UNIVERSIDAD ANDRES BELLO
Facultad de Ciencias de la Vida
Carrera de Biología

“COMPARACIÓN DE LA PRESENCIA DEL FACTOR DE VIRULENCIA SopB DE *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR TYPHI ENTRE MUESTRAS EXTRAÍDAS EN CONDICIONES DE INFECCIÓN INTESTINAL Y CONDICIONES DE LABORATORIO”

Tesis presentada como parte de los requisitos
para optar al Grado de Licenciado en Biología.

Eduardo Ignacio Dercolto Gálvez.
Director de Tesis: Juan Fuentes Aravena.

Santiago de Chile,
2023

.

UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO

Facultad de Ciencias de la Vida

Carrera de Biología

“COMPARACIÓN DE LA PRESENCIA DEL FACTOR DE VIRULENCIA SopB DE *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR TYPHI ENTRE MUESTRAS EXTRAÍDAS EN CONDICIÓN INTESTINAL Y CONDICIONES DE LABORATORIO.”

Eduardo Ignacio Dercolto Gálvez.

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del Director de Tesis, Dr. Juan Fuentes, en el Laboratorio de genética y patogénesis bacteriana, Universidad Andrés Bello y aprobado por los miembros de la Comisión de Evaluación.

_____

Dr. Juan Fuentes

Director de Tesis

_____

Dra. Lillian Acuña

Comisión de Tesis

_____

Dr. Fernando Gil

Comisión de Tesis

Santiago de Chile, 2023.

ÍNDICE

1. RESUMEN viii

2. ABSTRACT ix

3. INTRODUCCIÓN 1

3.1 *Salmonella enterica* serovar Typhi 1
3.1.1 Ciclo infectivo 3
3.1.2 Sistemas de secreción y sus efectores 5

3.2 SopB 7
3.2.1 SopB y su expresión 8

3.3 OMVs 9
3.3.1 Biogénesis de OMVs 10
3.3.2 Funciones de las OMVs 10
3.3.3 Vesiculación y condiciones ambientales 11
3.3.4 OMVs y efectores 12

3.4 *S.* Typhi y las condiciones intestinales. 14

4. HIPÓTESIS 18

5. OBJETIVOS 18

5.1 Objetivo general 18

5.2 Objetivos específicos 18

6. METODOLOGÍA. 19

6.1 Generar la cepa de *S.* Typhi que presente la construcción *sopB*-3×FLAG. 19
6.1.1 Racional. 19
6.1.2 Estrategia experimental 1. 19
6.1.3 Metodología 1. 20

6.2 Comparar la presencia de SopB en muestras de *S.* Typhi obtenidas desde un cultivo con condiciones estándar de laboratorio y desde un cultivo con condiciones similares a la etapa intestinal del ciclo infectivo 22
6.2.1 Racional. 22
6.2.2 Estrategia experimental 2. 23
6.2.3 Metodología 2. 23

7. RESULTADOS. 24

7.1 Generar la cepa que presente la construcción *sopB*-3×FLAG. 24
7.1.1 Trabajo previo *In silico.* 24
7.1.2 Prueba de partidores y transformación de la cepa 28
7.1.3 Comprobación de la construcción 30

7.2 Comparar la presencia de la proteína SopB en la fracción celular y el sobrenadante de *Salmonella* Typhi cultivada en condiciones estándar de laboratorio y condiciones asociadas a la etapa intestinal de su ciclo infectivo. 38
7.2.1 Western Blot 38
8. DISCUSIÓN 41
8.1 De la construcción de la cepa 41
8.2 De la presencia de SopB 43
9. CONCLUSIONES 47
10. BIBLIOGRAFÍA 49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Número de casos y tasa de incidencia de fiebre tifoidea y paratifoidea. Chile, años 2014 - 2018(*) 2
Figura 2 Modelo detallado del sistema de secreción de tipo tres de la isla de patogenicidad 1 (TTSS-1). 6
Figura 3 Modelo de la patogenicidad de *Salmonella* durante la fase intestinal. 7
Figura 4. Tamaño de las OMVs de S. Typhi cultivadas aeróbicamente a 37°C en 2 medios. 12
Figura 5. internalización de las OMVs de S. Typhi a las células epiteliales HT-29. 16
Figura 6. Regiones donde alinean los partidores creados para realizar el inserto del epítopo 3×FLAG. 26
Figura 7. Regiones donde alinean los partidores comprobatorios del constructo sopB-3×FLAG..... 27
Figura 8. (A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% resultante de la amplificación por PCR de los partidores diseñados y presentados en las anteriores figuras junto con el plásmido PSUB11 como templado..... 29
Figura 9. Fotografías de las placas donde fueron aisladas las colonias transformadas con el producto amplificado de PSUB11 que contiene el epítopo 3×FLAG,. 30
Figura 10. (A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% resultante de la amplificación por PCR de los partidores comprobatorios diseñados y presentados en las anteriores figuras utilizando como templado DNA extraído desde colonias de *S.* Typhi *wild type* y la cepa transformada Sopb:: 3×FLAG 31
Figura 11.. (A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% resultante de la amplificación por PCR de los partidores comprobatorios y DNA post transformación con Pcp20. 33
Figura 12. Sembrado de 15 colonias de la cepa SopB::3×FLAG /Pcp20 en placas suplementadas con antibióticos. A. medio LB; B. placa suplementada con ampicilina, C. Placa suplementada con Kanamicina. 34

