

Diseño Factorial para Elaborar, Seleccionar y Determinar una Cepa Vacunal de *Salmonella entérica* Serotipo Enteritidis 82139

Factorial Design to Prepare, Select and Determine a Vaccine Strain of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis 82139

Liliana Veronica Villanueva-Alva^{1,*}; Rafael Rotger-Anglada²; Raul Antonio Beltran-Orbegoso³

^{1y3} Laboratorio de Biología y Microbiología Molecular. Universidad Nacional de Trujillo. Av. Juan Pablo II s/n – Ciudad Universitaria, Trujillo, Perú. r_bel_orbe@hotmail.com

^{1y2} Laboratorio Microbiología Molecular Fac. Farmacia Dpto Microbiología II - Universidad Complutense de Madrid – España- Profesor Titular Dr. Rotger Anglada Rafael. Director Doctorado Microbiología II

* Autor correspondiente: liliana_villanueva_alva@hotmail.com (L. Villanueva) DOI: [10.17268/rev.cyt.2021.04.10](https://doi.org/10.17268/rev.cyt.2021.04.10)

RESUMEN

El diseño factorial permite elaborar, seleccionar y determinar una cepa vacunal de *Salmonella entérica* Serotipo Enteritidis 82139 con validación de función génica *dsbA*, *dle* y *dlp* con respecto a capacidad movilidad e invasión intracelular bacteriana por Diferencia Mínima significativa (DMS) y con 99% de nivel de confianza para movilidad y 95% para invasión intracelular bacteriana. Resultados al 0,025 DMS y significativamente diferente, donde Dle, sí presenta capacidad de invasión en MDCK a 1 hora de interacción bacteria – célula huésped, fase intracelular adherencia – internalización. Dlp, proteína altamente homóloga, capaz de complementar mutación *dsbA*-. Dle, presenta función específica y limitada. En ausencia de DsbA y Dlp, disminuye su capacidad invasiva a 1era, 2da y 4ta hora de interacción bacteriana. DsbA es determinante en 1era hora de interacción; Dlp de ubicación plasmídica tiene actividad complementaria a DsbA, con mayor potencial de actividad a 4ta hora. En ausencia de DsbA, Dlp y Dle, *S. enteritidis* pierde significativamente su capacidad de virulencia, interrelacionado función bajo una misma ruta, que se reoxidan por DsbB vía oxidativa. Dle, no tiene función en movilidad. *Salmonella enteritidis* 82139 2C, carente de *dsbA* y *dlp* es recurso genético cepa vacunal y 82139 2CI requerirá futuras investigaciones.

Palabras claves: Proteínas TDOR vía periplasmica ruta oxidativa DsbAy Dlp y Dle; Proteínas TDOR cromosómico DsbAy Dle; Plasmídico Dlp en *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis 82139

ABSTRACT

Factorial design allows the elaboration, selection and determination of a vaccine strain of enteric *Salmonella* Serotype Enteritidis 82139 with validation of *dsbA*, *dle* and *dlp* gene function with respect to mobility capacity and intracellular bacterial invasion due to Minimum Significant Difference (DMS) and with 99% of confidence level for mobility and 95% for bacterial intracellular invasion. Results at 0.025 DMS and significantly different, Dle, does show invasiveness in MDCK at 1 hour of bacterial-host cell interaction, intracellular adherence-internalization phase. Dlp, highly homologous protein, capable of complementing *dsbA*- mutation. Dle, it presents specific and limited function. In the absence of DsbA and Dlp, its invasive capacity decreases at the 1st, 2nd and 4th hours of bacterial interaction. DsbA is decisive in the 1st hour of interaction; Dlp of plasmid location has complementary activity to DsbA, with a higher activity potential at 4th hour. In the absence of DsbA, Dlp and Dle, *S. enteritidis* significantly loses its virulence capacity, an interrelated function under the same pathway, which are reoxidized by DsbB oxidatively. Say, it has no function in mobility. *Salmonella enteritidis* 82139 2C, lacking *dsbA* and *dlp*, is a genetic resource for the vaccine strain and 82139 2CI will require future research.

Keywords: TDOR proteins via periplasmic oxidative pathway DsbAy Dlp and Dle; TDOR proteins of chromosomal DsbAy Dle; Plasmid Dlp in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis 82139.

1. INTRODUCCION

Un paso temprano en el estudio de la patogenia es la capacidad de penetrar en las células huésped, no siendo común para todas las bacterias patógenas. Para conocer el mecanismo funcional de los genes implicados se

requirió de la manipulación genética estructural, funcional y comparativa 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* y el Sistema TDOR Dsb (Villanueva L. *et al.*, 2003; Villanueva L. *et al.*, 2006; Zapun A. *et al.*, 1993; Zapun A. *et al.*, 1995; Zheng W. *et al.*, 1997).

Considerándose a DsbA como la principal proteína periplasmática del Sistema Dsb, tiol disulfuro óxido reductasa TDOR vía oxidativa, necesaria en la funcionalidad de toxinas, fimbrias, flagelos y componentes de sistemas de secreción de proteínas SSTT, cuyo productor DsbA es de importancia patogénica, presente en toda bacteria gram negativa, entre la ya demostrada su actividad en *Yersinia pestis* y *Shigella flexneri* y así como proteínas de virulencia que requieren de proteínas TDOR como es IpaC homóloga a SipC en *Salmonella*. También DsbA está presente en algunas bacterias gram positivas (Bardwell J., *et al.* 1994; Galán J. y Bliska J., 1996; Galán J., 2001; Guddat L. *et al.*, 1997; Rotger R., *et al.*, 1995; Rotger R. y Casadesús J., 1999).

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 mediante 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). De los resultados obtenidos de los ensayos "in vitro" se logra el objetivo principal de ésta presente investigación de la presentación del Diseño factorial que permite diseñar, elaborar, seleccionar y determinar una cepa vacunal. Y a la vez citar las técnicas moleculares y celulares para determinar una cepa vacunal de *Salmonella entérica* Serotipo Enteritidis 82139.

Las técnicas moleculares del Protocolo Molecular presentadas en la presente investigación también permitirán obtener de otras cepas posibles vacunas vivas atenuadas en su virulencia del género *Salmonella* como son: *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium* y *Salmonella heidelberg* e incluso servirá para distintos géneros como son de bacterias patógenas del enterón, gram negativas, tales como: *Vibrio*, *Shigella*, *Yersinia*, incluso contra *E. coli* enteropatógeno 0158 y *E. coli* Entero hemorrágico H7: 0157.

