

Protocolo celular para ensayos *in vitro* utilizando cepas atenuadas de *Salmonella entérica* Serotipo Enteritidis 82139

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

¹ Laboratorio de Microbiología Molecular Universidad Complutense de Madrid. España.

² Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
liliana_villanueva_alva@hotmail.com (044-222931 / 221607); r_bel_orbe@hotmail.com (949938768)

RESUMEN

Se propone un protocolo celular para determinar la capacidad de movilidad y de la invasión bacteriana intracelular de cepas vivas atenuadas en su virulencia, construidas a partir de *Salmonella entérica* Serotipo Enteritidis 82139 portadora de plásmido (*S. enteritidis* 82139). Las cepas obtenidas fueron: 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 de *dle*:82139 2CI pSTB1*dle* y 82139 pSTB1. Se usó el Diseño Factorial para seleccionar y construir las cepas mutantes así como para determinar la Diferencia Mínima Significativa de la función génica de *dsbA*, *dle* y *dlp* en la movilidad y de capacidad de invasión bacteriana. La prueba de movilidad fue realizada en agar y leídas durante 36 horas. La prueba de invasión bacteriana fue determinada a 1, 2 y 4 horas de interacción bacteria-célula huésped. Se determinó que la proteína DsbA presenta una función determinante en la capacidad de movilidad y en la invasión bacteriana. En ambas funciones se presenta una función complementaria de Dlp a DsbA. Dle tendría una función TDOR específica y limitada, asociada con la biosíntesis de fimbrias SEF y posiblemente de algunas proteínas de virulencia. Dle no tiene efecto en la movilidad. 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 nuevas cepas vacunales de tipo vivas y atenuadas en su virulencia debido a que los genes mencionados codifican las proteínas TDOR: DsbA, Dlp y Dle, encargadas de inducir el correcto plegamiento y/o transporte de proteínas de virulencia, fimbrias y flagelos para el correspondiente ensamblaje, translocación y/o inserción de invasinas, adhesinas y flagelinas, respectivamente.

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

ABSTRACT

A cellular procedure to determine which alive attenuated strain, a triple, double or single mutant constructed all from *Salmonella entérica* Serotype Enteritidis 82139 could be used as vaccinal strain. Initially, a factorial design allowed us the mutant strains selection and construction. The results of the statistical analysis of the significant minimal difference allowed the *in vitro* determination of the genic role of *dsbA*, *dle* and *dlp* in the bacterial motility and invasiveness in the cellular lines Henle 407 y MDCK. We obtained the strains 82139 C, 82139 I, and 82139 2, as single mutants, 82139 2C, 82139 2I and 82139 C as double mutants and 82139 2CI, as a triple mutant, with their respective *dle* expression control mutants to 82139 2CI pSTB1*dle* and 82139 pSTB1. The motility **was assayed *in vitro*** inoculating the bacterial culture on the surface of 0,3 % motility Agar Petri plates and incubating it 36 hrs at 37°C. The invasivity **was assayed *in vitro*** by infecting with the triple mutant monolayer MDCK and Henle cells and checking it after 1, 2 and 3 h. Protein DsbA of *Salmonella entérica* Serotype Enteritidis 82139, has a determinant function in the culture motility and invasive capacities. Protein coded by Dlp gen has a complementary function to DsbA. Dle could have a specific limited TDOR role associated to fimbria synthesis and probably to some virulence proteins with no motility effect. **The *in vitro*** motility and invasiveness tests allowed relating **DsbA, Dlp y Dle** Tioleoplasmic oxidative path (TDOR) function to the role of virulence factors. The double mutant 82139 2C missing *dsbA* y *dlp* genes and the triple mutant 82139 2CI missing *dsbA*, *dlp* y *dle* genes became potential genetic resources to be used as vaccinal strains; for those genes code for the proteins TDOR: DsbA, Dlp and Dle, in charge of inducing correct folding and/or transport of the proteins of virulence, fimbria and flagella with the right assemblage, translocation and/or insertion of their proteins such as invasionins, adhesionins, and flagelins respectively, containing one or more cystein moieties.

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

I. INTRODUCCIÓN

Los modelos bacterianos se han constituido en paradigmas útiles para la comprensión de modelos eucariotas mucho más complejos. *Salmonella*, bacteria Gram negativa, por ejemplo, se ha convertido, en estas dos últimas décadas 1991 - 2011, 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 (Jimenez S. y J. Jimenez M.; 1998; Rotger R.; 1995; Sanchez – Jimenez M. y N. Cardona – Castro, 2003; Tsuyoshi *et al*, 2004; Tortora *et al*, 1993).

Un paso temprano en el estudio de la patogenia de *Salmonella*, ha ocurrido en la investigación de la capacidad de *S. enteritidis* de invadir células huésped. En esa penetración participan la proteína periplasmática DsbA, una óxido reductasa del sistema de proteínas TDOR junto con Dsb, necesaria en la funcionalidad de toxinas, fimbrias y flagelos. Dsb es producido por *dsbA*, cuya actividad se ha demostrado en *Shigella flexnerii* en *Salmonella*, los cuales mantienen las membranas vacuolares, así como de otros efectores moleculares esenciales para la invasión en células epiteliales). Dsb se ha identificado también en algunas bacterias Gram positivas (Dongxia *et al*, 2008; Gallant C. *et al*, 2004; Keinjilnaba y Koreakilto, 2008; Tsuyoshi *et al*, 2004; Watson *et al*, 2008).

Otra proteína involucrada es Dle codificado por el gen *dle*; siendo DsbA la proteína líder de las TDOR Vía oxidativa. En ese sentido, el estudio tuvo como objetivo realizar el análisis funcional comparativo del gen *dle* con respecto a *dsbA* y *dlp* en la expresión fenotípica de movilidad y de invasión bacteriana de las cepas de *Salmonella enteritidis*: 82139, 82139C, 821392C, 82139 2CI, durante las primeras fases infectivas de internalización y supervivencia intracelular en células epiteliales de mamífero MDCK y Henle 407. Para el estudio de la funcionalidad de los genes *dle*, *dsbA* y *dlp* se usaron 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 trabajo se orienta a proponer un Protocolo Celular de uso validado para ensayos *in vitro* de capacidad de movilidad y de invasión bacteriana utilizando cepas vivas atenuadas en su virulencia a partir de *Salmonella enteritidis* Serotipo enteritidis 82139, como Modelo de Determinación de una cepa vacunal, haciendo uso del Diseño Factorial Completo y de cepas complementarias; así como también se utilizó el Diseño Factorial de tipo faltante.

Estas cepas vacunales de *Salmonella enteritidis* no sólo podrían ser utilizadas como vacuna de protección para humanos y animales contra la patogenicidad de ésta especie bacteriana, sino también empleadas con el objetivo de producir una segunda inmunización; es decir, como vehículo de DNA exógeno, recombinante, inmunógeno contra otros agentes patógenos del enterón de bacterias de difícil manipulación *in vitro*, como es el caso de *Helicobacter pylori*, causante de cáncer de estómago e intestinos, etc.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Objeto de estudio

MATERIAL BIOLÓGICO

La Cepa nativa y control *Salmonella enteritidis* 82139 portadora de plásmido. Y las cepas mutantes fueron tales como:

82139I (*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 2I (*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.