Figura 13.. Alineamiento de secuencias nucleotídicas mediante el programa Geneious 35
Figura 14.. A) Alineamiento de secuencias proteicas mediante el programa Geneious 36
Figura 15. *Western blot* con muestras de pellet celular extraído de condiciones estándar de laboratorio y condiciones de cultivo relacionadas al ciclo infectivo..... 39
Figura 16. *Western blot* con muestras de sobrenadante celular extraído de condiciones estándar de laboratorio y condiciones de cultivo relacionadas al ciclo infectivo..... 40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas encontradas en las OMVs de S. Typhi cultivadas en condiciones estándar de laboratorio**. 15**

Tabla 2 Secuencias de partidores utilizados para la amplificación de la región de interés del plásmido PSUB11**. 25**

Tabla 3. Tamaños esperados para los productos PCR, resultados de la amplificación In Silico para cada set de partidores**. 28**

Tabla 4 Tamaños específicos de las secuencias entregadas por el laboratorio**. 35**

Tabla 5 tamaños proteicos teóricos basados en la bibliografía y el trabajo in silico**. 38**

1. RESUMEN

Salmonella enterica serovar Typhi es una bacteria Gram negativa, perteneciente a la familia de las *Enterobacteriaceae* y es conocida por ser el agente etiológico de la fiebre tifoidea, teniendo como único reservorio a los humanos, es transmitida por vía oral y comúnmente asociada a la ingestión de agua y alimentos contaminados. En Chile fue declarada endémica durante la década del 50, con brotes esporádicos, experimentando un descenso sostenido en su incidencia durante la década del 90 debido a la mejora progresiva en políticas de salud pública. Pese a su baja incidencia en países desarrollados, *Salmonella* Typhi se ha transformado en foco de estudios debido a sus mecanismos de infección, la existencia de portadores crónicos y a la aparición de cepas multirresistentes.

Las vesículas de membrana externa u OMVs por sus siglas en inglés (Outer Membrane Vesicles), son nano proteoliposomas esféricos formados a partir de la membrana externa que cumplen diversas funciones, en un amplio espectro de bacterias, como por ejemplo, la protección de la bacteria, la captura de nutrientes y el transporte y secreción de cargamento a largas distancias, donde incluso se ha podido encontrar presencia de proteínas efectoras relacionadas al ciclo infectivo de *Salmonella,* como por ejemplo SopB, conocida proteína efectora que propicia los arreglos del citoesqueleto de actina en las células hospedero, facilitando la internalización de la bacteria, y cuya presencia se asocia a la etapa intestinal de la infección, postulando las vesículas como métodos de entrega alternativos para este efector.

Durante este trabajo, mediante métodos de biología molecular y microbiología, hemos decidido comparar la presencia de la proteína efectora SopB en un set de tres muestras (Pellet, Sobrenadante y vesículas) extraídas desde cultivos con condiciones asociadas a la etapa intestinal del ciclo infectivo, y cultivos estándar de laboratorio, planteando que la presencia de la

proteína debería ser mayor ante condiciones que simulen la etapa de infección de la bacteria.