Actualmente se conoce en *E. coli* proteínas tiol disulfuro óxido - reductasas de ubicación citoplásmica y periplásmica. En la región citoplásmica se ha determinado la presencia de dos principales sistemas reductores: el sistema tiorredoxina, tiorredoxina / tiorredoxina reductasa, y la del glutatión / glutarredoxina; ambas requieren de electrones vía NADPH (Holmgren, 1979; Holmgren, 1989; Bardwell, 1994; Aslund, 1997; Fabianek et al, 1998; Chivers et al, 1997). Mientras que en el espacio periplásmico, se ha determinado tanto para *E.coli*, así como para muchas bacterias patógenas gram negativas, la presencia de un sistema específico Dsb (formación del plegamiento de puentes disulfuro) así como de proteínas homólogas a éste sistema, cuyas actividades favorecen a la formación de puentes disulfuro en proteínas secretadas las que se encuentran muchas de ellas implicadas en la virulencia de la bacteria; así como en la recuperación de la misma a su forma funcional. Estas proteínas periplasmáticas comprenden un sistema homólogo con la Superfamilia Thiorredoxina (citoplásmica), caracterizadas por presentar en su estructura terciaria, un dominio tiorredoxina Cys-Xaa-Xaa-Cys que funcionan como el centro catalizador de la actividad de dichas proteínas TDOR (Donnenberg M., 1997; Dmitrij Frishman, 1996; Chivers P. *et al.*, 1997; Fabianek R., *et al.*, 1998; Fabianek R. *et al.*, 2000; Finlay B. *et al.*, 1992; Finlay B. y Falkow S., 1997; Galán J., 1996; Galán J., 2001; Guddat L. *et al.*, 1997; Henderson I. y Nataro J., 2001; Holmgren A., 1989; Jun Yu, 1998).

DsbA está presente en todas las bacterias gram negativas y en algunas bacterias gram positivas. También han logrado determinar función DsbA y DsbB TDOR en género *Salmonella* (Gallant *et al.*, 2004. Heras *et al.*, 2010. Dongxia *et al.*, 2008. Tsuyoshi *et al.*, 2004. Kadokura *et al.*, 2002 y Kadokura *et al.*, 2004. Inaba *et al.*; 2004). También proponen un modelo de posible rol de DsbA y de disulfuro isomerasa DsbC proteínas responsables de plegamiento de puentes disulfuro (Hiniker et al., 2005).

La adhesión, mecanismo anterior a la invasión de cualquier tipo celular, en la que la bacteria debe encontrarse, reconocer receptores de tejidos preferidos que les permita adherirse al epitelio intestinal (proceso que involucra la acción de varias fimbrias o pili formadas por proteínas llamadas adhesinas, así como adhesinas no fimbriadas) y evitando de ésta manera ser eliminados. A pesar de que las regiones yeyuno e íleon tienen poca competencia, la flora residente es escasa o nula, la adherencia no es una tarea simple, los microorganismos se enfrentan a la primera barrera "la carga eléctrica". La superficie de los microbios y la superficie del huésped están cargadas en forma negativa, lo que provoca ser rechazados mutuamente. Sin embargo, las cargas en las superficies no están distribuidas en forma regular y los parches de mayor o menor negatividad permiten la atracción electrostática, con ayuda de fuerzas atrayentes más débiles como las uniones de hidrógeno, las fuerzas de Van der Waals y las interacciones hidrofóbicas. Lugares reconocidos que activan la expresión de varios tipos de fimbrias o pili, así como adhesinas no fimbriadas, aunque no todas las adhesinas son esencialmente factores de virulencia (Finlay y Falkow, 1997). La adherencia en general se producen específicamen-

te en receptores de naturaleza glicoproteica o glucolípidos presentes en las células huésped. Las fimbrias (pili) tipo 1 (típicas de Enterobacterias) tienen afinidad especial por las moléculas que contienen D-manosa en las mucosas del cual lípidos y proteínas son los receptores que permiten la adherencia bacteriana. (Galán J., 1996; Galán J., 2001; Gallant C. *et al.*, 2004; Guddat L. *et al.*, 1997; Henderson I. y Nataro J., 2001; Holmgren A., 1979; Holmgren A., 1989; Jun Yu, 1998).

La interacción bacteria – hospedador es una respuesta inmune a *Salmonella* invasiva; ciclo infeccioso de un parásito intracelular facultativo. Es uno de los puntos más importantes que se tomaron en cuenta en el estudio del presente trabajo experimental es el análisis de invasión bacteriana "*in vitro*", en presencia del gen plasmídico *dle* de *Salmonella enteritidis* en líneas celulares de mamíferos. Gen que codifica a proteína TDOR Dle con un homólogo centro activo Cys-Pro-Pro-Cys. La interacción bacteria – célula huésped es conocida como un proceso dinámico, durante el cual el patógeno está expuesto a diversos ambientes intra y extracelulares, cambios que son percibidos por la bacteria, provocándoles respuestas que le permite adaptarse a las nuevas condiciones y sobrevivir en ellas. La expresión de los genes implicados en la invasión a células epiteliales está finalmente requerida en respuesta a las condiciones ambientales presentes en el intestino de manera "*in vivo*", donde existe baja disponibilidad de oxígeno, carencia de hierro y alta osmolaridad, entre otros (Mekalanos, 1992). También se tomaron en cuenta la temperatura que influye sobre la capacidad de la bacteria en invadir células en cultivo. *Shigella flexneri* por ejemplo, es virulenta "*in vivo*" a 37°C pero no a 30°C, echo que correlaciona con la capacidad de invadir cultivos celulares a 37°C considerado tanto en estudios "*in vitro*" (Maurelli *et al.*, 1998). Consecuentemente, no sólo el fenotipo invasor es afectado por las condiciones medio ambientales, sino también la expresión de genes involucrados en este fenotipo es modificada por las condiciones del medio ambiente.

La línea de investigación de estudios de Proteínas de virulencia TDOR vía periplasmica ruta oxidativa DsbA y Dlp. Proteínas TDOR de ubicación cromosómica DsbA. Y extracromosómica (plasmídico) Dlp en *Salmonella enterica* serotype Enteritidis 82139. Luego del estudio de DsbA y Dlp, necesitó del uso de oligos para gen específicos (primer) *dlt* (presente en *S. typhi*) por su alta homología con el gen en estudio *dle* presente en *S. enteritidis* y ambos genes de ubicación cromosómica. Así también cuando se estudio el gen *dlp* de *S. enteritidis* se comparó con *srgA* de *Salmonella typhimurium* por ser ambas homólogas y de ubicación plasmídica, estructura que está ausente en *Salmonella typhi*, por no presentar plásmido. La alta homología entre la proteína Dle y Dlt permitió descubrir la igualdad en el efecto de su inactivación génica y el rol que cumplen la familia TDOR vía oxidativa (Agudo D., 2000; Castañares C., 2002; Rodríguez – Peña J. *et al.*, 1997; Rotger R. *et al.*, 1995; Rotger R. y Casadesús J., 1999; Villanueva L. y Rotger R., 2003).