Se usaron células epiteliales de mamífero MDCK (riñón de perro CookerSpaniel de Maden y Darby y células Henle 407 de intestino. Estas Líneas celulares se conservan en viales de 1,5 mL en concentraciones no menos de $4 \times 10^5 \text{Cél} / \text{mL}$, debidamente rotulados y en nitrógeno líquido.

2. 2 MÉTODOS

A. PROTOCOLO CELULAR

El estudio del gen funcional *dle* codificador de la proteína TDOR vía oxidativa se logró utilizando las cepas obtenidas tales como, 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 de *dle*:82139 2CI pSTB1 *dle* y 82139 pSTB1. El análisis del Diseño Factorial permitió estudios comparando e interrelacionando la actividad de Dle con DsbA y Dlp por ausencia de los genes codificadores por efecto de mutación e inactivación génica. También se procedió a verificar la función del gen *del* con dos cepas adicionales que permitió el estudio por presencia del gen codificador de la enzima TDOR Dle, utilizando la estrategia de complementación génica que significa en presencia del gen por inserción de nuevo del gen *dle*. Se logró esta última estrategia utilizando el análisis funcional génica clonando sólo el gen en estudio *del* en un vector monocopia en una cepa triple mutante 82139 2CI incorporándose esta clonación por Transformación de tipo electrolución específico para el Gn. *Salmonella*, de los resultados de los ensayos in vitro de movilidad e invasión bacteriana se determinó su funcionalidad.

Se realizó el análisis funcional comparativo del gen *del* con respecto a *dsbA* y *dlp* en la expresión fenotípica de movilidad y de invasión bacteriana, durante la primera etapa de infección en monocapas celulares de MDCK y Henle 407. Los resultados fueron validados por el Diseño Factorial, el cual permitió seleccionar las 10 cepas utilizadas.

A.1.- ESTRATEGIA DEL USO DE LOS PROTOCOLOS CELULARES

- a) **Determinación de la cinética de crecimiento para la obtención de preinóculos.-** Luego de la selección de las cepas mediante el Diseño Factorial, se realizó la curva de crecimiento bacteriano para determinar la hora la fase logarítmica en las cepas de estudio, para obtener preinóculos. Las cepas se mantuvieron en aireación y agitación constante e incubadas a 37°C en caldo Luria Bertoni (LB).
- b) **Determinación de la cinética de crecimiento para la obtención de inóculos.-** Se obtuvieron cepas en condiciones de reposo e incubadas a 37°C en caldo Luria Bertoni (LB).
- c) **Obtención de preinóculos de las diferentes cepas**
 - Se inoculó alícuotas de las cepas en caldo LB debidamente rotulado y se llevó a incubar a 37°C durante 3 horas. Cada cepa en su respectivo recipiente debidamente rotulado, conteniendo los cultivos bacterianos en caldo LB en un biorreactor doméstico, el matraz común. A gran escala, se propone para la producción de preinóculos utilizarse un Biorreactor Loop de Circulación Interna, Flujo Invertido con sistema de aireación, con Agitador Hélice y Cortador de Espuma (BLIHC - 11).
- d) **Obtención de inóculos bacterianos**
 - Se prepararon los cultivos bacterianos preinóculos en caldo LB suplementada hasta una concentración final de $\text{NaCl } 0,3\text{mM}$ ($17,4 \text{ g} / \text{L}$), conteniendo el marcador de antibiótico selectivo a inicios de la fase logarítmica Terminal (a inicios de la Fase Estacionaria) a las 16 horas de incubación y en condiciones anaeróbicas a 37°C . La concentración bacteriana fue medida con una D.O. $_{600\text{nm}}$ de 0,8 a 0,9..

- Se utilizó un biorreactor simple llamado el matraz, y se utilizó bajo el requerimiento solo de Sistema de Agitación (no aireación), durante o/n, 16 horas, utilizando un Sistema de Agitación para Matraces.
 - A gran escala, se propone para la producción de los inóculos bacterianos utilizarse un Biorreactor Loop de Circulación Interna, sin Flujo Invertido (sin sistema de aireación) sistema de Agitador Hélice) con Cortador de Espuma (BLIHC - 11).
- e) **Obtención de inóculos de líneas celulares MDCK y Henle 407** (según Mendoza del Cueto, 2002, y Modificado por Villanueva *et al*, 2003)
- Se preparó material y soluciones, medios de cultivo, reactivos, para el proceso de descongelación de líneas celulares.
 - Para el proceso de Congelación de líneas celulares. Se guardó 1,2 mL en viales de 2mL de capacidad con aproximadamente $3,5 \times 10^6$ Cél. /mL de MDCK ó Henle 407 con medio DMEM. Las líneas celulares se conservaron temporalmente en contenedores de isopropanol y luego en nitrógeno líquido en tiempo indefinido.
 - Para producción de líneas celulares se procedió al proceso de mantenimiento de las células en Flask utilizando como medio de cultivo DMEM suplementado al 10% con STF.
 - Se utilizó células MDCK ó Henle 407 contenidas en vial en nitrógeno líquido.
 - Se determinó el Tiempo de Duplicación de la línea celular Henle 407 ó MDCK.
- f) **Estandarización del protocolo de ensayos de invasión en líneas celulares con *Salmonella enteritidis* 82139**
- Se procedió a la reactivación de células epiteliales de mamífero MDCK.
 - Se procedió a la obtención de las monocapas de MDCK ó Henle.
 - Se procedió a la obtención de preinóculos e inóculos bacterianos.
 - Se procedió a la Infección bacteriana en células epiteliales Henle 407 y en MDCK.
 - Se procedió a la recuperación de las células bacterianas invasivas de las respectivas monocapas Henle 407 y MDCK infectadas a Tiempos de 1, 2, 3 y 4 horas de interacción bacteria – célula huésped respectivamente.
 - Se sembró las bacterias internalizadas y se incubó en placas de agar LB conteniendo el marcador molecular a 37°C durante 24 a 48 horas.
 - Se realizó el recuento de las bacterias invasivas “internalizadas”, determinadas durante 1,2,3 y 4 horas de infección, correspondiente a T=0,1,2y3.
 - Se procedió a la determinación del % del fenotipo de expresión de invasión con respecto al tiempo 1, 2, 3 y 4 horas de infección bacteriana
 - Se determinación la expresión fenotípica de invasión bacteriana por presencia y ausencia del gen en estudio *dle*, y se determinó su relación funcional con respecto a *dsbA* y *dlp*.
 - Se procedió a la conservación de las cepas mutantes en isopropanol y nitrógeno líquido.
- g) **Método estadístico para la determinación de movilidad de *S. enteritidis*.**
 Diseño experimental: Diseño factorial completo.
 $2^K, 2^3=8$ 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	$a_0b_0c_0$	$a_0b_1c_0$	$a_1b_0c_0$	$a_1b_1c_0$
c_1	$a_0b_0c_1$	$a_0b_1c_1$	$a_1b_0c_1$	$a_1b_1c_1$