Los resultados indicaron variaciones en la presencia de la proteína SopB entre cultivos, siendo mayor en las muestras extraídas desde cultivos que simulan la etapa intestinal y particularmente en la fracción del sobrenadante celular, indicando que la secreción de esta proteína es mayor ante estas condiciones. Por otra parte, resultados posteriores lograron identificar la presencia de SopB en vesículas indicando que la proteína puede formar parte del cargamento en condiciones intestinales. Pese a lo auspicioso de estos resultados, es necesario continuar con un análisis cuantitativo que nos dé una mirada clara de los niveles de presencia, manteniendo abiertas las posibilidades de desarrollo de otros tipos de experimentos y estudios que involucren esta proteína.

2. ABSTRACT

Salmonella enterica serovar Typhi is Gram-negative bacteria belonging to the *Enterobacteriaceae* family, it is also known to be the etiological agent of Typhoid fever with the humans as only host, transmitted through oral ingestion of contaminated food and water.

Declared in Chile as an endemic disease since the 1950s, with sporadic outbreaks through the years, decreasing during the 90s due the steady improvements in public health policies. Despite its low incidence in developed countries, *Salmonella* Typhi has become a focus of study due to its infection mechanisms, the existence of chronic carriers, and the presence of multidrug-resistant strains.

The Outer Membrane Vesicles (OMVs) are structures secreted by the outer membrane, consisting in spheric nano-sized proteoliposomes that performs a wide range of functions in bacteria, such as defense, nutrient capture, transport, and secretion of cargo over long distances, among others. There is evidence of proteins related to *Salmonella's* infective cycle, such as SopB, have been found in OMVs, SopB is an effector protein that promotes rearrangements on the actin cytoskeleton in host cells, helping with *Salmonella*

internalization by specialized cells on the host, whose presence is often associated with the intestinal stage of the infection, suggesting that OMVs could serve as an alternative delivery method for this protein.

During this study, we used molecular biology and microbiology to compare the presence of the effector protein known as SopB in a set of three samples (pellet, Supernatant and OMVs) extracted from cultures with conditions related to the intestinal stage, and standard laboratory cultures. Therefore, we hypothesized that the presence of the protein should be greater under conditions that simulate the bacterial infective stage.

Our results indicate variations of SopB presence between our cultures, with higher levels found on the samples extracted from cultures related to the intestinal stage, particularly in the supernatant fraction, indicating that the secretion of this protein is higher under these conditions. Furthermore, subsequent results identified the presence of SopB in OMVs samples extracted from intestinal cultures, suggesting that the protein may be part of the OMVs cargo under these conditions. Although these results are promising, further quantitative analysis are necessary to provide a clearer understanding of the levels of protein presence on the OMVs under intestinal conditions.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 *Salmonella enterica* serovar Typhi

Salmonella enterica serovar Typhi (*S.* Typhi) es una bacteria Gram negativo perteneciente al género *Salmonella* y a la familia de las *Enterobacteriaceae*. Es una bacteria anaeróbica facultativa y mesófila, con una temperatura óptima de crecimiento de 35 a 37 °C (Ray *y* Bhunia, 2013). *S.* Typhi es el agente etiológico de la fiebre tifoidea y tiene como único reservorio a los humanos. Esta bacteria se transmite por vía oral, mediante la ingestión de alimentos o aguas contaminadas con desechos de individuos infectados o por contacto cercano con un infectado o portador (Hornick *et al*., 1970). Los síntomas pueden ser percibidos desde 2 semanas desde la exposición e inoculación con la bacteria, produciendo un cuadro clínico compuesto principalmente por fiebre, cefalea, colitis, náuseas y vómitos, dolor abdominal, estreñimiento, escalofríos y en el caso de inmunocomprometidos puede provocar diarrea (Coburn *et al*., 2007; Jurado Jiménez *et al*., 2010).

La infección por *S.* Typhi (Raffatellu *et al*., 2008) presenta una incidencia de nueve millones de casos anuales (Crump *et al*., 2008; Johnson *et al*., 2018), presentando entre un 1% y un 4% de mortalidad, la que se eleva cuando no existen los tratamientos antibióticos adecuados, llegando hasta un 20%. (Johnson *et al*., 2018) según estimaciones realizadas por la Organización mundial de la Salud (WHO por sus siglas en inglés) en 2019 presentó una cifra cercana a 110.000 muertes.