DsbA está presente en todas las bacterias gram negativas y en algunas bacterias gram positivas. Especialmente en todas las bacterias del enterón como *Salmonella* entre otras presentan a una enzima TDOR líder del grupo como es DsbA, propiedad que logra por el tipo de aminoácido interno del centro activa, contiendo histidina un activador - catalizador caracterizado por su pKa y favorecida por la osmolaridad del medio (concentración de sales como es el NaCl), así también por el pH del medio del inóculo bacteriano y por su fase logarítmica tardía de la bacteria, fase en que la bacteria se encuentra codificando proteínas de virulencia desplegadas inactivas que requieren del puente disulfuro para su correcto plegamiento y función, que son el sustrato de la enzima DsbA, y de las demás enzimas TDOR (Guddat *et al.*, 1997).

Desde el punto de vista celular e inmunológico fue llegar hasta la obtención del logro de una cepa viva atenuada sin virulencia, concepto de cepa vacunal. El fundamento de este proyecto sustenta que bacteria del Género *Salmonella* tiene muchos genes que codifican proteínas de virulencia, tantas como tantas mutaciones tendría que realizar, de ahí el interés de mutar solo un pequeño grupo de genes implicados en la capacidad de virulencia y que requieran un correcto plegamiento de puentes disulfuro necesaria para su actividad. Del cual este trabajo de investigación sostuvo, si los factores de virulencia que son tantos requieren de la actividad de las enzimas TDOR para su correcto plegamiento y función. Y existe TDOR DsB y el gen líder TDOR DsbA que codifica proteína principal y determinante; mutacion en proteínas TDOR permite lograr obtener una cepa mutante y sin virulencia.

Una pronta respuesta inmune específica con producción de anticuerpos lograda por la presentación molecular de las Células Presentadoras de Antígeno (CPAg), se ha determinado en los macrófagos presentes en las células M del epitelio intestinal, hipótesis planteada al inicio del proyecto para *S. typhi* y *S. typhimurium* por invadir células basales que logran invadir y diseminarse vía sistémica por la activación de proteínas de virulencia perteneciente al sistema de proteínas codificadas por el islotes SPI 2 a diferencia de *Salmonella enteritidis* que solo invade células laterales que le permite invadir células vecinas del epitelio instestinal, por solo activarse las proteínas de virulencia pertenecientes a la isla de patogenicidad SPI 1.

Desde el punto de vista fisiológico e infección en persona “*in vivo*” existe la posibilidad de infectar *S. enteritidis* a macrófagos. Se ha determinado que ante consecutivas infecciones y daño del epitelio intestinal se cubre nuevamente y se reviste el epitelio con células de reserva de la zona de pliegues del epitelio intestinal llamada CRIPTA, estas células se encuentran en la base de las vellocidades, ahí se da la división de las células indiferenciadas inmaduras, las células migran a la punta de los vellos para reemplazar a las eliminadas, el proceso dura de 4 a 7 días. Sin embargo ante consecutivas infecciones también salen a recubrir el epitelio células M y son el talón de Aquiles, estas células no presentan cilios y no tienen la primera barrera de protección, de expulsar a microorganismos extraños y es fácil ser infectadas, pero en su interior presentan macrófagos, del que se sostuvo que *S. enteritidis* que es una bacteria muy frecuente en infecciones y también es de interés desde el punto de vista epidemiológico.

Otro propósito de la obtención de cepas mutantes a partir de *Salmonella enteritidis* es lograr una cepa vacunal con doble poder de inmunización, es decir la misma bacteria inicialmente utilizada de protección contra *Salmonella enteritidis*, podría ser también utilizada como vehículo de DNA inmunógeno específica en la producción de anticuerpo contra otras enfermedades entéricas producidas por otras bacterias patógenas cuya manipulación “*in vitro*” es difícil; y con la posibilidad de obtener vacunas que infecte células M y ser reconocida por macrófagos y producir inmunidad del huésped contra muchas bacterias, tal como es el caso contra infección por *Helicobacter pylori* que causa cáncer del estómago y/o del intestino.

La Estrategia del Protocolo Molecular presentada en la presente investigación a utilizarse para *Salmonella enteritidis* también podría utilizarse para *Salmonella typhimurium* bacteria capaz de causar infección sistémica cuyo DNA inmunógeno sea reconocida por otras células presentadoras de antígeno (CPAgs). Así como también útil para bacterias entéricas. Mutantes 82139 2C y 82139 2CI de *Salmonella enteritidis* aun presentan la característica de reconocer los receptores α -Dmanosa en los enterocitos que le permite la pronta actividad de adhesión, internalización, supervivencia, multiplicación y diseminación intracelular, propiedades con lo que podría la cepa vacunal viva atenuada en su virulencia lograr una pronta respuesta inmune, teniendo cuenta que las cepas nativas virulentas evaden la respuesta inmune. Mutantes de *S. enteritidis* que no presentan la capacidad de infección sistémica como lo hace *S. typhimurium*, presenta la ventaja de provocar una infección menos agresiva durante el proceso de inmunización como cepa vacunal *S. typhimurium* que presenta otras islas de patogenicidad como SPI 2, 3 y 5 que causan infección sistémica que produce un proceso infeccioso muy agresivo, estas ventajas y desventajas es por lo que se recomienda la determinación mediante ensayos del uso de cepas vacunales y específicos tanto de *S. enteritidis* como de *S. typhimurium* en vacunas de doble inmunización.

La finalidad de la validación de los datos determinados en citogenética del gen *dle* mediante el uso del Diseño factorial, es para dar la validez científica a los Protocolos Molecular y Celular, cuyos ensayos “*in vitro*” sean repetitivos y representativos a lo esperado “*in vivo*”. De ayuda al éxito de cepas vacunales a priori a los ensayos *in vivo*. La proteína Dle codificada por el gen *dle*, se estudió en la presente tesis por efectos de inactivación y complementación génica, y se comparó su funcionalidad con las demás genes codificadores de TDOR vía oxidativa como son: Dlp y DsbA en *S. enteritidis*, SrgA (orf8) en *Salmonella typhimurium* y *dlt* en *S. typhi*. Desde un inicio se sospechó a priori a los ensayos “*in vitro*”, que Dle no tendría la misma capacidad que DsbA, por estudios de caracterización proteómica y del centro activo de la proteína – enzima TDOR de Dle cuyos aminoácidos internos del centro activo tienen la desventaja que la enzima presenta dos Prolinas y no Histidina como el caso, en DsbA. Histidina es un activador-catalizador de reacción óxido reducción reversible del centro activo. Sin embargo, esta investigación permitió terminar con la culminación de los estudios y de la esquematización del sistema funcional biológico de las enzimas de la familia TDOR en *S. enteritidis* por ensayos “*in vitro*”.

