedió al sembrado y aislamiento de la cepa en medio verde para fagos conteniendo el antibiótico marcador Kanamicina que determina la presencia del nuevo gen *dle* inactivo (*dle::Kam*) en la cepa 82139 2C la que fue sembrada tres veces consecutivamente cultivos jóvenes, hasta obtener el cultivo libre del fago P22.

El estudio del gen funcional *dle* se logró utilizando las cepas 82139, 82139 2C, 82139 2CI, 28139C comparando e interrelacionando la actividad de Dle con DsbA y Dlp por ausencia de los genes codificadores por efecto de inactivación génica (mutación). También se procedió a verificar la función del gen *del* por presencia del gen codificador de la enzima TDOR Dle, utilizando la estrategia de complementación génica (significa la inserción de nuevo del gen *dle*), logrando clonar solo el gen en estudio *dle* en un vector monocopia en una cepa triple mutante 82139 2CI y determinar su funcionalidad por presencia solo del gen en estudio (Fig. 3 y 4).

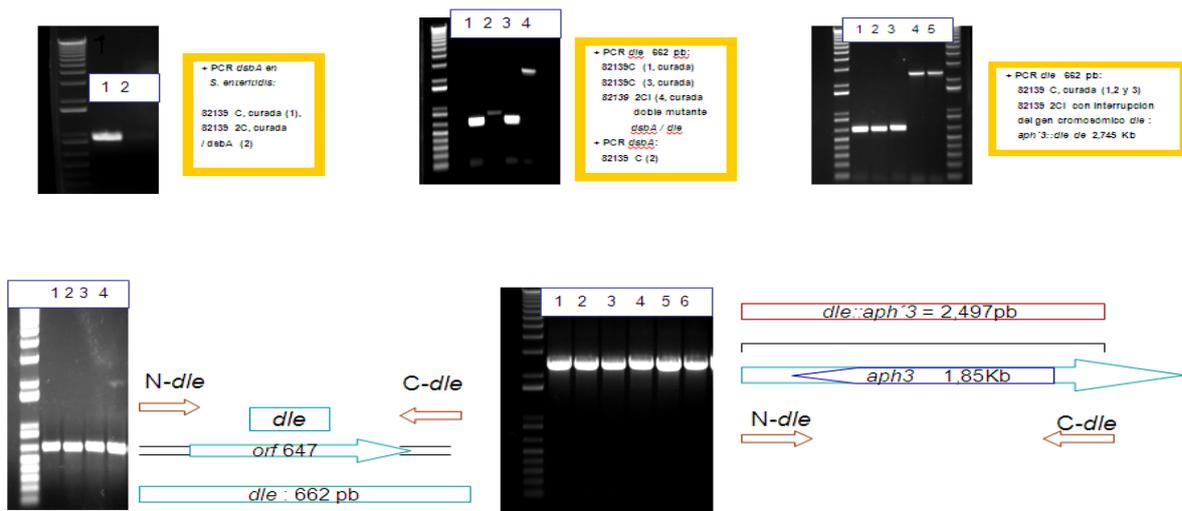


Fig. 1.- PCR comparativo del gen *dle* y *dsbA* en *Salmonella enteritidis* 82139 C y 82139 2CI

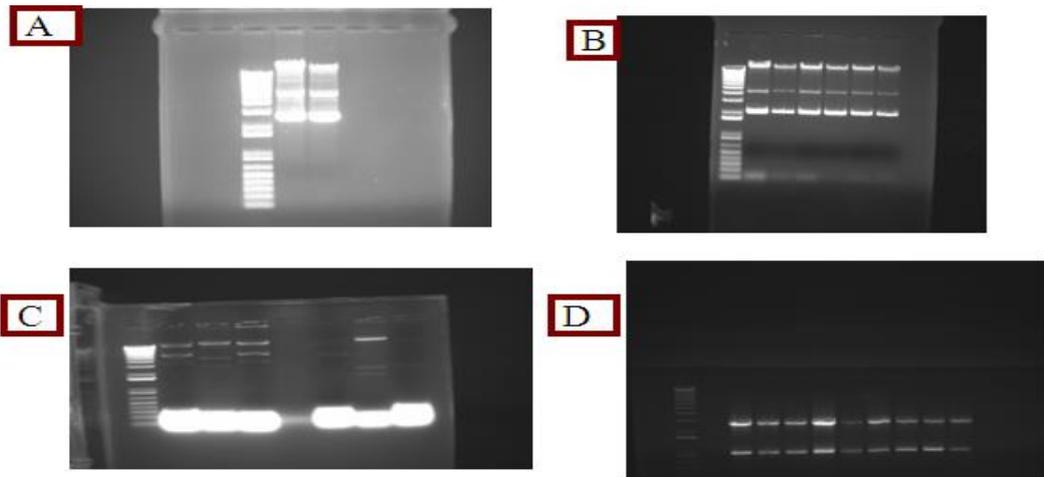
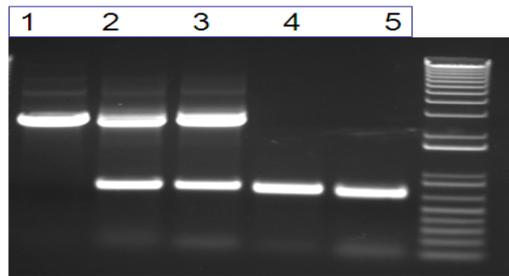


Fig. 2.- Verificación de Clonación del gen *dle*: A) Extracción del Vector monocopia extraído por la Técnica de Miniprés B) Extracción del Vector monocopia por la técnica de extracción de plásmido por Maxiprés C) Verificación por corrido electroforético del vector monocopia y de clones D) Verificación de clones y su extracción por la Técnica maxiprés con fines de secuenciación del DNA funcional insertado.