En Chile la infección por *S.* Typhi y, como consecuencia la fiebre tifoidea, es considerada una enfermedad endémica desde la década de 1950. La infección por *Salmonella* Typhi tuvo su máximo epidemiológico durante la década de los 80, llegando a 120 casos cada 100.000 habitantes, experimentando un descenso importante desde la década del 90, debido al aumento del saneamiento básico y de manera indirecta a la campaña de prevención del Colera durante esos años (Gobierno de Chile, 2018), llegando a 1 caso cada 100.000 habitantes en la década del 2010 (Fica Cubillos *et al*., 2001), siendo el año 2011 el brote de fiebre tifoidea más cercano del que tenemos información en Chile, (Fica *et al*., 2012; Fica Cubillos *et al*., 2001).

Según el ISP (Instituto de Salud Pública), entre el periodo 2012-2016 un 1.9% de las cepas causantes de salmonelosis en Chile correspondían a *S*. Typhi, teniendo una mayor incidencia por parte de esta bacteria en las regiones del Biobío, Metropolitana y de Tarapacá (Instituto de Salud Publica. Ministerio De Salud. Gobierno de Chile, 2017). El último informe epidemiológico anual emitido por el Ministerio de Salud (MINSAL), dio cuenta que durante el año 2018 la vigilancia epidemiológica pudo identificar un total de 38 casos de fiebre tifoidea y paratifoidea, con una incidencia de un 0,2 casos cada cien mil habitantes, concluyendo que la enfermedad experimentaba una tendencia al descenso desde el año 2002 (Gobierno de Chile, 2018) y que gracias a la combinación de factores como el aumento progresivo del índice de Desarrollo Humano (IDH), crecimiento económico y aumento de políticas públicas han permitido la declinación progresiva de la fiebre tifoidea como un problema de salud pública (Gobierno de Chile, 2018).

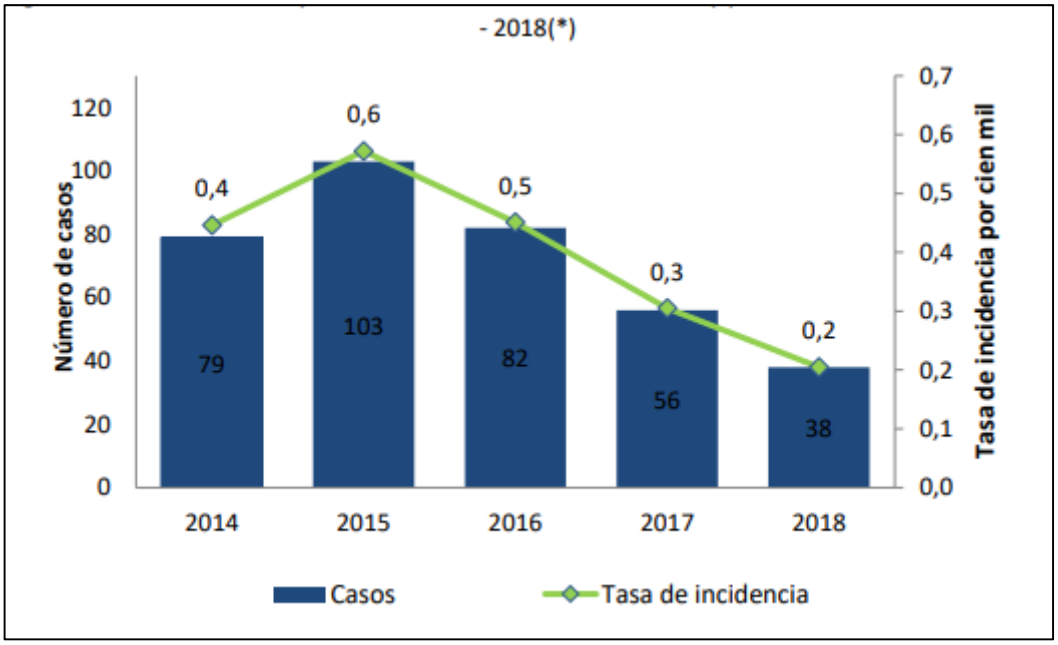


Figura 1 Número de casos y tasa de incidencia de fiebre tifoidea y paratifoidea. Chile, años 2014 - 2018(*), la figura nos muestra el descenso gradual de casos de fiebre tifoidea y para tifoidea en el territorio nacional.

(*) Datos provisorios al 17/04/2019

Fuente: Base de datos ENO, DIPLAS – Ministerio de Salud de Chile.