De acuerdo a la ubicación del sitio activo Cys-Xaa-Xaa-Cys de las proteínas TDOR de actividad periplásmicas familia Dsb, como es en DsbA; incluyendo a Dlp, Dlt y Dle, permitió por estudios de genómica estructural y comparativa determinar que, proteínas TDOR de ubicación y actividad vía oxidativa presentan un solo sitio activo, estando su centro catalizador ubicado en la región α hélice del dominio A en la parte N-terminal de la proteína. A diferencia de DsbB, proteínas de membrana interna que presenta dos sitios activos, el de ubicación N-terminal con función de reoxidación de la misma (Kadokura H. y Beckwith J. 2002). Mientras que proteínas tiol periplásmicas TDOR con actividad ruta reductora, presentan su sitio activo en la región C-terminal. En la Línea de investigación de *Salmonella* de la presente investigación, ha determinado proteínas periplásmicas TDOR de *S. enteritidis*, a Dlp y Dle; y Dlt en *S. typhi*, proteínas que conservan la característica del centro catalizador y homología con respecto a sus dos aminoácidos internos prolina-prolina (Pro-Pro).

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- PROTOCOLO EN DETERMINACIÓN DE MOVILIDAD. Se utilizó el protocolo de Mendoza del Cueto y Rotger, 2002

A.1.- Reactivación de células bacterianas.- se reactivó las cepas en estudio obtenidas a partir de *Salmonella enteritidis* 82139, elaboradas a partir del diseño factorial. Se utilizó inóculos de los viales correspondientes y sembrados en agar Luria Bertoni (agar LB) conteniendo su respectivo marcador-antibiótico, si lo requiere. Las placas con agar LB sembradas se incubaron durante 24 horas (o/n, durante la noche) a 37°C. Como marcador molecular en mutantes *dsbA*- se utilizó el antibiótico cloranfenicol.

A.2.- 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.

A.3.- Recolección de datos.- se determinó la movilidad de las cepas de *S. enteritidis* mediante la medición de la colonia por desplazamiento de la bacteria en mm, las que fueron expresados en %. Se tuvo en cuenta el diámetro de 3 mm de inóculo inicial y las medidas fueron tomadas después de 16 horas de incubación (o/n) a 37°C.

2.2.- PROTOCOLO MOLECULAR

A.1.- EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO DE *Escherichia coli*.- MÉTODO MAXIPRÉP.

A.2.- EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO DE *Escherichia coli*.-METODO MINIPREP.- Extracción rápida

A.3.- ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

A.4.- EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.

A.5.- ELECTROELUCION DE DNA

APARTIR DE PRODUCTO DE PCR, DNA EN SOLUCION

APARTIR DE GELES DE AGAROSA

A.6.- OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES de *Escherichia coli*

A.7.- TRANSFORMACION EN CÉLULAS COMPETENTES DE *Escherichia coli*.

A.8.- MÉTODO DE ELECTROPORACIÓN PARA LA OBTENCION MUTANTE DE *Salmonella*.

A.8.1.-PREPARACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES.

A.8.2.- ELECTROPORACIÓN DE *Salmonella*.

A9.- OBTENCIÓN DE DOBLE MUTANTE 82139 2CI (*Salmonella enteritidis* curada y con interrupción de genes cromosómicos *dsbA* y *dle*) UTILIZANDO FAGO P22 MEDIANTE EL METODO DE TRANSDUCCIÓN.- Método protocolizado por el laboratorio perteneciente a la línea de investigación de *Salmonella*.

9.1.- Producción de Fagos.

9.2.- Titulación de Fagos apartir de lisados.

9.3.- Obtención de la cepas triples mutantes 82139 2CI por el método de Transducción.

9.3.1.- PRIMERA FASE

9.3.2.- SEGUNDA FASE – TRANSDUCCION DEL DNA

9.3.3.- TERCERA FASE : OBTENCION DE MUTANTES

A 10.- SECUENCIACION AUTOMATIZADA DE DNA

A.11.- AMPLIFICACIÓN DE DNA MEDIANTE P.C.R Star

FASES DE LA AMPLIFICACION DEL DNA, MEDIANTE LA TECNICA DEL PCR Star:

1.- Fase de desnaturalización.

2.- Fase de alineamiento.

3.- Fase de síntesis.

A.12.- VERIFICACION DE LA OBTENCIÓN DE LA TRIPLE MUTANTE 82139 2CI, OBTENIDA POR TRANSDUCCIÓN.-

a.- Diseños de oligos:

Se diseñó en el Laboratorio de la Línea de *Salmonella* - Dpto 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 *dle*.- diseñados por Agudo, 2000 y Villanueva, et al., 2003.

Ndle1 : 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 doble mutante 82139 2C I utilizando el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando un termociclador Mini Cyclor TM MJ Research.

A.13.- TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS DEL DNA REQUERIDOS EN CLONACIÓN.-

. DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN.-

. LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA.

2.3.- PROTOCOLO CELULAR: ENSAYOS DE INVASIÓN EN LÍNEAS CELULARES CON *Salmonella enteritidis* 82139. Finlay B. et al., 1992; Finlay B. y Falkow S. 1997.