0= nivel bajo, SUPRESIÓN (ausencia)
 1 = nivel alto, EXPRESIÓN (presencia)
 Donde: a = DsbA, b = Dlp y c = Dle

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 Dlecon 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 S. *et al*, 1999; Calzada B., 1964; Douglas C., 1991). Se uso además 2 cepas adicionales al diseño, la cepa complementada con *dle* y su cepa control de expresión.

h) .- Protocolo para la determinación de Movilidad(Mendoza del Cueto y Rotger2002)

- **Reactivación de células bacterianas.**-Se reactivó las cepas en estudio obtenidas a partir de *Salmonella enteritidis* 82139 utilizando inóculos de los viales correspondientes y sembrados en agar Luria Bertoni (agar LB) conteniendo su respectivo marcador (antibiótico), si lo requiere. Se empleó placas con medio LB para mutantes *dsbA*- el antibiótico cloramfenicol y para *dle*-, kanamicina.
- **Siembra en Agar Movilidad.**-Se procedió a la siembra en agar movilidad con 0,3% de agar, utilizando los inóculos bacterianos obtenidos en placas reactivadas en agar LB, e incubadas a 37°C durante 16 a 24 horas.
- **Recolección de datos.**-La movilidad de las cepas de *S. enteritidis* se determinó mediante la **medición** de la colonia por desplazamiento de la bacteria en mm, las que fueron expresadas en %.
- **Procesamiento Estadístico de Datos.**- Se utilizó el Análisis de Varianza: ANAVA y de la prueba de Diferenciación Mínima Significativa (DMS), para un Diseño Factorial 2^K Fraccionada (con datos faltantes) y considerando un nivel de significancia del 0.01 (Hernández S. *et al*, 1999; Calzada B., 1964; Douglas C., 1991).

i) Método estadístico para la determinación de capacidad invasiva de *S. enteritidis* portadora de plásmido en células de mamífero MDCK

Diseño experimental: Diseño factorial fraccionada (ó Diseño de tipo Faltante)

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).

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

o = nivel bajo, SUPRESIÓN (ausencia)

1 = nivel alto, EXPRESIÓN (presencia)

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

Los Diseños Factoriales se realizaron para cada tratamiento en T=0, T=1 y T=3 correspondientes a 1,2 y 4 horas infectivas.

Los ensayos *in vitro* de capacidad invasiva se realizaron por duplicado y con 3 réplicas. Se incorporarán los datos promedios de dichas determinaciones en el Diseño factorial.

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 Dlecon respecto a la capacidad de invasión bacteriana en línea celular Henle y MDCK y a la vez de forma interrelacionada de manera simultánea y en las mismas condiciones *in vivo* en *in vitro* (Hernández S. *et al*, 1999; Calzada B., 1964; Douglas C., 1991). Se uso además 02 cepas adicionales al diseño, la cepa complementada con *dle* y su cepa control de expresión.

j) Protocolo para la Determinación de la capacidad invasiva de *Salmonella enteritidis* en célula de mamífero MDCK

- Se utilizó el Método de Standardización de infecciones bacterianas del Protocolo Celular recomendado por Mendoza del Cueto y Rotger 2002y modificado por Villanueva L. y R. Rotger, 2003, aplicando los criterios requeridos para infecciones citológicas.
- **Recolección de datos.** Se recolectó los datos del recuento en medio Luria Bertoni (LB),se comparará unidades formadoras de colonias por mL (UFC / mL) Versus Tiempo 1,2 y 4 horas de interacción bacteria – célula MDCK para determinar su respectivo % de la capacidad de invasión. El recuento obtenido a T=0 (a 1 hora de infección) se comparó con el inóculo infectivo utilizado de 10^7 . A T=1 (placas incubadas más 1 hora posterior: a dos horas de experimentación) se comparará con respecto a T=0 y T3 (+2horas, a cuatro horas de experimentación) con respecto a T1.
- **Procesamiento Estadístico de Datos:**Se utilizó el Análisis de Varianza: ANAVA y de la prueba de Diferenciación Mínima Significativa (DMS) para un Diseño Factorial 2^k Fraccionada (con datos faltantes) y considerando un nivel de significancia del 0.05 (Hernández S. *et al*, 1999; Calzada B., 1964; Douglas C., 1991).

III. RESULTADOS

El análisis de Varianza ANAVA y Diferencia Mínima Significativa (DMS) de los datos empleando el Diseño Factorial, ha permitido validar los resultados encontrados en los ensayos *in vitro* de movilidad y la capacidad invasiva de *Salmonella enteritidis*. En *Salmonella entérica* Serotipo Enteritidis 82139 porta, la proteína DsbA presenta una función determinante en la movilidad (**Fig. 1, 2, 3 y 4**) y la capacidad invasiva (**Fig. 5, 6, 7 y 8**). Dlp tendría una función complementaria a DsbA. La proteína Dle tendría una función TDOR específica y limitada asociada con la biosíntesis de fimbrias SEF (**Fig. 7 y 8**) y posiblemente a algunas proteínas de virulencia. Dle no tiene efecto en la movilidad. Los Coeficientes de Variación de 4.96% obtenidos en los ensayos de movilidad y de 3.93% en los ensayos de capacidad invasiva, comparado contra un límite de aceptabilidad del 30%, indican una buena calidad en la obtención de datos.

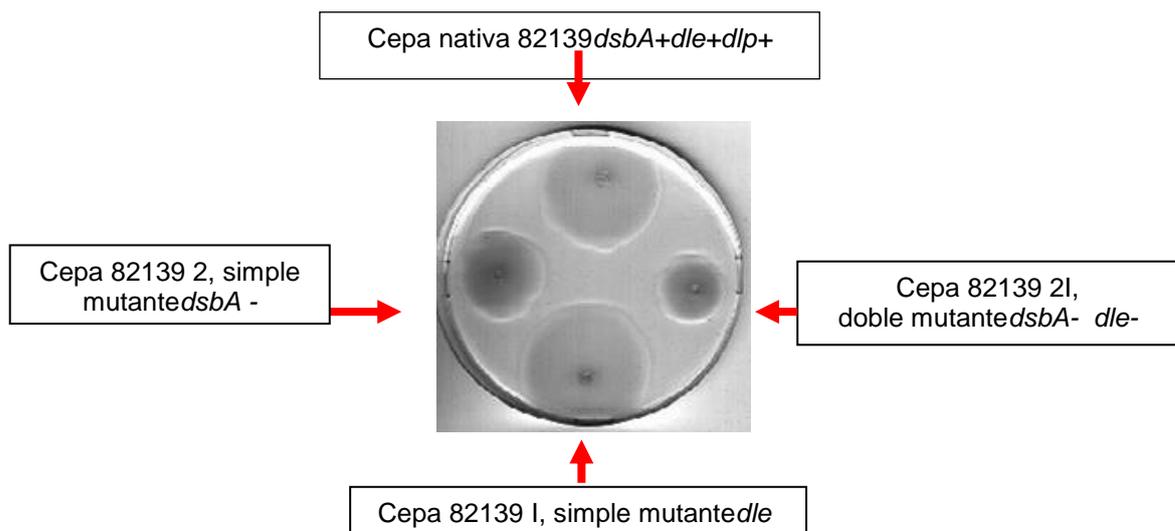


Fig. 1. Prueba de Movilidad: Determinación de la función de DsbA, Dlp y Dle en la movilidad de *Salmonella enteritidis* 82139 nativa, simples y doble mutantes, en agar movilidad, incubadas a 37°C durante 24 horas.