Si bien, la mortalidad provocada por *S*. Typhi se encuentra relacionada a la ausencia de tratamiento, pudiendo llegar a un 20% en pacientes sin el debido tratamiento de antibióticos, las desfasadas infraestructuras de salud pública,

la multirresistencia a antibióticos (Karkey *et al*., 2018; Rowe *et al*., 1997), la existencia de portadores crónicos (Gonzalez-Escobedo *et al*., 2011; Khanam *et al*., 2021; Levine *et al*., 1982), la poca fiscalización de los alimentos, y la poca educación en la población sobre el tema, sobre todo en zonas rurales (Instituto de Salud Publica. Ministerio De Salud. Gobierno de Chile, 2017) puede llevar a la reaparición y aumentos descontrolados en la propagación de esta bacteria, haciendo necesaria tomar medidas, como mejorar los sistemas de vigilancia epidemiológica en zonas donde se considera endémica, programas de vacunación, entre otros, recalcando aún la importancia que presenta *S.* Typhi como un objetivo de estudio importante para poder comprender sus estrategias de infección, con el fin de reducir su propagación y severidad (Karkey *et al*., 2018).

3.1.1 Ciclo infectivo

Salmonella enterica ha evolucionado y refinado diversos mecanismos para invadir, sobrevivir y proliferar dentro de las células hospederas, el resultado de estas interacciones y cómo influyen en la célula blanco está determinado tanto por la especie del hospedero, como por el serotipo de *Salmonella* por el que está siendo invadido (Giacomodonato *et al*., 2007).

La infección por *S*. Typhi comienza en el intestino después de la entrada de la bacteria al organismo por vía oral, esto facilita que *Salmonella* atraviese la barrera ácida del estómago, pasando al íleon distal, donde se enfrenta a 2 etapas de su ciclo infectivo, la etapa intestinal, donde penetra las capas mucosas que protegen el epitelio del intestino, y la etapa sistémica en donde la bacteria toma contacto con los órganos profundos, ambas etapas ayudadas por la expresión de genes ubicados en las islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI) (Fuentes *et al*., 2008; Galán *y* Bliska, 1996; Jofré *et al*., 2014).

Durante la etapa intestinal, la bacteria invade la mucosa del intestino, encontrando las condiciones adecuadas para su supervivencia, como la alta osmolaridad, superior a 300 mM, la microaerofilia, y la presencia de bilis (Galán *y* Bliska, 1996; Jofré *et al*., 2014). Es aquí donde la bacteria procede a

internalizarse a través de las células M de la placa de Peyer y las células epiteliales, estableciendo una infección inicial clínicamente indetectable (Kohbata *y* Yokoyama, 1986), las bacterias son translocadas a través del epitelio intestinal y ganan acceso hacia la circulación del hospedero, afectando los órganos profundos produciendo la etapa sistémica de la infección, donde la bacteria es diseminada por el sistema reticuloendotelial (RES) y se ve enfrentada a la fagocitosis por parte de células especializadas (*e.g.* macrófagos y neutrófilos), tomando residencia y control al estar en su interior gracias a la secreción de una batería de proteínas codificadas por la isla de patogenicidad 2 de *Salmonella* (SPI-2) (Daigle, 2008), permitiéndole diseminarse a órganos profundos.

Dos de los mayores determinantes genéticos involucrados en la virulencia de *S.* Typhi se encuentran en dos islas dentro del genoma bacteriano denominadas islas de patogenicidad de *Salmonella* o por sus siglas en ingles SPIs (*Salmonella Pathogenicity Islands*). Estas islas son *clusters* de genes, ubicados tanto en el cromosoma bacteriano como en los plásmidos (Kaur y Jain, 2012), a la fecha, se han descrito varias SPIs de *Salmonella* en diferentes serotipos, siendo las SPI-1 hasta la SPI-5 las islas más conservadas y comúnmente observadas (Foley *et al*., 2008; Marcus *et al*., 2000). En general estas islas cumplen diferentes roles en la patogénesis y virulencia de *Salmonella*, en este trabajo nos centraremos en dos islas de patogenicidad, importantes en las fases primarias de infección. La SPI-1, que es requerida para la invasión de las células hospedero, la formación del sistema de secreción de tipo III de la SPI-1 y la inducción de la apoptosis en macrófagos, y también SPI-5, la que codifica genes de proteínas efectoras translocadas por el sistema de secreción del tipo III de la SPI-1 hacia la célula hospedero, como por ejemplo nuestra proteína de interés SopB (Amavisit *et al*., 2003).