Estrategia de Interrupción génica del gen *dle* en *S. enteritidis* 82139, identificado por PCR:
 82139 2CI (1, cepa curada sin *dle* y doblemente curada *dsbA / dle*),
 82139 I (2 y3, cepa con interrupción *dle*)
 82139 C y 82139 2C (4 y 5, cepas curadas).

Fig. 3.- Comprobación del gen cromosómico *dle* en cepas mutantes : *Salmonella enteritidis* 82139 I, C, 2C y 2CI

Estrategia génica para estudios de complementación del gen cromosómico *dle* en *S. enteritidis* 82139 2CI:

* Extracción plasmídica del vector pSTB1 y de la construcción de pSTB1 *dle* en *E. coli* DH5 α (1 y 2),
 Método de Maxiprés. Y

Obtención de cepa complementada *dle* en 82139 2CI (3, curada y doblemente curada *dsbA / dle*)

Método de Extracción plasmídica por Miniprés

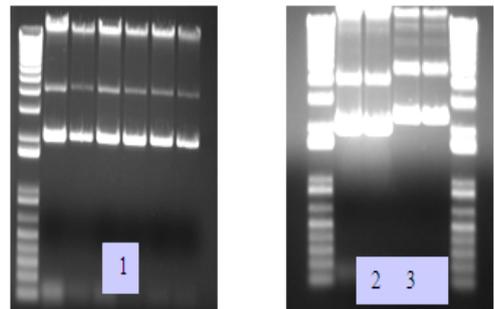


Fig. 4. Comprobación de la complementación del gen cromosómico *dle* en *Salmonella enteritidis* 82139 2CI y su verificación del clon por la Técnica de extracción plasmídica Maxiprés.