- **Reactivación de células epiteliales de mamífero MDCK.** Se procedió a la reactivación de células MDCK, descongelando viales conservados en nitrógeno líquido en 5ml. de medio DMEM (medio mínimo esencial para el crecimiento rápido de la línea celular), las cuales fueron sembradas en Flask de 75 cm³ de capacidad que contuvieron previamente medio DMEM. Se mantuvo el cultivo de células en medio DMEM hasta conseguir la formación de una monocapa con una confluencia del 90%.
- **Obtención de las monocapas de MDCK ó Henle 407 en placas multipocillo,** a partir de pase IV en fase log a concentraciones de 2,5 x 10⁵ cél/ pocillo/ ml. DMEN suplementado con STF al 10% en condiciones de 37°C , al 5% CO² y durante 16 horas (o/n).
- **Obtención de preinóculos e inóculos bacterianos utilizando las diferentes cepas bacterianas a estudiar su capacidad invasiva en líneas celulares MDCK y Henle 407.** Se obtuvo preinóculos en fase log en medio LB (agar Luria Bertoni) en sistema de agitación y aireación, de los cuales se obtuvieron los respectivos inóculos a inicios de la fase log terminal, utilizando LB suplementado hasta 0,3 M de NaCl en condiciones de reposo durante o/n (16 horas) a 37°C. Se utilizó marcadores moleculares en caldo y agar LB dependiendo de la mutación, en mutantes *dsbA* se utilizará el antibiótico cloramfenicol para *dsbA* y para *dle*, kanamicina. La concentración bacteriana fue medida con una D.O. 600 de 0,8 a 0,9.
- **Infección en células epiteliales Henle 407 y en MDCK,** en las correspondientes monocapas obtenidas a partir de cada línea celular.- se procedió a la infección con las diferentes cepas de *S. enteritidis* 82139C en proporción de 1:100 por pocillo. Se agregó 5x10⁵ células en pase VI / por pocillo fijadas o/n hasta lograr la monocapa y luego de inocular las 5x10⁷ bacterias en fase logarítmica (adfa / pocillo). Antes del proceso de infección bacteriana se realizó el recambio del medio DMEN de forma igual para cada mutante inactivadas y complementadas y luego se procedde a la infección bacteriana. Durante el ensayo de infección y posterior al T=0 (a 1h) a los pocillos celulares se les recambió el medio por DMEN conteniendo gentamicina 100µg/ml, en las horas restantes el recambio del medio DMEN empleado presentará solo gentamicina al 10µg/ml. Las condiciones de infección dadas en los ensayos experimentales fueron de 37°C a 5% de CO₂.
- **Recuperación de las células bacterianas invasivas de las respectivas monocapas Henle 407 y MDCK infectadas posterior a Tiempos de 1, 2, 3 y 4 horas de interacción bacteria – célula huésped respectivamente.** Se procedió a la lisis celular provocada con desoxicolato sódico al 0,1% en PBS a pH 8,0 y en frío, durante un tiempo de contacto no mayor de 10 min. Las bacterias internalizadas libres en suspensión recuperadas se procedió a liberar del desoxicolato sódico por centrifugación a 5000 RPM durante 10 minutos y recuperando a las bacterias en 1 mL de caldo LB del que se homogenizó el sedimento en el medio de cultivo bacteriano en un vortex del que se cogió 100uL que fueron sembrados previa diluciones en diferentes placas de agar LB conteniendo el marcador de antibiótico de dependiendo del tipo de mutante y extrayendo el sobrenadante. Del botón bacteriano formado se resuspendió en caldo LB y se realizó diluciones las veces requeridas de acuerdo a los tiempos de infección y a lo requerido para el tipo de mutación, ya previamente estandarizada conteniendo en el caldo LB, el antibiótico específico a la mutación, como marcador de expresión. El

sembrado homogéneo y estandarizado para el protocolo que debe ser un proceso rápido se recomienda el uso del tipo de sembrado bacteriano utilizando: el sembrado superficial haciendo uso de bolitas de vidrio estériles. Luego se llevó las placas de agar LB sembradas y debidamente rotuladas con cada mutante y por dilución empleada a incubación por 48 horas. Luego de la incubación se procedió al conteo de forma manual o por contador automático.

- **Incubación de las placas a 37°C durante 24 a 48 horas.**
- **Recuento de las bacterias invasivas “internalizadas”** fueron determinadas durante 1, 2, 3 y 4 horas de infección, correspondiente a T= 0, 1, 2 y 3.
- **Determinación del % del fenotipo de expresión de invasión con respecto al tiempo 1, 2, 3 y 4 horas de infección bacteriana.** Los % se determinaron comparando T=0 (a 1 hora de contacto) con respecto a la concentración inicial infectiva utilizada. Las demás fases también se determinaron comparando con la concentración anterior a ésta.
- **Determinación de la expresión fenotípica de invasión del gen en estudio *dle*.** Se validó la función génica por análisis estadísticos mediante el Análisis de Varianza: ANAVA y de la prueba de Diferenciación Mínima Significativa (DMS), para un Diseño Factorial 2K Fraccionada (con datos faltantes) y considerando un nivel de significancia del 0.05.
- **Conservación de las cepas mutantes bacterianas (Cepas Vacunales).** Luego de la obtención de clones, de cepas mutantes en medio agar LB. Se procede a realizar un cultivo joven de 3 horas en caldo LB conteniendo el respectivo marcador molecular. Luego se centrifugó 10 ml del cultivo LB de 12 horas de incubación en sistema de aireación y agitación y se recuperó el sedimento bacteriano agregando 500 µl de caldo LB en un vial y añadiendo 500 µl de glicerol al 70%. Inmediatamente se homogenizó todo el contenido utilizando un vortex y se llevó los viales debidamente rotulados a congelamiento rápido en un contenedor de viales a -70°C. También se puede tener un set adicional de viales conteniendo las diferentes cepas a -20°C. El Proceso de congelamiento rápido a -70°C permite un tiempo mayor de conservación de las cepas mutantes a largo plazo entre 7 a 10 años de viabilidad de cepas mutantes.
- **Determinación de la actividad de movilidad.** Se Utilizó el Protocolo Standarizado descrito por Mendoza del Cueto, 2002 (Tesis Doctoral) basado en los ensayos previos de Eichelberg y Galán, 2000.
- **El Protocolo Celular de uso validado por Métodos estadísticos** según Hernández S. *et al.*, 1999. Se realizó el análisis de Diferencia Mínima Significativa (DMS) utilizando el Diseño Factorial y con nivel de confianza del 99% para movilidad y de 95% para ensayos de invasión bacteriana. Que permitieron que los ensayos *in vitro* de capacidad de movilidad y de invasión bacteriana intracelular utilizando cepas vivas atenuadas en su virulencia a partir de *Salmonella enterica* Serotipo Enteritidis 82139, sean Modelo de Determinación de una cepa vacunal

3.- RESULTADOS Y DISCUSION

A pesar de las determinaciones logradas en este trabajo, cabe enfatizar que, **la función de proteínas Tiol periplásmicas vía oxidativa en *Salmonella enteritidis* es mucho más compleja** durante el mecanismo de invasión en células epiteliales de mamífero; donde la función determinante de **DsbA** (proteína TDOR del **Sistema Dsb**) se le asocia con la funcionalidad de los principales factores de virulencia: flagelos, fimbrias y proteínas de virulencia. Asimismo, la actividad complementaria de **Dlp (no Dsb) a DsbA** determina que también presenta actividad tiol periplásmicas vía oxidativa, siendo posible que tengan actividad común con algunas fimbrias e invasinas, codificadas por genes plasmídicos y/o cromosómicos; y que la función de **Dle** (al igual que Dlp, proteína TDOR del Sistema **no Dsb**) se le asocia solo con la biosíntesis con fimbrias. **Donde, DsbA, Dlp y Dle serían dependientes de DsbB por presentar su centro activo en el extremo N-terminal, diferencia de las proteínas Tiol periplásmicas vía oxidativa, que lo presentan en la parte C-terminal.**

En resumen, los ensayos “*in vitro*” de movilidad y capacidad invasiva permite relacionar la función Tiol periplásmicas vía oxidativa de **DsbA, Dlp y Dle** permitiendo la funcionalidad de factores de virulencia, como: **flagelos, fimbrias y proteínas de virulencia**, con el correspondiente ensamblaje, translocación y/o inserción de **flagelinas, adhesinas e invasinas**, que presenten uno o más residuos de cisteína.