3.1.2 Sistemas de secreción y sus efectores

Los sistemas de secreción del tipo III o TTSSs por sus siglas en inglés (*Type Three Secretion Systems*), son estructuras bacterianas especializadas cuya función principal es la entrega de proteínas desde la bacteria a su célula hospedero. Este sistema de secreción permite a un amplio rango de especies bacterianas como *Shigella spp., Salmonella spp., Boretella spp., Pseudomona aeruginosa,*y *Escherichia coli* adherirse a la membrana de la célula blanco para poder inyectar proteínas, efectores y factores de virulencia a través de las dos membranas bacterianas y de la membrana eucarionte, con el fin de perturbar el normal funcionamiento de la célula agredida, facilitando así la entrada o supervivencia del patógeno (Cornelis, 2000; Galán, 1999; Galán *y* Collmer, 1999).

En *Salmonella* Typhi podemos encontrar dos sistemas de secreción del tipo 3, codificados estructuralmente por las SPI-1 y SPI-2 (Zhou *y* Galán, 2001), en este trabajo nos centraremos en efectores del sistema de secreción de tipo tres de la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* denominado TTSS-1 debido al rol que cumple durante las etapas primarias de la infección por parte de *Salmonella* Typhi y principalmente durante la internalización de la bacteria en las células epiteliales, que normalmente no poseen características fagocíticas.

El sistema de secreción de tipo tres de la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (TTSS-1) es uno de los dos sistemas de secreción que ayudan a la bacteria durante su ciclo infectivo. Este se encuentra codificado en la SPI-1 de *Salmonella*, y tiene como función principal el transporte de factores de virulencia y proteínas efectoras hasta el citoplasma de la célula hospedero (Hueck, 1998; Lostroh *y* Lee, 2001) (Figura 2).

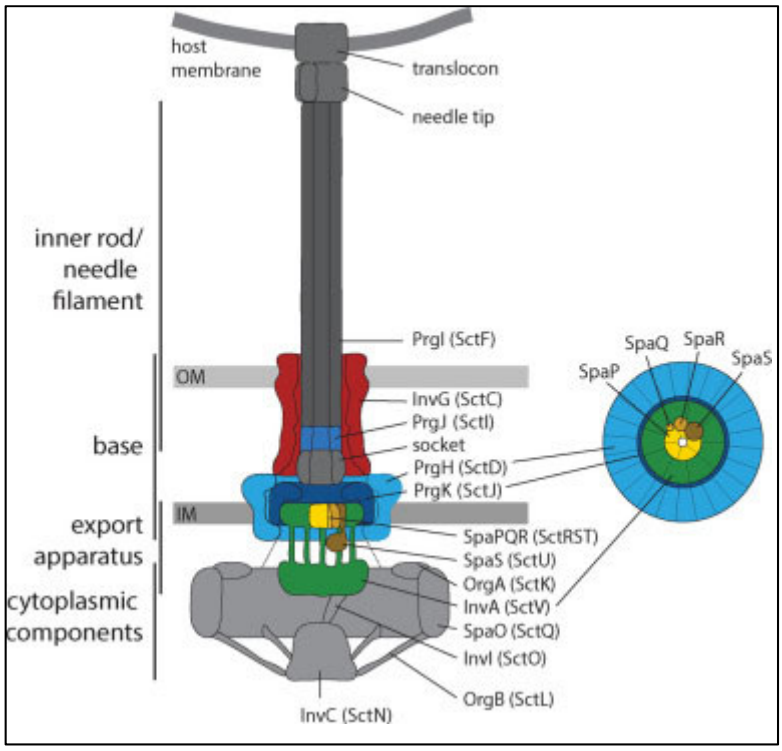


Figura 2 Modelo detallado del sistema de secreción de tipo tres de la isla de patogenicidad 1 (TTSS-1).

Se detallan los componentes estructurales que lo conforman y su disposición. IM: Membrana interna, OM: membrana externa, Host membrane: membrana del hospedero.(Zilkenat *et al*., 2016).