Fig. 5. Análisis comparativo de secuencias nucleotídicas que codifican oxidorreductasas en *Salmonella enteritidis* 82139 con respecto a *Salmonella typhi* por Villanueva L. y R. Rotger, 2003.

```

>>dle. -----
>>dlt. ATTCGGAAAATTCATGACCGGAATAATTCOSGCTGCCGGCTTAAAGACCGTCCCGGATGA 60
>>dlp. ATTCGGAAAATTCATGACCGGAATAATTCOSGCTGCCGGCTTAAAGACCAAGCCGGATGA 60
>>dsbA. -----GGCA 4
>>dsbA. -----GGCA 4

>>dle. -----CCTTTCAATCTGTATATCT 19
>>dlt. ATTAAGATTTACTGCTGCTGTCAGGCGGTACCGTTAAGCGGCTTTCAATCTGTATATCT 120
>>dlp. ATTAATATTTACTGTTGCTGTCAGGTGGTGTGTTAATCGGT-TTTTGTCTGTATATCT 119
>>dsbA. GCGACAGACAACGACTTTTATGAGCAGACTAAAATTTTGCACGAAACCCCTTACAAAT 64
>>dsbA. GCGACAGACAACGACTTTTATTGAGCAGACTAAAATTTTGCACGAAACCCCTTACAAAT 64
* * * * *

>>dle. GTTATCCATGGAGTGTTTCOGTGAAGATGAAATTAAGCCGGGAGCTGTTTTCCCTGAGGG 79
>>dlt. GTTATCCATGGAGTGTTTCOGTGAAGATGAAATTAAGCCGGGAGCTGTTTTCCCTGAGGG 180
>>dlp. GTTATCCATGGAGTGTTTCOGTGAAGATGAAATTAAGCCGGGAGCTGTTTTCCCTGAGGG 179
>>dsbA. AACGCCAATGTATTAAT-CGGAGAGAGTTGATCATGAAAAAGATTTGGCTGGCCCTGGCT 123
>>dsbA. AACGCCAATGTATTAAT-CGGAGAGAGTTGATCATGAAAAAGATTTGGCTGGCCCTGGCT 123
* * * * *

>>dle. GAATATTATTTTCTTTTTT---TTACCTGGCTGGCCCGTCTGTGATTGGCAGGAGT 136
>>dlt. GAATATTATTTTCTTTTTT---TTACCTGGCCGGCCCGTCTGTGATTGGCAGGAGT 237
>>dlp. GAATATTATGTTCTCTTTGGCTGTGTGTTTGTGTCACGCCCTGCTGTGACAGGAGT 239
>>dsbA. GG-TATGGTTTTAGCTTTTA--GCGCCTCGGCAGCACA-GATCAGCGACGGTA-AACAGT 178
>>dsbA. GG-TATGGTTTTAGCTTTTA--GCGCCTCGGCAGCACA-GATCAGCGACGGTA-AACAGT 178
* * * * *

>>dle. GGGAGTTTCATAACGCCCTTGGTGGCTGATGCCCCCGCCAGGTGGAACTATTTTCCITTT 196
>>dlt. GGGAGTTTCATAACCTCCCTTGGTGGCTGATGCCCCCGCCAGGTGGAACTATTTTCCITTT 297
>>dlp. GGGAGTTTCATAACGCCCTCCGCTGGCTGATGCCCCCGCTGTGGTGGAGTCTTTTCCITTT 299
>>dsbA. ATATCAGCTGGATAAACCCGCTGCTGGCGAACCCAGGTACTGGAGTTTTTCTCCTTCT 238
>>dsbA. ATATCAGCTGGATAAAAACCCGCTGCTGGCGAACCCAGGTACTGGAGTTTTTCTCATTCT 238
* * * * *

>>dle. ACTGTCGCCCTGCTATGCGTCTCACAGACGATGGGCGTGGCCCAAGGCCATCCGGCACG 256
>>dlt. ACTGTCGCCCTGCTATGCGTCTCACAGACGATGGGCGTGGCCCGGGCCAACCGGCACG 357
>>dlp. ACTGTCGCCCTGCTATGCGTCTCACAGACAAATGGGCGTGGACCAAGGCCATCCGGCACG 359
>>dsbA. ACTGTCGCCAATGTTATCAGTTGAAAGAAAGTTCATGTCCTGACAAATGTGAAGAAA 298
>>dsbA. ACTGTCGCCAATGTTATCAGTTGAAAGAAAGTTCATGTCCTGACAAATGTGAAGAAA 298
* * * * *

>>dle. TACTGCCGCAAGGTGACCGGATGATCAAGTACCAATGTCACCTGCTGGGCCCCCTCGGCC 316
>>dlt. TACTGCCGCAAGGTGACCGGATGATCAAGTACCAATGTCACCTGCTGGGCCCCCTCGGCC 417
>>dlp. TACTGCCGCAAGGTGACCGGATGATCAAGTACCAATGTCACCTGCTGGGCCCCCTCGGCC 419
>>dsbA. AGCTGCCGCAAGGCCACCAAGTGAACCAAGTACCAAGTTCAGTTTCTGGGCCSTTGGGCA 358
>>dsbA. AGCTGCCGCAAGGCCACCAAGTGAACCAAGTACCAAGTTCAGTTTCTGGGCCSTTGGGCA 358

* * * * *

>>dle. ATGAGCTGACACCGGCCAGGGCCCTGGCCATGATGATGAGGAACTGACGTGGTGGAGA 376
>>dlt. ATGAGCTGACACAGCCCTGGGCCCTGGCCATGATGATGAGGAACTGACGTGGTGGAGA 477
>>dlp. ATGAGCTGACACCGGCCCTGGGCCCTGGCCATGATGATGAGGAACTGACGTGGTGGAGA 479
>>dsbA. AGGAGCTCACCCAGCCATGGCCGCTGGCCATGGCTGATGAGGAACTGACGTGGTGGAGA 418
>>dsbA. AGGAGCTCACCCAGCCATGGCCGCTGGCCATGGCTGATGAGGAACTGACGTGGTGGAGA 418
* * * * *