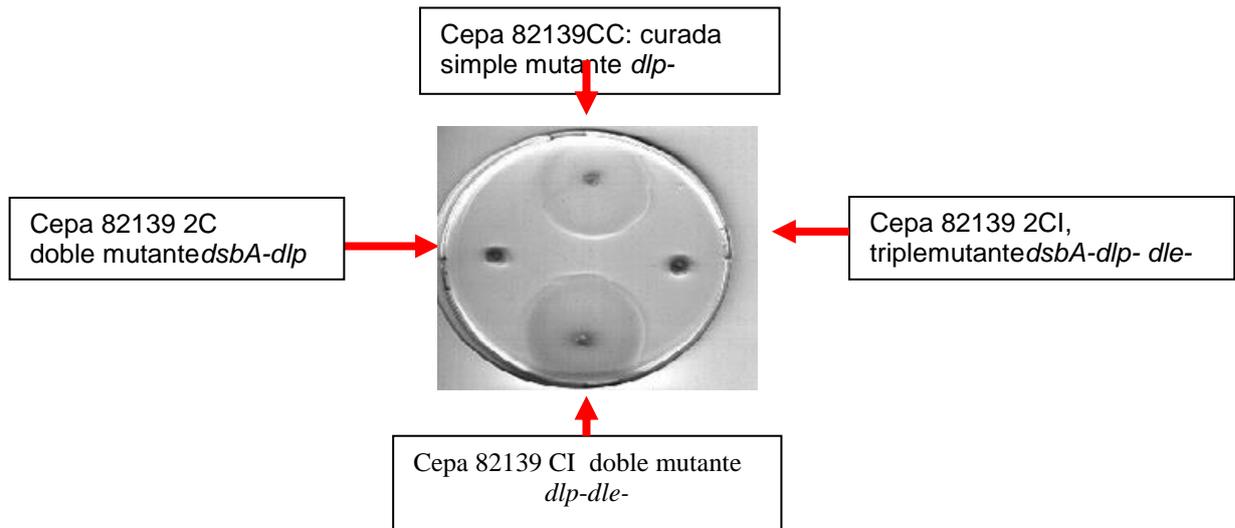


Fig. 2. Prueba de Movilidad: Determinación de la función de DsbA, Dlp y Dle en la movilidad en *Salmonella enteritidis* 82139 simple, dobles y triple mutante, en agar movilidad, incubadas a 37°C durante 24 horas.

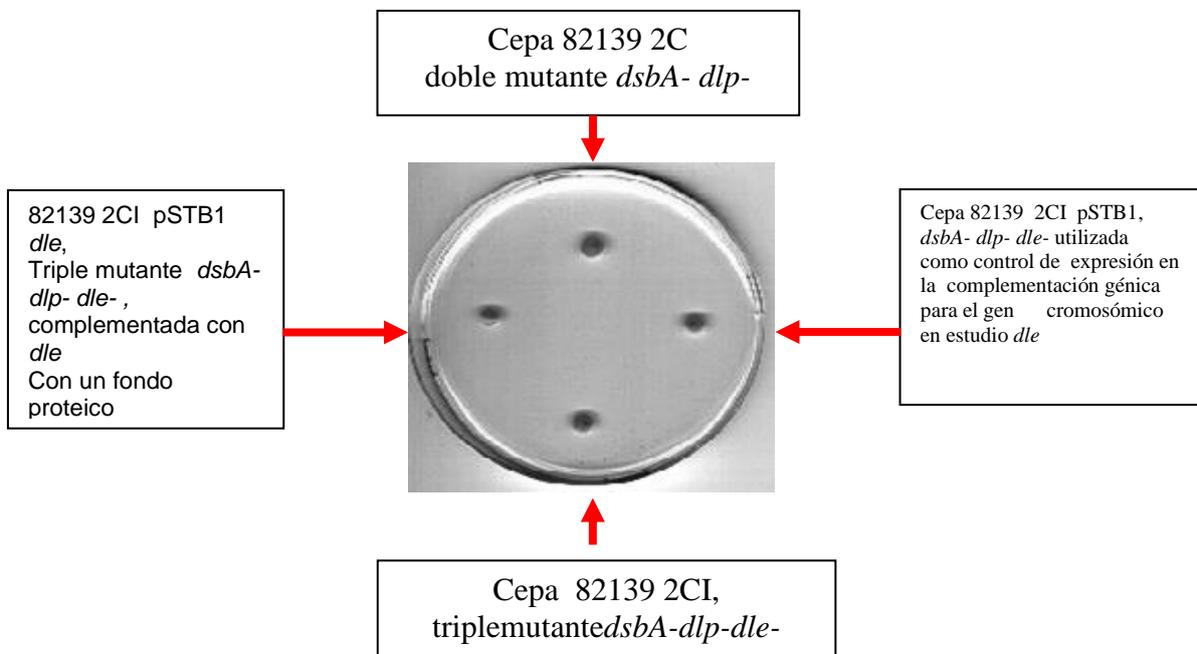


Fig. 3. Prueba de Movilidad: Determinación de la función de DsbA, Dlp y Dle en la movilidad en cepas de *Salmonella enteritidis* 82139 doble y triple mutantes y mutante complementada con *dle* con la cepa control 2CI pSTB1 *dle*, en agar movilidad e incubada a 37°C durante 24 horas.

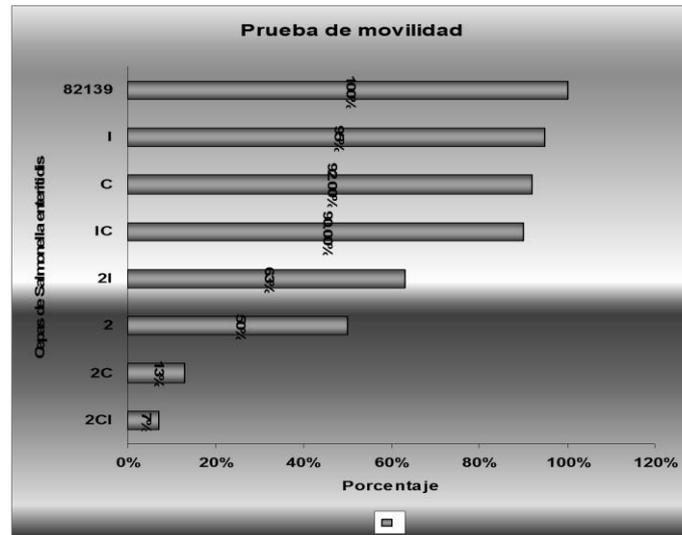


Fig. 4. Porcentaje de movilidad por supresión (ausencia) y expresión (presencia) de DsbA, Dlp y Dle en cepas de *Salmonella enteritidis* 82139: simples, dobles y triple mutantes, en agar movilidad e incubadas a 37°C durante 24 horas.