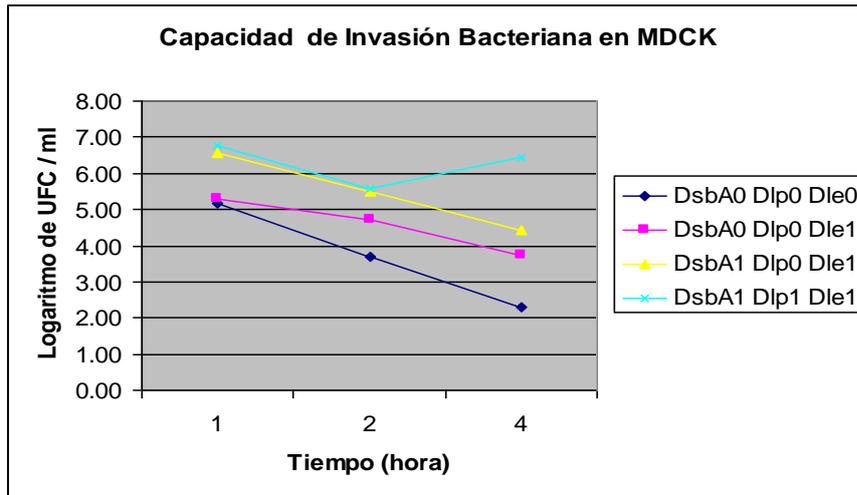


Figura 1. Estudio comparativo del efecto de los fondos proteicos: DsbA1Dlp1Dle1, DsbA1Dlp0Dle1, DsbA0Dlp0Dle1, DsbA0Dlp0Dle0, en la capacidad invasiva de *Salmonella enteritidis* en MDCK en las primeras cuatro horas de interacción bacteria – célula huésped, expresadas en unidades logarítmicas.

- **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.

El código cero (0) de los tres factores, equivale en ausencia de DsbA, Dlp ó Dle

El código uno (1) de los tres factores, equivale en presencia de DsbA, Dlp ó Dle.

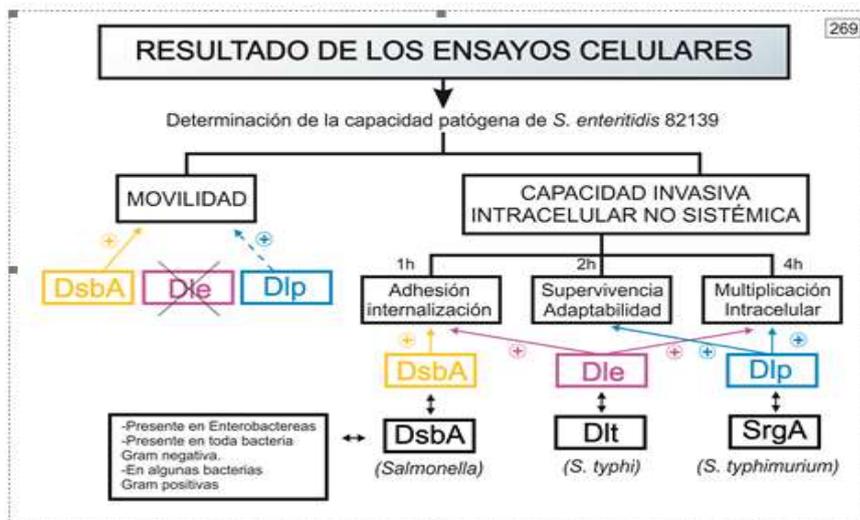


Figura 2. Determinación de la capacidad patogénica en movilidad y capacidad invasiva intracelular no sistémica de *Salmonella enteritidis* 82139 en MDCK en las primeras cuatro horas de interacción bacteria – célula huésped.

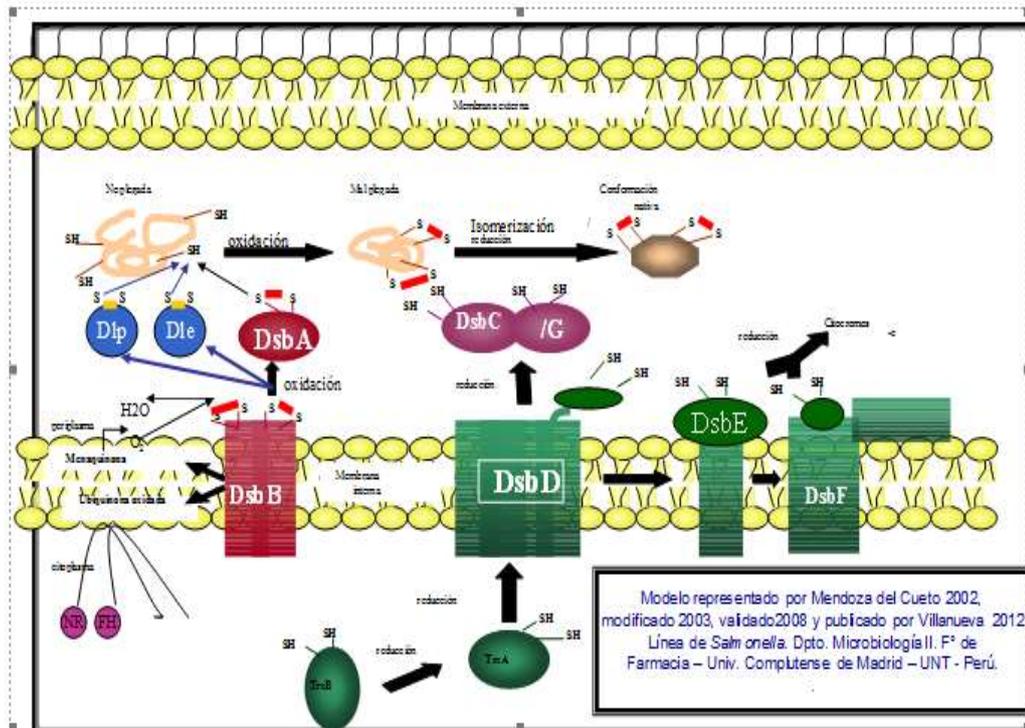


Figura 3. Modelo hipotético del funcionamiento de las proteínas del sistema Dsb: B-A; Dlp y Dle; D – C/G y E/F con actividad reconstructiva de puentes disulfuro óxido reductasas de actividad en el espacio periplásmico bacteriano.

4.- CONCLUSIONES

Se determinó ensayos “*in vitro*” que permitan el éxito futuro a ensayos de infecciones bacterianas con una cepa vacunal de *Salmonella entérica* Serotipo Enteritidis 82139 2C “*in vivo*”.

Se determinó que la movilidad y biosíntesis de flagelos en *Salmonella entérica* Serotipo Enteritidis 82139, cepa nativa portadora de plásmido, está determinada por la proteína TDOR cromosómica DsbA. Dlp (de ubicación plasmídica), presenta una función complementaria a DsbA. Y la Proteína Dle no tiene ninguna función. La prueba de movilidad fue determinada con un nivel de significancia de 1% y un nivel de confianza y certeza del 99% y la prueba de capacidad invasiva fue determinada con un nivel de significancia de 5% y un nivel de confianza de 95%. Se obtuvieron Coeficientes de Variación de 4.96% en los ensayos de movilidad y de 3.93% en los ensayos de capacidad invasiva intracelular, comparado con un límite de aceptabilidad del 30%, que indica una buena calidad en la obtención de datos.