```

```

>>dle.      AGGCCTTCTTCATGCCCC-ACATGGTGGAGAAAAGCCTGCATTCCCGGACGATGTCCAT 435
>>dlt.      AGGCCTTCTTCACGCCCC-ACATGGTGGAGAAAAGCCTGCATTCCCGGACGATGTCCGT 536
>>dlp.      AGGCCTTCTTCACGCCCC-GCATGGTCGAGAAAAGCCTGCATTCCCGGACGATGTCCGC 538
>>dsbA.     TCCCGCTGTTTGAAGCCGTACAGAAAACCCAGACAG-TACAATCTGCCCGGATATCCGT 477
>>dsbA.     TCCCGCTGTTTGAAGCCGTACAGAAAACCCAGACAG-TACAATCTGCCCGGATATCCGT 477
            * * * * *
>>dle.      CGGGTGTTTATGCTGCCCCCGGTATCAGTCGCGGGGAGTATGACAGAAGTATAAAA-AG 494
>>dlt.      CGGGTGTTTATGCTGCTACCGGTATCAGTCGCGGGGAGTATGACAGAAGTATAAAA-AG 595
>>dlp.      CGGGTGTTTATGCTGCCCCCGGTATCAGTCGCGGGGAGTATGACAGAAGTATAAAA-AG 597
>>dsbA.     AAAGTGTTCGT---TGATGCGGGCGTCAAGGCGAAGATTACGAT-GCGGCATGGAACAG 533
>>dsbA.     AAAGTGTTCGT---TGATGCGGGCGTAAAGGCGAAGATTACGAT-GCGGCATGGAACAG 533
            * * * * *
>>dle.      TCCCGCCGTGAATGACATGGTGGCATTACAGGA-ACGGTGTTTAAGGAATATGGCGTGA 553
>>dlt.      TCCCGCCGTGAATGACATGGTGGCATTACAGGA-ACGGTGTTTAAGGAATATGGCGTGA 654
>>dlp.      TCCCGCCGTGAATGACATGGTGGCATTACAGGA-ACGGTGTTTAAGGAATATGGCGTGA 656
>>dsbA.     CTTCTGGTGAATCACTGGTTGCGCAACAGGAGAAAGCCCGGCTGACTTGCAAC-TGC 592
>>dsbA.     CTTCTGGTGAATCACTGGTTGCGCAACAGGAGAAAGCCCGGCTGACTTGCAAC-TGC 592
            * * * * *
>>dle.      GGGGACGCCCTTCCGTGTA TGTCGCTGCGCGTTACCACATCAACAA TGCCGCTTCAGCG 613
>>dlt.      GGGGACGCCCTTCCGTGTA TGTCGCTGCGCGTTACCACATCAACAA TGCCGCTTCAGCG 714
>>dlp.      GGGGACGCCCTTCCGTGTA TGTCGCTGCGCGTTACCACATCAACAA TGCCGCTTCAGCG 716
>>dsbA.     AGGGCGTTCGCGCGATGTTCTGCAATGGCAAATACCAGATTAAACCAAGGCATGGATA 652
>>dsbA.     AGGGCGTTCGCGCGATGTTCTGCAATGGCAAATACCAGATTAAACCAAGGCATGGATA 652
            * * * * *
>>dle.      CATTCTCGTCCGAAAGATTTCAGGAGCCGTTATGCTGCGGTGGTCCGAAAATGCTGGCCG 673
>>dlt.      CATTCTCGTCCGAAAGATTTCAGGAGCCGTTATGCTGCGGTGGTCCGAAAATGCTGGCCG 774
>>dlp.      CATTCTCGTCCGAAAGATTTCAGGAGCCGTTATGCTGCGGTGGTCCGAAAATGCTGGCCG 776
>>dsbA.     CCAGCAGCATGGATGTTTTGTTTCAGCAGTATGCTGATACCGT---GAAATATTTGGTTG 709
>>dsbA.     CCAGCAGCATGGATGTTTTGTTTCAGCAGTATGCTGATACCGT---GAAATATTTGGTTG 709
            * * * * *
>>dle.      GTAAACCTGATGCCGACTGATGATAAAG----- 701
>>dlt.      GTAAACCTGATGCCGACTGATGATAAAGGCCACCAATACAGGCCGAGATATCCCCCGCTC 834
>>dlp.      GTAAACCTGATGCCGACTGATGATAAAGGCCACCAATACAGGCCGAGATATCCTCCGCTC 836
>>dsbA.     ATAAAAAATAAAAAAAGCAGCCGCTCACTGACCGCGTTTTTATAAGATGTTTTAAT-CTC 768
>>dsbA.     ATAAAAAATAAAAAAAGCAGCCGCTCACTGACCGCGTTTTTATAAGATGTTTTAAT-CTC 768
            * * * * *
>>dle.      -----
>>dlt.      CCGCGCTGATTCTCCTGCTGCTGACCAGCGTCTTATCTCGGCTTTCTGACCGGCTC 894
>>dlp.      CCGCGCTGATTCTCCTGCTGCTGACCAGCGTCTTATCTCGGCTTTCTGACCGGCTC 896
>>dsbA.     TTCTATCTG----- 777
>>dsbA.     TTCTATCTG----- 777
>>dle.      -----
>>dlt.      TTGGCCA TGCTCTGGCTTATCTGCGTGGGGC 926
>>dlp.      CTGGCCA TGCTCTGGCTTATCTGCGTGGGGC 928
>>dsbA.     -----
>>dsbA.     -----

```

Nota:

Se utilizó el programa bioinformático brindado por el NCBI, Centro Nacional e Internacional Bioinformático de Referencias de secuencias de genomas y proteomas del Banco de Mapeo genómico y proteómico de células eucarióticas y procarióticas. Y se determinó lo siguiente:

dlt y *dle* presentan homología con *orf8* (*srgA*, *dlp*) en un 90%.

dle presenta un 52,64% con respecto a *dsbA* de *S. enteritidis* 366 y en un 52,7% con respecto a *dltde* *S. typhi* (presentado por Mendoza del Cueto, 2002; corroborado los datos en *Salmonella enteritidis* 82139 portadora de plásmido por Villanueva L. y R. Rotger, 2003; investigadores pertenecientes a la Línea de *Salmonella* de la UCM-España).