C = carente del gen plasmídico *dlp*- codificador de la proteína Dlp

I = interrupción del gen cromosómico *dle*- codificador de la proteína Dle

2 = interrupción del gen cromosómico *dsbA*- codificador de la proteína DsbA

Simple mutantes: I, C, 2; **Dobles mutantes:** IC, 2I, 2C; **Triple mutante:** 2CI

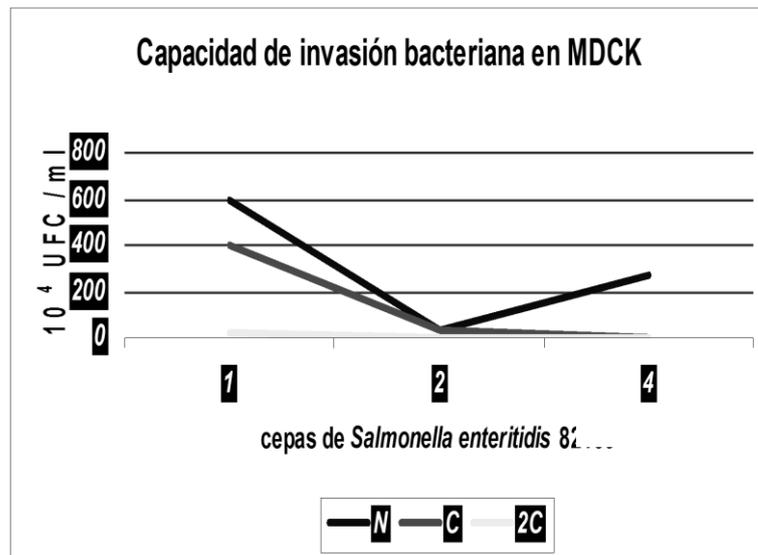


Fig.5. Expresión de la capacidad invasiva de *Salmonella enteritidis* 82139, 82139C y 82139 2C por supresión (ausencia) y expresión (presencia) de DsbA, Dlp y Dle en MDCK en las primeras cuatro horas de interacción bacteria - célula huésped (1, 2 y 4 horas), expresadas en 10⁴UFC/mL.

- **N** Cepa nativa, 82139: Presenta los tres genes *dsbA+*, *dlp+* y *dle+* codificadores de las proteínas TDOR periplasmáticas DbsA, Dle y Dlp
- **C** Cepa curada, 82139C: curada en ausencia de plásmido, *dlp-* (en un fondo proteico DsbA1Dlp0Dle1
- **2C** Cepa doble mutante, 82139 2C, curada, *dlp-* y en ausencia de *dsbA-*; en un fondo proteico DsbA0Dlp0Dle1 (1, indica presencia de la proteína TDOR Dle).

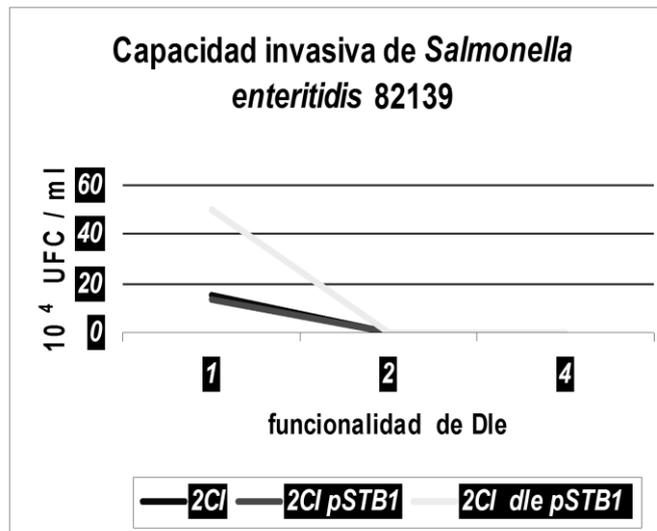


Fig. 6. Expresión de la capacidad invasiva de *Salmonella enteritidis* 82139 2CI, 82139 2CI pSTB1 *dle+* y 82139 2CI pSTB1 en MDCK durante las primeras cuatro horas de interacción bacteria – célula huésped (1, 2, y 4 horas), expresadas en 10^4 UFC/MI

- **2CI** : triple mutante carente de plásmido, *dlp-*, con interrupción de los genes *genes dsbA-* y *dle-* y supresión (ausencia) de las proteínas TDOR periplasmáticas DsbA, Dle y Dlp.
- **2CI** : pSTB1: cepa triple mutante que presenta solo el vector, utilizada como control de expresión funcional del gen *dle*. Presenta un fondo proteico DsbA0Dlp0Dle0 igual a la cepa 2CI
- **2CI** : pSTB1 *dle*: complementación del gen *dle* en el vector de expresión pSTB1 en una triple mutante, con un fondo proteico DsbA0Dlp0Dle1 (1, indica presencia de la proteína TDOR Dle).

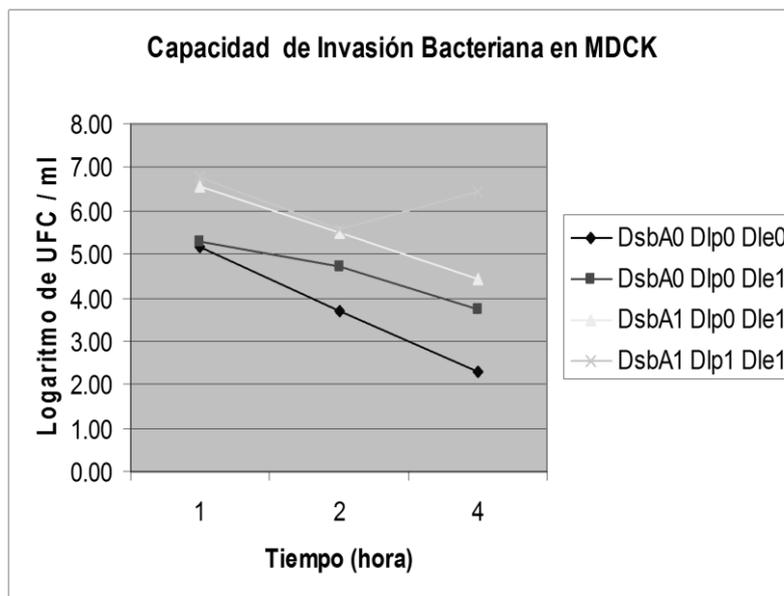


Fig. 7. Estudio comparativo del efecto de los fondos proteicos: DsbA1Dlp1Dle1, DsbA1Dlp0Dle1, DsbA0Dlp0Dle1, DsbA0Dlp0Dle0, en la capacidad invasiva de *Salmonella enteritidis* en MDCK en las primeras cuatro horas de interacción bacteria – célula huésped (1, 2 y 4 horas), expresadas en unidades logarítmicas.