La capacidad invasiva intracelular de tipo no sistémico en *Salmonella entérica* Serotipo enteritidis 82139 portadora de plásmido también está determinada por la proteína DsbA, tanto en células de mamífero MDCK, y Dlp presenta una función complementaria a DsbA. Dle sólo tendría una función TDOR específica y limitada, asociada solo a la biosíntesis de fimbrias del operón SEF, específico de *Salmonella enteritidis*. Se ha definido las condiciones adecuadas para realizar ensayos reproducibles de infección *in vitro* por *Salmonella enteritidis* en monocapas de líneas celulares. Es esencial que el cultivo bacteriano utilizado como preinóculo de la cepa silvestre como de las mutantes se encuentren en fase logarítmica. Y los inóculos (cepas vacunales) a inicios de la fase logarítmica tardía en caldo Luria Bertoni (LB) con una osmolaridad final de 0,3mM de NaCl, inductor de la actividad TDOR vía oxidativa

DsbA no es considerada una proteína de virulencia, pero si una proteína periplásmica TDOR vía oxidativa con un centro activo Cys-His-Pro-Cys responsable del correcto plegamiento de puentes disulfuro, su inactividad afecta la configuración tridimensional de las proteínas en su forma activa, por lo que mutantes *dsbA* se ve afectada la capacidad de invasión intracelular en células MDCK y Henle 407. DsbA presenta actividad en las tres etapas correspondientes a la primera fase de infección bacteriana de tipo intracelular no sistémico, **siendo determinante la función de la enzima DsbA en la primera hora** infectiva de interacción bacteria – célula huésped correspondiente a la etapa **de adhesión e internalización bacteriana**.

La actividad de Dle favorece a la primera Fase infectiva de tipo celular no sistémico, en la correspondiente primera etapa, **la de adhesión e internalización**, similar función que DsbA pero no determinante como lo es DsbA. Existe una relación entre Dle con DsbA, ambas proteínas son codificadas por genes cromosómicos. También Dle es una proteína homóloga a Dlt presente en *Salmonella typhi*, codificadas ambas por genes cromosómicos. También se determinó la pérdida de actividad invasiva en ausencia de *dle* de una unidad logarítmica de microorganismos invasivos correspondientes a 2 y 4 horas de interacción correspondientemente **a las fases de supervivencia y multiplicación**. Aunque esta función es muy limitada para Dle y determinante para Dlp. Existe una relación de alta homología entre los genes codificadores de Dle y Dlp, ambas proteínas periplásmicas TDOR vía oxidativa codificadas tienen idéntico centro activo Cys-Pro-Pro-Cys.

Ante la ausencia de Dlp en un fondo proteico DsbA1Dlp0Dle1, existe marcada disminución del recuento de bacterias intracelulares a 2 y 4 horas de interacción bacteria – célula huésped; tiempos correspondientes a la segunda y tercera etapa de la primera fase infectiva de tipo intracelular no sistémico, que son: **la supervivencia bacteriana y multiplicación intracelular**. Con una función determinante de Dlp en la etapa de multiplicación intracelular de la bacteria. Propiedad que caracteriza a los plásmidos portadores de proteínas de virulencia. La función del plásmido está relacionada con la función de Dlp. Dlp no solo está asociada con la funcionalidad del operón de fimbrias PEF, también está localizado cerca al operón de virulencia *spv*, también ambos de ubicación plasmídica. A pesar que Dlp es de ubicación plasmídica la actividad TDOR de Dlp es complementaria su función a DsbA con ciertas proteínas. A diferencia *dsbA* codificador de la proteína TDOR DsbA, es de origen cromosómico.

La función TDOR vía oxidativa no solo está asociada a la formación de puentes disulfuro importante en la presentación del centro activo de las proteínas de virulencia, también puede servir en su translocación e inserción de ciertas proteínas llamadas factores de virulencia. Las proteínas TDOR actúan tanto en proteínas de localización intracelular de función estructural de la bacteria como en muchas invasinas que son proteínas de virulencia de tipo extracelular, que actúan en el medio, como otras inyectadas dentro de la célula huésped que le sirven para evadir la respuesta inmune, tal es el caso de SpiC.

El éxito del hallazgo de la actividad de las proteínas periplásmicas de la Familia TDOR vía oxidativa en DsbA, Dlp y Dle en *Salmonella enteritidis* y la determinación de posibles cepas vacunales fue lograda por la exigencia, eficiencia y eficacia en la estrategia del uso del Diseño Factorial en la Investigación.

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, en el clonaje tiene la ventaja de que las bacterias pueden determinarse su expresión fenotípica.

La cepa doble mutante 82139 2C, considerada en el concepto de vacuna carente de los genes *dsbA* y *dlp*; mientras que la triple mutante 82139 2CI carente de los genes *dsbA*, *dlp* y *dle* **constituye avances a favor de la ciencia de conocimiento básico**, aunque ambas **constituyen en potenciales recursos genéticos para ser usados como cepas vacunales**; debido a que inactivados los genes mencionados no se codifican proteínas de virulencia activas, su función de las proteínas periplásmicas Tiol Disulfuro Oxido reductasas (TDOR) de DsbA, Dlp y Dle, atenua la inducción de los puentes disulfuros y con ello del correcto plegamiento y/o transporte de: proteínas de virulencia, fimbrias y flagelos, afectado el correspondiente ensamblaje, translocación y/o inserción de proteínas como son: flagelinas, adhesinas e invasinas, que presenten uno o más residuos de cisteína. Y cepa triple mutante fue muy útil su manipulación genética para usos de investigación científica y para nuevos conocimientos teóricos, importante para la ciencia.

dsbA es un gen cromosómico presente en toda bacteria gram negativa y en algunas bacterias gram positivas. Por lo que el empleo de los Protocolos Molecular y Celular del presente trabajo no sólo permitió determinar la función de la proteína TDOR, también obtener una cepa viva atenuada (modificada genéticamente) sin virulencia (afectada sus factores de virulencia: proteínas de virulencia, fimbrias y flagelinas) que podría ser una nueva cepa de *Salmonella enteritidis* 82139 con posible uso como cepa vacunal y no solo utilizada como vacuna, de protección contra la patogenicidad de ésta bacteria en estudio sino empleada como segunda inmunización; es decir, como vehículo molecular de DNA exógeno recombinante e inmunógeno contra otros agentes patógenos del enterón de difícil manipulación *in vitro*, como es el caso de *Helicobacter pylori*, entre otras.