Fig 6. Análisis comparativo de secuencias aminoácidas en proteínas oxidorreductasas entre *salmonella enteritidis* 82139 y *salmonella typhi* por villanueva l. y r. rotger, 2003.

```

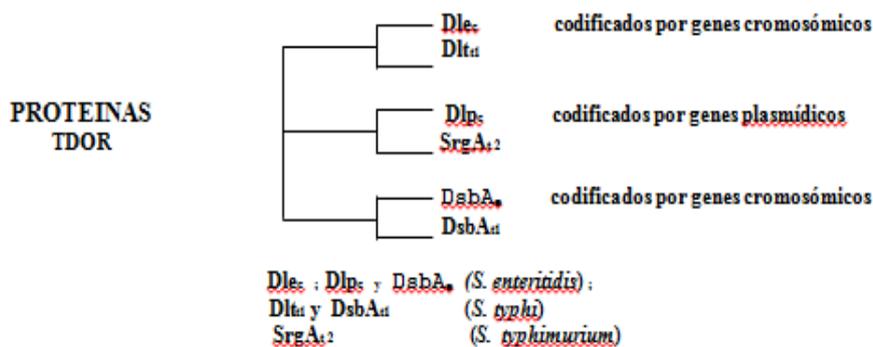
>>Dle.      --MNYARELFFLRGILFS--FFLPGCARPVIAQEWEFITPLVADAPAEVELFSFYCPPCYA 57
>>Dlt.      MTMNYARELFFLRGILFS--FFLPGRARPVIAQEWEFITPLVADAPAEVELFFFYCPPCYA 59
>>Dlp.      --MNYARNLYSLHGILCSSLLLFCCARPAVAQEWESITPEVADAPAVVEFFSFYCPPCYA 58
>>DsbA.     ----MKKIWLALAGMVLV--FSASAAQISDGKQYITLDKPVAGEPQVLEFFSFYCPHCYQ 54
>>DsbA.     ----MKKIWLALAGMVLV--FSASAAQISDGKQYITLDKPVAGEPQVLEFFSFYCPHCYQ 54
              :  *  *:: : :  *:  .::: :  **  *  :*: *  ***** **

>>Dle.      FSQTMGVAQAIRHVLPHGDRMIKYHVNLLGPLGHELTRARALAMMKETDVEKAFPMAD 117
>>Dlt.      FSQTMGVARAIRHVLPHGDRMIKYHVSLLGPLGHELTQAWALAMMKETDVEKAFPTAD 119
>>Dlp.      FSQTMGVDQAIRHVLPQGDRMVKYHVSLLGPLGHELTRAWALAMVMEKDVEKAFPMAD 118
>>DsbA.     FEEVLHVSDNVKKKLPETKMTKYHVEFLGPLGKELTQAWAVAMALGVEDKVTVPLFEAV 114
>>DsbA.     FEEVLHVSDNVKKKLPKGTKMTKYHVEFLGPLGKELTQAWAVAMALGVEDKVTVPLFEAV 114
              *::: *  ::: **:*  :*  *****:*****:***: *  *  :* *

>>Dle.      MVEKRLHSPDDVHRVFMSTGISRGEYDRSIKSPAVNDMVALQERLFKEYGVRGTPSVYV 177
>>Dlt.      MVEKRLHSPDDVRRVFMSTGISRGEYDRSIKSPAVNDMVALQERLFKEYGVRGTPSVYV 179
>>Dlp.      MVEKRLHSPDDVHRVFMSTGISRGEYDRSIKSPAVNDMVALQERLFKEYGVRGTPSVYV 178
>>DsbA.     QKTQTVQSAADI RKFVVDAG-VKGEDYDAWNSFVVKSLVAQQEKAAADLQLQGVPPMVF 173
>>DsbA.     QKTQTVQSAADI RKFVVDAG-VKGEDYDAWNSFVVKSLVAQQEKAAADLQLQGVPPMVF 173
              : :*:  *:::***:*  .  .  :**  :  *  .*:::**  **  :  :*:::***

>>Dle.      RGRYHINNAAFSAFVDFRSRYAAVVRKLLAGNADAD 215
>>Dlt.      RGRYHINNAAFGAFVDFRSRYAAVVRKLLAGNPDAD 217
>>Dlp.      RGRYHINNAAFGAFVDFRSRYAAVVRKLLAGNPDAD 216
>>DsbA.     NGKYQINPQGMDTSSMDVVFVQYADTVKYLVDKK---- 207
>>DsbA.     NGKYQINPQGMDTSSMDVVFVQYADTVKYLVDKK---- 207
              .*:***  .::: *  :*  .: **  .*:  *  :
    
```

RELACION HOMOLOGA ENTRE PROTEINAS:



Nota:

Se utilizó el programa Bioinformático brindado por el NCBI, Centro Nacional e Internacional Bioinformático de Referencias de secuencias de genomas y proteomas del Banco de Mapeo genómico y proteómico de células eucarióticas y procarióticas. Y se determinó lo siguiente :

Las proteínas TDOR del sistema Dsb como es DsbA, presentan homología en el centro activo con respecto a Dlp y Dle.

Dle presenta homología en un 32,37% con respecto a DsbA de *S. enteritidis*366 como también en *S. typhi*(Mendoza del Cueto, 2002; corroborado los datos en *Salmonella enteritidis* 81239 portadora de plásmido por Villanueva y Rotger (2003).