- **DsbA1Dlp1Dle1** : fondo proteico correspondiente a la cepa 82139; presenta los tres genes funcionales *dsbA+*, *dlp+* *dle+* codificadores de las tres proteínas TDOR periplasmáticas en estudio.
- **DsbA1Dlp0Dle1** : fondo proteico correspondiente a la cepa 82139 C; cepa curada carente de plásmido, simple mutante *dlp-*.
- **DsbA0Dlp0Dle1** : fondo proteico correspondiente a la cepa 82139 2C; cepa curada, doble mutante *dsbA-dlp-*.
- **DsbA0Dlp0Dle0** : fondo proteico correspondiente a la cepa 82139 2CI; triple mutante *dsbA- dlp- dle-* en ausencia de las tres proteínas TDOR.

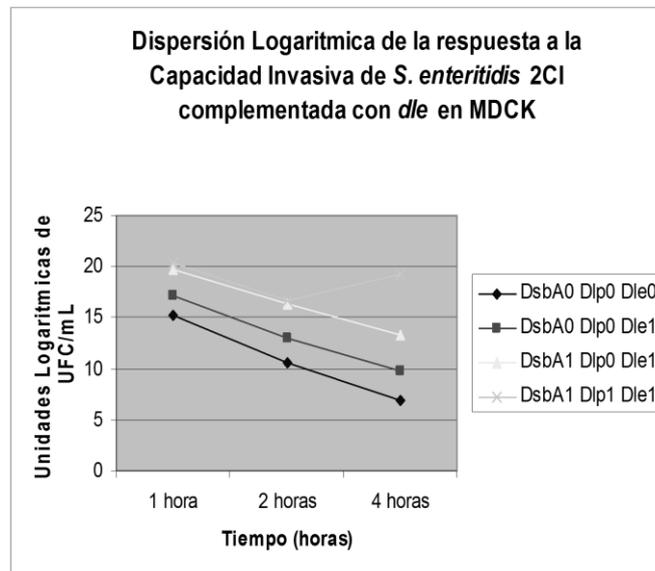


Fig. 8. Comparación del efecto del fondo proteico DsbA0Dlp0Dle1 obtenida por complementación génica *dle+* con respecto a DsbA1Dlp1Dle1, DsbA1Dlp0Dle1 y DsbA0Dlp0Dle0, en la capacidad invasiva de *Salmonella enteritidis* en MDCK en las primeras cuatro horas de interacción bacteria – célula huésped (1, 2 y 4 horas), expresadas en unidades logarítmicas.

- **DsbA1Dlp1Dle1**: fondo proteico correspondiente a la cepa 82139; presenta los tres genes funcionales *dsbA+*, *dlp+* *dle+* codificadores de las tres proteínas TDOR periplasmáticas en estudio.
- **DsbA1Dlp0Dle1**: fondo proteico correspondiente a la cepa 82139 C; cepa curada carente de plásmido, simple mutante *dlp-*.
- **DsbA0Dlp0Dle1**: correspondiente a la cepa complementada 82139 2CI pSTB1*dle+*, con igual fondo proteico que la cepa 82139 2C; cepa curada, doble mutante *dsbA-dlp-*.
- **DsbA0Dlp0Dle0**: fondo proteico correspondiente a la cepa 82139 2CI; triple mutante *dsbA- dlp- dle-* en ausencia de las tres proteínas TDOR.

IV. DISCUSIÓN

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-407, 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 Dlt no complementa la deficiencia en DsbA, pese a su elevada homología con Dlp, que sí lo hace. Atribuyéndosele a esta falta de actividad de Dlt a su incapacidad para alcanzar el periplasma (Rodríguez – Peña, J. M., 1996; Rodríguez – Peña, J. M. *et al*, 1997). Siendo Dlt homóloga a Dle (presente en *S. enteritidis*) se decidió el estudio en la presente Tesis explorar las funciones de Dle, codificada por el alelo cromosómico de *dlp* en *S. enteritidis*.

Se determinó en los ensayos *in vitro* de movilidad que, la mutación *dle* no afecta al aparato flagelar, y que la complementación con Dle es incapaz de restaurar la movilidad a un mutante *dsbA*. El primer resultado era de esperar, ya que DsbA es suficiente para la biosíntesis de flagelos, pero Dlp, que tiene un alto grado de identidad con Dle, es capaz de complementar la mutación *dsbA* en este aspecto. Se determinaron para mutantes *dsbA*, *dlp* y *dsbA*, *dlp* y *dle* una reducción de actividad de movilidad mayor del 90,14 y 92,96% respectivamente, con respecto a la cepa control, curada(Fig 4).

Los ensayos de movilidad a partir de simples y triples mutantes han favorecido poder determinar la función de DsbA, Dlp y Dle por supresión (en ausencia) de éstas; mientras que dobles mutantes han favorecido a determinarlas por expresión (en presencia) de la proteína TDOR (Figuras 1, 2, 3). Según el efecto de Dle presente (Dle1) y Dle ausente (Dle0), determinados en el efecto individual C, así como los efectos DsbA0Dle1 y Dlp0Dle1 (efecto grupal AC y BC respectivamente) y del efecto conjunto de las tres proteínas TDOR, efecto ABC (Fig. 9) demuestran con un nivel de significancia de 0,01 que, la mutación *dle-* (en un fondo proteico DsbA1Dlp1) no afecta al aparato flagelar, donde los valores de los efectos de movilidad entre las cepas mutantes son menores a la Diferencia Mínima significativa de 0.155 (DMS, al 0,025) lo que determina que, al no haber diferencia significativa de los efectos, estos son iguales y que no habría efecto alguno con respecto a la movilidad en presencia de Dle. Estos mismos resultados se aprecian en la figura 1, donde mutante 82139 I (*dle-*) presenta similar capacidad de movilidad que la cepa 82139 nativa (que presenta *dsbA+dlp+dle+*), lo que indica que, al no haber disminución significativa en ausencia del gen *dle* (en un fondo proteico DsbA1Dlp1), se demuestra que las dos proteínas funcionales presentes en 82139 I, como son DsbA y Dlp, son las determinantes de la movilidad de *Salmonella enteritidis*. Utilizando otras estrategias de expresión génica, como es la complementación génica de *dle+* en triple mutante, se determina que, en la cepa 82139 2CI pSTB1*dle+*, Dle es incapaz de restaurar la movilidad en un fondo proteico DsbA0Dlp0, presentando similar efecto en la movilidad que cepas 82139 2CI y 82139 2C(Fig.4); resultado que era de esperar, pues DsbA es suficiente para la biosíntesis de flagelos, el que se demuestra comparando el efecto individual entre DsbA presente (DsbA1) y DsbA ausente (DsbA0), según el efecto individual A; así como del efecto conjunto de las tres proteínas TDOR presentes ABC. Aunque también se determinó que Dlp es capaz de complementar la mutación *dsbA-*; según el efecto individual B (Dlp1 y Dlp0) y grupal AB (DsbA1Dlp1, DsbA0Dlp1) y BC. En el efecto BC, la diferencia no significativa entre Dlp1Dle1 y Dlp1Dle0 con valores de 3.18 y 3.00 menores al DMS al 0,025, permiten determinar la función TDOR de Dlp en la movilidad.