**“Si se Conoce en su Totalidad a la bacteria permitirá eliminarla de la faz de la Tierra”.
No puede existir un mundo sin vacunas. “Un mundo sin vacunas no es mundo” “Niños desprotegidos de vacunas ante enfermedades provocaría la muerte desde jóvenes aun sin tiempo de procreación y daría el comienzo de la extinción de la raza humana en la Tierra y de la belleza de la creación del ser humano”. “Con solo padecer enfermedades mortales ya no es vida”...**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agudo, D. 2000. Efecto de la mutación *dsbA* sobre el crecimiento y expresión del gen *spvB* de *Salmonella*. Tesina de Licenciatura. Departamento de Microbiología - Fac de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid – España
- Bardwell, J.; Lee, J.; Jander, G.; Martin, M.; Berlin, D.; Berckwith, J. 1994. A pathway for disulphide bond formation in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 1038 – 1042.
- Castañares, C. 2002. Clonación del gen *rck* de *Salmonella enteritidis* para el estudio de su función en la invasión de células de mamífero. Tesina de Licenciatura. Departamento de Microbiología - Fac de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid – España
- Donnenberg, M. ; Zhang, H.; Stone, K. 1997. Biogenesis of the bundle- forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*: reconstitution of fimbriae in recombinant *E. coli* and role of DsbA in pilin stability – a review. Gene 192: 33 – 38.
- Dmitrij, F. 1996. DsbC Protein: A New member of the thiorredoxin fold – containig family. Biochemical and Biophysical Research Communications 219, 686 – 689. Article N° 0295.
- Dongxia, Lin.; Rao, CH.; Slauch, J. 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, 190(1): 87-97.
- Chivers, P.; Prehoda, K.; Raines, R. 1997. The CXXC Motif: A Rheostat in the Active Site. The American Chemical Society. 36(14): 4061- 6
- Heras, B.; Totsika, M.; Jarrott, R.; Shouldice, S.; Guncar, G.; Achard, M.; Timothy, J.; Argente, M.; Alastair G.; McEwan, and Schembri M. 2010. Structural and Functional Characterization of Three DsbA Paralogs from *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. Journal of Biological Chemistry. 285(24): 18423–18432
- Hernández, S., Fernández C. y Baptista L. 1999. Metodología de la Investigación. 2da. Edic. Editorial Mc GRAW – HILL. México D.F. México. 497 pp
- Hiniker, A.; Collet, Jean – Francois.; Bardwell, J.; Footnotes, Sh. 2005. Cooper Stress Causes na in vivo Requeriment for the *Escherichia coli* Disulfide Isomerase DsbC. Journal of Biology Chemistry . Protein Structure and folfing ISSUE 280 (40): 3785-33791
<https://doi.org/10.107/jbc.M505742200>
- Inaba, K.; Takahashi, YH.; Fujieda, N.; Kano. K.; Miyoshi, H.; Ito, K.. 2004. DsbB elicits a red-shift of bound ubiquinone during the catalysis of DsbA oxidation. J Biol Chem, 279: 6761-6768.
- Fabianek, R.; Hennecke, H.; Thöny – Meyer, L. 1998. The active – site cysteines of the periplasmic Thiorredoxin – like protein CcmG of *Escherichia coli* are important but not essential for cytochrome c maturation in vivo. Journal of Bacteriology 180: 1947 – 1950.
- Fabianek, R.; Hennecke, H.; Thony – Meyer, L. 2000. Periplasmic protein thiol disulfide oxidoreductases of *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Rev. 24: 303 – 316.
- Finlay, B.; Leung, K.; Rosenshine, I.; García del Portillo, F. 1992. *Salmonella* interactions with the epithelial cell. ASM News 58: 486 – 489.
- Finlay, B. y Falkow, S. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. Microbiology and molecular biology reviews 61: 136 – 169.
- Galán, J. y Bliska, J. 1996. Cross – talk between bacterial pathogens and their host cells. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12: 221 – 255.
- Gallant, C.; Ponnampalam, T.; Spencer, H.; Hinton, J.; Martin, N. 2004. H-NS Represses *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium *dsbA* Expression during Exponential Growth. Journal of bacteriology. 186 (4): 910–918
- Guddat, L.; Bardwell, J.; Glockshuber, R.; Huber – Wunderlich, M.; Zander, T.; Martin, J. 1997. Structural analysis of three His 32 mutants of DsbA: support for an electrostatic role of His 32 in DsbA stability. Protein Science 6: 1893 – 1900.
- Holmgren, A. 1989. Thiorredoxin and glutaredoxin systems. The Journal of Biological Chemistry 264: 13963 - 13966

- Jun, Yu. 1998. Inactivation of DsbA, but not DsbC and DsbD, Affects the intracellular survival and virulence of *Shigella flexneri*. Infection and immunity. American Society for Microbiology. 66 (8): 3909-3917.
- Kadokura, H. y Beckwith, J. 2002. Four cysteines of the membrane protein DsbB act in concert to oxidize its substrate DsbA. The EMBO Journal. 21 (10): 2354 – 2363.
- Kadokura, H.; Tian, H.; Zander, T.; Bardwell JC.; Beckwith, J. 2004. Snapshots of DsbA in action: detection of proteins in the process of oxidative folding. Science, 303:534-537.
- 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: Microbiología Clínica Molecular. España.
- Rodríguez – Peña, J.; Buisán, M., Ibáñez, M.; Rotger, R. 1997. Genetic map of the virulence of *Salmonella enteritidis* and nucleotide sequence of its replicons. Gene. 188: 53 – 61.
- Rotger, R.; Rodríguez – Peña, J.; Buisán, M.; Ibáñez, M. 1995. Genética de la virulencia de *Salmonella*. Microbiología y Genética Molecular. Tomo I: 13 – 27. Editorial Universidad UCM - Madrid – España
- Rotger, R. y Casadesús, J. 1999. The virulence plasmid of *Salmonella*. Internatl. Microbiol. Tomo 2 : 177 – 184. Editorial Universidad UCM - Madrid – España
- Tsuyoshi, M.; Okada N.; Danbara H. 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. Journal of Biological Chemistry. 279 (33): 34631–34642
- Villanueva, L. y Rotger, R. 2003. Efectos de la Inactivación y Complementación del gen *dle* de *Salmonella enteritidis*. Tesis Doctoral – DEA. Departamento de Microbiología II – Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid – España.
- Zapun, A.; Bardwell, J.; Creighton, T. 1993. The reactive and destabilizing disulfide bond of DsbA, a protein required for protein disulfide bond formation in vivo. Biochemistry 32: 5083 – 5092.
- Zapun, A.; Missiakas, D.; Creighton T. 1995. Structural and functional characterization of DsbC, a protein involved in disulfide bond formation in *Escherichia coli*. Biochemistry 34: 5075 – 5089.
- 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.