IV. DISCUSIÓN

Se utilizó estratégicamente los protocolos genético - molecular en la obtención de cepas vivas atenuadas en su virulencia. Los Protocolos permitieron la construcción de mutantes simples, dobles y triples. Las técnicas de Ingeniería Genética permitió la obtención de estas cepas mutantes que se lograron por recombinación génica: por Transformación (por tratamiento térmico para *E. coli* y por Electroporación para el *Gn. Salmonella*, a éstas células se les llama células competentes, que viene del término de competencia génica cuando se adquiere DNA exógeno y puede llevar a cabo la función de ésta nueva información génica de forma natural) obteniéndose de este modo las cepas 82139 2, 82139 I. Por Curación génica se obtuvo dobles mutantes 82139 2C y por Transducción, cepas triples mutantes como es *Salmonella enteritidis* 82139 2CI. Hacia fines de la década de 1950, Cold Spring Harbor ofreció un curso anual sobre fagos y concurrían numerosos investigadores y lograron éxito en la técnica por realizarlo en un mismo organismo unicelular como son las bacterias. En éste caso el Protocolo se especializó en el *Gn. Salmonella* utilizando el fago P22 que tiene un receptor específico codificado por el *gen5*. Para que el fago sea útil como sistema de experimentación deben aplicarse métodos que propaguen y determinen la cantidad de fagos. Los fagos típicos se propagan cuando proliferan en un huésped bacteriano apropiado primero produce lisis en un medio de cultivo líquido y luego en un cultivo sólido ya no cumple una lisis sino que adopta una vía de desarrollo alternativa denominada lisogenia. En la lisogenia el genoma del fago se integra en el genoma bacteriano en lugar de replicarse y no se expresan los genes de la recubierta. En este estado e inhibido el fago se denomina profago. En cambio de la vía lisogénica a la vía lítica se denomina inducción.

Los protocolos empleados en clonación microbiana fueron modificados con mucha precisión, se lograron solo con el primer ensayo en los tres primeros meses de experimentación (Fig 1, 2, 3, 4, 5, 6), la eficiencia se debe a que cada procedimiento o cada Protocolo se trabajó con mucho requerimiento en pureza y en concentraciones adecuadas¹⁹. La actividad del gen *dle* se llevó a cabo por dos Estrategias génicas : Por Inactivación génica (Fig 3) y por Complementación génica (Fig4). La Ingeniería genética realizada logró el perfecto aislamiento y secuenciación del gen en estudio *del* (Fig5 y 6) y de la verificación de los genes *dsbA* y *dlp*. La Estrategia permitió la obtención de posibles cepas vacunales.

Se utilizó estratégicamente los protocolos genético – molecular en la obtención de cepas mutantes vivas atenuadas a virulentas. Se utilizó el Diseño Factorial en la selección de los diferentes diseños de mutaciones de cepas simples, dobles y triples que permitieran el estudio funcional de los genes *dsbA*, *dlp* y *dle* codificadores de proteínas periplásmicas TDOR vía oxidativa con la determinación del análisis estadístico de Diferencia Mínima Significativa en la determinaciones de funciones como movilidad, capacidad invasiva y fosfatasa alcalina. El Diseño Factorial puede ser recomendado su uso para muchas determinaciones de funciones génicas.

Tanto el clonaje como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son dos métodos distintos de amplificación de secuencias. A diferencia que la PCR solo amplifica DNA complementario y en el clonaje tiene la ventaja de que las bacterias pueden determinarse su expresión fenotípica. Clonación del DNA en bacterias, es el proceso típico del empleo de vectores que aporta información necesaria para propagar el DNA clonado hacia la célula y un inserto de DNA que se introduce dentro del vector y presenta el DNA en cuestión. Existe vectores monocopia que es utilizado cuando se quiere realizar estudios de análisis funcional de genomas y también existen, los vectores multicopia que son utilizados cuando solo se requieren reproducir el DNA exógeno, por ejemplo con fines de secuenciación (Fig. 3, 4, 5). También se requirió para la validación de los estudios de análisis funcional génica de Secuenciación Automatizada.

En un inicio sólo se conocía a DsbA como proteína líder de las TDOR, la característica de esta propiedad se debe a la zona B de su secuencia aminoacídica, el que permite el reconocimiento de diferentes y para muchos sustratos; sin embargo su ventaja TDOR también se debería a su aminoácido interno del centro catalizador de la proteína: la histidina, que funciona como un catalizador / acelerador aminoacídico específico único presente en el centro activo que facilita la rápida y reversibilidad de oxidarse y reducirse, ventaja con respecto a la proteína TDOR en estudio como es Dle, esta última proteína presenta la desventaja de contener dentro del centro activo dos aminoácidos internos: dos prolinas. La actividad de la Histidina también se ve favorecida por la

osmolaridad del medio del cultivo de los ensayos dadas en condiciones fisiológicas *in vitro* semejantes a las de *in vivo*. *Salmonella* internalizada en la célula huésped normalmente dentro de la vacuola libera proteínas con su inyector de proteínas de virulencia que acidifican el medio y que impiden la unión de la vacuola y el lisosoma y escapan a la respuesta inmune.