Comparando mutantes *dsbA- dlp-* (82139 2C) y *dsbA- dlp- dle-* (82139 2CI) se determinó una reducción (o pérdida) de movilidad mayor del 94,5% y 100%, respectivamente, con respecto a la cepa control nativa *dsbA+dlp+dle+* con una presentación de efectos de diferencia significativa en los valores de 94,5% y 100%, indican que DsbA y Dlp presentan función TDOR determinante en la movilidad(Fig. 1, 2, 3 y 4) y en la actividad de los flagelos. También se establecido en triples mutantes 82139 2CI, la pérdida total de movilidad, por lo que se determinó que ante un fondo proteico DsbA0Dlp0Dle0, *Salmonella enteritidis* inmóvil, pues presentó un diámetro de 3mm, correspondiente solo al del inóculo inicial utilizado.

Se determinó utilizando el diseño factorial para los cuatro tratamientos realizados en los ensayos *in vitro* de capacidad de invasión bacteriana intracelular que: los datos obtenidos presentan Diferencia Mínima Significativa (al 0,025), lo que determina que los genes codificadores de las proteínas periplásmicas TDOR vía oxidativa en estudio: DsbA, Dlp y Dle presentan efectos

significativos en la capacidad de invasión de *Salmonella enteritidis*, medido en las cuatro primeras horas de interacción bacteria – célula huésped:

Se determinó en ensayos de infección bacteriana en fase log tardía en la línea celular MDCK, línea específica para estudios de invasión, lo siguiente:

En un fondo proteico DsbA1Dlp1Dle1 de la cepa 82139 (nativa) y DsbA1Dlp0Dle1 de la cepa 82139 C (simple mutante, curada, sin plásmido, *dlp*-) se determina con un nivel de significancia de 0,05 y con un DMS al 0,025 que, DsbA1Dlp1Dle1 y DsbA1Dlp0Dle1 que presentan valores promedios de 6.7587 y 6.5634 respectivamente, con una diferencia de 0.1953 menor al DMS de 0.3302, esto comprueba que presentan efectos iguales, y que la presencia de DsbA es determinante (logra el mayor % invasivo) en la adhesión – internalización correspondiente a la primera etapa de la primera fase infectiva y que Dlp no presenta función determinante en la primera hora de infección (Figuras 5, 7). El efecto significativo de 1.4724, mayor al DMS de la capacidad invasiva a 1 hora de interacción bacteria – célula huésped entre mutantes DsbA1Dlp0Dle1 y DsbA0Dlp0Dle0, permite determinar que, *S. enteritidis* es potencialmente invasiva, con respecto a la primera etapa de la fase infectiva (la internalización) aún incluso utilizando inóculos infectivos de cepas curadas. A pesar de verse disminuida la capacidad invasiva en las subsiguientes etapas de la primera fase infectiva correspondientes a la 2da y 4ta hora de interacción bacteria – célula huésped, a consecuencia de la ausencia de *dlp*-, los valores de 1.9216 y 2.1455 aún son mayores con respecto a la primera hora, esto determina que DsbA, también presenta función TDOR en la capacidad de invasión durante las cuatro horas de interacción bacteria – célula huésped. Como era de esperar, tanto en movilidad como en la capacidad invasiva de *Salmonella enteritidis*, DsbA presenta una función determinante, resultados que guardan relación con dos inferencias sustentadas por otros investigadores, siendo la primera inferencia: que la presencia de Histidina en el centro catalizador de DsbA, determina una función importante para mantener el potencial redox, razón por la que esta proteína tiene ventaja de presentar una función oxidante más rápida y reversible frente a ciertos sustratos proteicos con tioles reducidos desplegados como sostiene Guddat *et al*, 1997 citada por Mendoza del Cueto 2002 ¹¹; función aminoacídica en ventaja para DsbA con respecto a Dlp y Dle, que presentan solo aminoácidos internos Prolina – Prolina, determinados por Mendoza del Cueto y Rotger, 2002 y Villanueva y Rotger, 2003. Siendo la segunda inferencia que la presencia de regiones diferenciales en el dominio B, serían las responsables de la función específica de DsbA a ciertos sustratos. A pesar de éstas ventajas en DsbA, la presente investigación ha logrado también determinar el rol principal que juegan los plásmidos en la capacidad invasiva de *S. enteritidis* a partir de las etapas infectivas subsiguientes (subsiguientes) a la etapa de adhesión – internalización (a 1 hora de invasión bacteriana), que son: la adaptación – supervivencia intracelular y la multiplicación, medidas a la 2da. y cuarta hora respectivamente. Utilizando la cepa 82139 y la cepa curada 82139C, con un nivel de significancia de 0,05 y un DMS al 0,025, y aun presentando diferencia significativa de 2.6538 entre DsbA1Dlp1Dle1 y DsbA0Dlp0Dle1, que determina la actividad grupal DsbADlp y con una función complementaria de Dlp a DsbA. Además, la diferencia significativa de 1.9693 entre DsbA1Dlp1Dle1 y DsbA1Dlp0Dle1 indica que la actividad de Dlp es determinante a la cuarta hora de interacción bacteria – célula huésped en las subsiguientes etapas a la internalización bacteriana, que corresponde a la última etapa, la multiplicación intracelular, perteneciente a la primera fase infectiva.

En un fondo proteico: DsbA1Dlp1Dle1 y DsbA1Dlp0Dle1 que determina, ante la ausencia de Dlp, no se aprecia un efecto significativo, corroborándose tal efecto con el estudio del DMS al 0,025 correspondiente a la cuarta hora de interacción bacteria – célula huésped, donde estas dos cepas en estudio presentan valores de 6.39567 (DsbA1Dlp1Dle1) y 4.4213 (DsbA1Dlp0Dle1), con una diferencia significativa de 1.9693 mayor al DMS de 0.3302, indicando que los efectos son diferentes, viéndose afectada la etapa de multiplicación intracelular por ausencia de proteínas de virulencia codificadas por el operón *spv*, de ubicación plasmídica. Estos resultados determinan la relación del operón *spv* del gen *dlp*, en ésta etapa y del requerimiento de la función de Dlp en la actividad de invasivas codificadas por el operón *spv*.