Con respecto a la Familia de proteínas TDOR, la actividad de las enzimas isomerasas de puentes disulfuro, en particular DsbA, es necesaria para la correcta secreción de diversas proteínas implicadas en virulencia, entre las que se encuentran toxinas (de *Vibrio cholerae* y *E. coli*) (Edward y col, 1995), adhesinas (de *E. coli*) (Dailey y Berg, 1992; Hong-Zhong Zhang y Donnenberg, 1996; Fetrow y col, 1998) y factores de invasión (de *Shigella* y *Yersinia*) (Watari y col, 1995; Yu, 1998; Jackson y Plano, 1999), citados en Mendoza del Cueto (2002). A pesar de la similitud que existe entre algunos factores de virulencia de *Salmonella* y los de *Shigella* y *Yersinia*, no se ha demostrado hasta el momento la implicación específica de DsbA en la virulencia de *Salmonella*, aunque si se ha logrado observar que la mutación *dsbA* reduce la invasividad de células epiteliales y la supervivencia en macrófagos de *S. typhi* y *S. enteritidis* (Mendoza del Cueto, 2002). El análisis proteómico del mutante *dsbA* de *S. typhi* y su comparación con su cepa parental no han permitido detectar la alteración de ningún factor de virulencia conocido, aparte del aparato flagelar (Agudo *et al.*, 2004). Sin embargo, también han determinado que los niveles de expresión de algunas proteínas implicadas en invasión a nivel "*in vitro*" son lo bastante bajo para no detectarse con tinción de plata en geles de electroforesis, no habiéndose identificado aún todas las proteínas separadas por electroforesis dimensional en el citado estudio. La ausencia de flagelos en los mutantes *dsbA* ya se había descrito, y su efecto en los ensayos de invasión se había tratado de minimizar mediante la centrifugación de las bacterias sobre la monocapa celular (Mendoza del Cueto, 2002).

La Línea de *Salmonella* de la UCM – Madrid inicialmente observó que en ensayos de invasión bacteriana se presenta una deficiencia en el mutante *dlt* de *S. typhi* para invadir células Henle-, evidente a las dos y tres horas de la infección, y no tan marcada como la provocada por la mutación *dsbA*. Este resultado es sorprendente porque la proteína Dlt no complementa la deficiencia en DsbA, pese a su elevada homología con Dlp que sí tiene función en invasión bacteriana en células huésped. Atribuyéndosele a ésta falta de actividad de Dlt a su incapacidad para alcanzar el periplasma (Rodríguez-Peña *et al.*, 1997). Siendo Dlt proteína homóloga a Dle (presente en *S. enteritidis*) se decidió como pioneros de la clonación del gen *dle*, explorar las funciones de Dle, codificada por el alelo cromosómico de *dlp* en *S. enteritidis* 82139 como motivo del estudio en la presente Tesis y de la construcción de las cepas mutantes.

Luego de la construcción de cepas simples, dobles y triples mutantes, se procedió a la verificación *in vitro* del efecto de las cepas vivas atenuadas avirulentas siguiendo una estrategia en el Protocolo celular. En un inicio encargado de obtener y verificar la actividad del gen *dle* por ensayos celulares, específicamente por infecciones en líneas celulares de mamíferos usando las líneas celulares Henle 407 y MDCK en la infección con *Salmonella enteritidis* 82139. El presente Proyecto no solo logró presentar el estudio de toda la Familia TDOR vía oxidativa de *Salmonella enteritidis*, sino del posible logro de cepas vacunales vivas atenuadas en su virulencia como son: la cepa 82139 2C y la cepa 82139 2CI.

V. CONCLUSIONES

1. Se logró una Estrategia de Protocolos Moleculares que permiten la obtención de cepas vivas atenuadas en su virulencia de ***Salmonella enteritidis*** 82139, como modelo de Elaboración de Vacunas y la Propuesta de Tipos de biorreactores con fines de su Producción.
2. Se logró la construcción de la cepa doble mutante ***S. enteritidis*** 82139 2 C carente de los genes *dsbA* y *dlp* codificadores de las proteínas TDOR DsbA y Dlp determinantes de la virulencia e invasión bacteriana.
3. Se logró la obtención de una cepa con mutación *dle*, en un fondo genético doble mutante *dsbAdlp*, la cepa obtenida triple mutante ***S. enteritidis*** 82139 2CI, logró el estudio de la actividad del gen por efecto de inactivación por interrupción génica, en ausencia del gen. Y la cepa de *Salmonella enteritidis* 82139 2CI *pSTB1::dle*, cepa repuesto el gen en estudio por