Utilizando la cepa 82139 2CI complementada con *dle* con un fondo proteico final de DsbA0Dlp0Dle1 comparada con la triple mutante DsbA0Dlp0Dle0 (Fig.8) presentando un DMS al 0,025 significativamente diferente, permite determinar que, Dle, sí presenta capacidad de invasión en células MDCK a 1 hora de interacción bacteria – célula huésped, tiempo correspondiente a la primera

etapa de la primera fase infectiva, que es la adherencia – internalización. Sin embargo, al no presentar Dle, un efecto claro de complementación en la actividad TDOR en las etapas infectivas subsiguientes a la adherencia – internalización, como son, las etapas de supervivencia - adaptación y multiplicación intracelular, correspondientes también a la primera fase infectiva intracelular, medidas a 2 y 4 horas de interacción; donde Dlp, proteína altamente homóloga, sí se ve implicado, incluso capaz de complementar la mutación *dsbA*. Permite inferir que Dle presenta una función específica y limitada. Específica, por estar asociada con la biosíntesis de fimbrias SEF y de algunas proteínas de virulencia; limitada, por tener la desventaja de presentar dos aminoácidos internos Prolina – Prolina.

La recuperación de bacterias intracelulares *in vitro* en la monocapas de células MDCK más bajas que las dosis infectivas *in vivo* y la inmovilidad de las cepas doble y triple mutante, en ausencia de proteínas DsbA, Dlp y Dle, permiten proponer a las cepas 82139 2C y 82139 2CI como posibles cepas vacunales tipo vivas atenuadas en su virulencia contra *Salmonella enteritidis*, en base a futuras investigaciones inmunológicas. Se determinó ensayos *in vitro* que reemplazarán a ensayos de infecciones *in vivo*. Estos ensayos dan validez a que se recomiende ésta estrategia del uso de los Protocolos Celulares como Modelo en la Determinación de cepas vacunales en *Salmonella enteritidis*, en bacterias del mismo género, y en bacterias de la familia Enterobacteraceae y no Enterobacteraceae del enterón.

***“No puede existir vida en un mundo sin vacunas”, “Un mundo sin vacunas no es mundo”
“Niños desprotegidos de vacunas ante enfermedades provocaría la muerte en jóvenes aun sin procreación y daría el comienzo de la extinción de la raza humana en la Tierra”.
“Con solo padecer enfermedades mortales ya no es vida”.....***

V. CONCLUSIONES

1. Se logró un Protocolo Celular de uso validado para ensayos *in vitro* que determina la capacidad de movilidad y de invasión bacteriana intracelular utilizando cepas vivas atenuadas en su virulencia a partir de *Salmonella enterica* Serotipo Enteritidis82139 (*S. enteritidis* 82139), como Modelo de determinación de una cepa vacunal.
2. La movilidad y la biosíntesis de flagelos en *S. enteritidis* 82139 portadora de plásmido, está determinada por la proteína DsbA. Dlp, presenta una función complementaria a DsbA. La Proteína Dle no tiene ninguna función.
3. La capacidad invasiva intracelular de tipo no sistémico en *S. enteritidis*82139 portadora de plásmido también está determinada por la proteína DsbA tanto en células de mamífero MDCK como también en Henle 407, y Dlp presenta una función complementaria a DsbA. Dle sólo tendría una función TDOR específica y limitada, asociada con la biosíntesis de fimbrias del operón SEF, específico de *Salmonella enteritidis*.
4. DsbA es responsable de la capacidad de invasión en células de mamífero MDCK y Henle 407 en las cuatro horas de interacción bacteria – célula huésped, presentando actividad en las tres etapas correspondientes a la primera fase infectiva intracelular, que son: adhesión e internalización, supervivencia y adaptación, y multiplicación intracelular medidas a 1, 2 y 4 horas de interacción respectivamente, correspondiente a la Fase de invasión intracelular no sistémico.
5. La actividad de Dle favorece a la primera Fase infectiva: de tipo celular no sistémico, y correspondiente a la primera etapa: la adhesión e internalización como lo hace la proteína DsbA.
6. Existe una función determinante de Dlp en la etapa de multiplicación intracelular. Propiedad de los plásmidos portadores de proteínas de virulencia.
7. Las cepas vivas atenuadas avirulentas: 82139 2CI triple mutante, con fondo proteico DsbA0Dle0Dlp0 y la 82139 2C doble mutante, con fondo proteico DsbA0Dle1Dlp0, requieren de los ensayos *in vivo* correspondientes a fin de que sean propuestas como cepas vacunales.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CALZADA B. (1964). **Métodos Estadísticos para la Investigación**. 2da. Edic. Edit. SESATOR. Lima. Perú.
- 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 RcsCDB System**. Journal of Bacteriology. Jan 2008. P. 87-97. American Society for Microbiology.
- DOUGLAS C. (1991). **Diseño y Análisis de Experimentos**. 1 Edic. Edit. Iberoamericana S. A. de C. V. México D.F. México.
- 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.
- HERNÁNDEZ S, C. FERNÁNDEZ Y L. BAPTISTA. (1999). **Metodología de la Investigación**. 2da. Edic. Editorial Mc GRAW – HILL. México D.F. México.
- JIMÉNEZ S. Y J. JIMÉNEZ M.; (1998). **Genética Microbiana**. Editorial Síntesis. España.
- KEINJI INABA Y KOREAKI ITO, (2008). Structure and mechanisms of the DsbB- DsbA disulfide bond generation machine. ELSEVIER. Biochimica et Biophysica Acta 1783 (2008) 520-529. Koreaki.Ito@ky5.ecs.kyoto-u.ac.jp
- 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.
- RODRÍGUEZ – PEÑA, J. M., (1996). Tesis Doctoral: Mapa génico del plásmido de virulencia de *Salmonella enteritidis* y Caracterización de regiones homólogas del cromosoma de *Salmonella typhi*. Universidad Complutense de Madrid- Facultad de Farmacia. 1996.
- RODRÍGUEZ – PEÑA J.; M. BUISÁN, M. IBÁÑEZ Y R. ROTGER. (1997). Genetis map of the virulence of *Salmonella enteritidis* and nucleotide sequence of its replicons. Gene. 188: 53 – 61.
- ROTGER, R.; J. RODRÍGUEZ – PEÑA; M. BUISÁN; M. IBÁÑEZ. (1995). **Genética de la virulencia de *Salmonella***. **Microbiología y Genética Molecular**. Tomo I : 13 – 27.
- SANCHEZ – JIMENEZ, M Y N.M. CARDONA - CASTRO, (2003). Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. Instituto Colombiano de Medicina Tropical – Asociación Colombiana de Infectología. Medellín - Colombia. Vol 7 – 1
- TSUYOSHI M, N. OKADA Y D. HIROFUMI. (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.
- TORTORA J., F. BURDELL Y CH. CASE, (1993). **Introducción a la Microbiología**. Editorial Acribia S.A. Zaragoza – España.
- TSUYOSHI M.; N. OKADA; H. DANBARA. (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.; T. BAKER; S. BELL; A. GANN; M. LEVINE; R. LOSICK. (2008). **Biología Molecular del Gen**. 5° Edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Madrid -España. pp 776.