- complementación génica, es decir en presencia solo del gen *dle*, es otra forma estratégica empleada en el análisis del funcionamiento del gen.
4. Se han definido las condiciones adecuadas para realizar ensayos reproducibles de infección por ***S. enteritidis*** en lo referente al cultivo bacteriano tanto de la cepa silvestre como de las mutantes, determinándose la utilización de preinóculos en fase logarítmica e inóculos en fase logarítmica tardía y en caldo Luria Bertoni (LB) conteniendo una osmolaridad final de 0,3mM de NaCl, inductor de la actividad TDOR vía oxidativa.
 5. El éxito de la obtención de cepas de uso posible como cepas vacunales doble y triple mutante 82139 2C y 82139 2CI respectivamente, fue lograda por la exigencia, eficiencia y eficacia de los Protocolos Genético – Molecular, puestas a punto de acuerdo a las exigencias como bacteria y como colonia al utilizar el género ***Salmonella***.
 6. El trabajo establece las bases para proponer el Protocolo Celular para el estudio *in vitro* de infecciones bacterianas en líneas celulares y de las pruebas adicionales *in vivo* que confirmen el uso como cepa vacunal.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CASADESÚS J.; 1995. **Microbiología y genética molecular. Tomo I y Tomo II.** Edic II. Universidad de Huelva III. España.
- DOUGLAS C. 1991. **Diseño y Análisis de Experimentos.** 1 Edic. Edit. Iberoamericana S. A. de C. V. México D.F. México.
- DONGXIA L.; V. Christopher y J. Slauch 2008. The Salmonella SPI1 Type Three Secretion System Responds to Periplasmic Disulfide Bond Status via the Flagellar Apparatus and the Rcs CDB System. *Journal of Bacteriology.* Jan 2008. P. 87-97. American Society for Microbiology.
- GALLANT C.; T. Ponnampalam; H. Spencer; J. Hinton y N. Martín. 2004. H-NS Represses *Salmonella enteric* Serovar Typhimurium *dsbA* Expression during Exponential Growth. *Journal of Bacteriology.* Feb. 2004, p. 910-918. American Society for Microbiology.
- HERAS B.; M. Totsika; R. Jarrott; R. Shouldice; G. Guncar; S. Achard; J. Wells; P. Argente; McEwan and M. Schembri. 2010. Structural and Functional Characterization of Three DsbA Paralogues from *Salmonella enteric* Serovar Typhimurium. June 11, 2010. Volume 285. N°24.
- HERNÁNDEZ S, C. Fernández; L. Baptista. 1999. **Metodología de la Investigación.** 2da. Edic. Editorial Mc GRAW – HILL. México D.F. México.
- HANAHAN, D. 1985. Techniques for transformation of *E. Coli*. En: Glover, D. M. (ed) DNA cloning. IRL PRESS. Oxford, England. Pp. 120.
- IZQUIERDO M. 2001. **Ingeniería Genética y Transferencia Génica.** Ediciones Pirámide Grupo Anaya S.A. Madrid España. pp. 341.
- JIMÉNEZ S.; Jiménez J. 1998. **Genética Microbiana.** Editorial Síntesis. España.
- KANG J.; Kwon A.; Choi E. 2001. Cloning and sequencing of the *astA* gene encoding arylsulfotransferase from *Salmonella typhimurium*. *Biol Pharm Bull.* 24: 570 – 4.
- KOREAKI – Ito; Keinji – Inaba. 2008. The disulfide bond formation (Dsb) system. *ELSEVIER. Structural Biology* 2008. 18:450-458.
- MEDINA M.; Sánchez de Medina F.; Vargas A. 1996. **Bioquímica.** Editorial Síntesis S.A. España.
- MENDOZA DEL CUETO, 2002. Tesis Doctoral: Clonación del gen *dsbA* de *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis* Y caracterización del fenotipo resultante de su inactivación. Universidad Complutense de Madrid – Facultad de Farmacia – Departamento de Microbiología II: Laboratorio de Microbiología Clínica Molecular . España.
- PEREA E. 1992. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Vol. I y II.** Edic. DOYMA – Barcelona – España.
- ROTGER, R.; Rodríguez – Peña J.; Buisán M.; Ibáñez M. 1995. Genética de la virulencia de *Salmonella*. *Microbiología y Genética Molecular.* Tomo I: 13 – 27.

- ROTGER, R.; Casadesús J. 1999. The virulence plasmid of *Salmonella*. Internatl. Microbiol. Vol.2: 177 – 184.
- SANCHEZ - Jimenez, M.; Cardona – Castro N. 2003. Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. Instituto Colombiano de Medicina Tropical – Asociación Colombiana de Infectología. Medellín - Colombia.Vol 7 – 1
- TORTORA G.; Burdell F.; Case Ch. 1993. **Introducción a la Microbiología**. Editorial Acribia S.A. Zaragoza – España.
- TSUYOSHIM, Okada N.; Hirofumi D. 2004. Two periplasmic Disulfide Oxidoreductases, DsbA and SrgA, Target Outer Membrane Protein SpiA, a Component of the *Salmonella* Pathogenicity Island 2 Type III Secretion System. The Journal of Biological Chemistry.American Society for Biochemistry and Molecular Biology. May 28. 2004. Vol. 279. N°33.Issue of August 13. Pp. 34631-34642, 2004.Printed in USA.
- VILLANUEVA L. y R. Rotger, 2003. Tesis Doctoral - DEA: Efectos de la Inactivación y Complementación del gen *dle* de *Salmonella enteritidis*. Universidad Complutense de Madrid – Facultad de Farmacia – Departamento de Microbiología II: Laboratorio de Microbiología Clínica Molecular . España.
- WATSON J.; Baker T.; Bell S.; Gann A., Levine M.; Losick R. 2008. **Biología Molecular del Gen**. 5° Edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Madrid -España. pp 776.
- ZHENG W.; Quan H.; Song J.; Yang S.; Wang Ch. 1997. Does DsbA have chaperone – like activity?. Archives of Biochemistry and Biophysics 337: 326 – 331.