La internalización a células no fagocíticas por parte de *Salmonella* es clave durante su proceso infectivo, bajo este contexto, una de las principales actividades asociadas al TTSS-1 fue identificada *in vitro* en *S.* Typhimurium, la cual consiste en inducir la captación de la bacteria por parte de células epiteliales, las que bajo condiciones normales no son fagocíticas, siendo las cepas mutantes, que expresan un TTSS-1 deficiente, mucho menos competentes en colonizar el lumen en comparación a bacterias silvestres (Zhou y Galán, 2001). Este proceso de entrada y colonización de las células es el resultado de respuestas celulares coordinadas, activadas por la gran batería de proteínas entregadas a la célula blanco mediante este sistema de secreción (Galán y Collmer, 1999), estas proteínas, comúnmente conocidas como efectores, interactúan con las células hospedero causando los fenotipos asociados a la patogénesis de *Salmonella* Typhi (Hueck, 1998).

Se sabe que estas proteínas trabajan en conjunto para producir la internalización de la bacteria y la formación de "*ruffles"*, como se muestra en la Figura 3. Estas estructuras derivadas desde la membrana de células intestinales son el resultado de arreglos del citoesqueleto de actina de la propia célula por parte por este grupo de efectores, en especial SipA, SopA, SopB, SopD, SopE y SopE2 (Francis *et al*., 1993; Raffatellu *et al*., 2006)**,** dando como resultado la fagocitosis de la bacteria y por consiguiente la internalización de ésta (Galán, 1999).

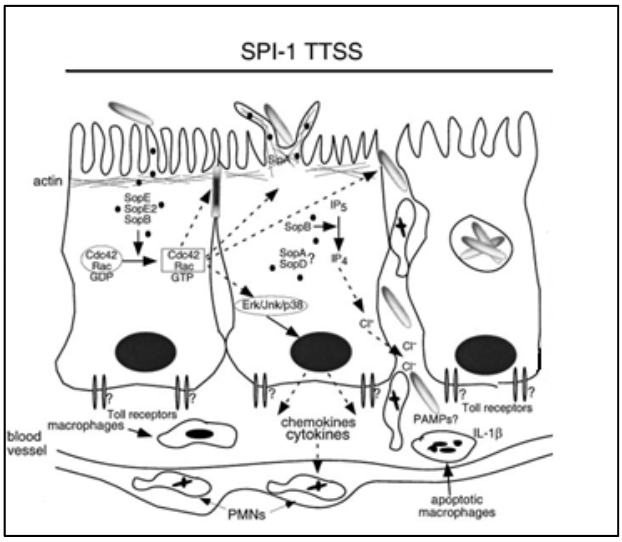


Figura 3 Modelo de la patogenicidad de *Salmonella* durante la fase intestinal.
Se muestran los distintos efectores secretados por el TTSS-1 y cómo actúan para propiciar la internalización de la bacteria.(Zhou *y* Galán, 2001).

Por otra parte, estas proteínas contribuyen a otras funciones durante la infección, como, por ejemplo, controlar las respuestas inflamatorias, regular la supervivencia de la bacteria al interior de las células hospedero (Pfeifer *et al*., 1999; Srikanth *et al*., 2011) y también inducir secreción de fluido en células intestinales (Hapfelmeier *et al*., 2004).

3.2 SopB

Dentro de esta batería proteica nos centraremos en la proteína efectora SopB. Esta proteína se encuentra codificada en la isla 5 (SPI-5) de *Salmonella* Typhi (Faucher *et al*., 2006), y pertenece al grupo de proteínas efectoras que son secretadas mediante el TTSS-1 de *Salmonella*.

Esta proteína ha sido descrita como una inositol fosfatasa por su actividad in vitro (Norris *et al*., 1998). Es conocido que SopB interfiere con la red reguladora que controla el flujo de agua y electrolitos en la célula y, además, la producción de interleucina 8 (IL-8), produciendo cómo resultado inflamación, por otra parte, se conoce que permite la formación de arreglos de actina en el citoesqueleto mediante la intervención de la proteína Cdc42, relacionada a la morfología celular (Norris *et al*., 1998). SopB también presenta otras funciones igualmente relevantes durante el proceso infectivo como mediar la activación de la fosfolipasa C (Zhou *et al*., 2001), facilitar la fisión de la membrana (Hong *y* Miller, 1998), afectar la homeostasis de cloruro e inhibir la exportación de mRNA nuclear (Feng *et al*., 2001), y por último inhibir la función del lisosoma evitando que la bacteria sea digerida (Bakowski *et al*., 2010).

Durante un tiempo se ignoró su función relacionada al proceso de invasión, esto debido a que su rol se ve enmascarado por otras proteínas con una función redundante, como SopE y SopE2, su función se pudo confirmar gracias a Zhou y su grupo de estudio, donde mediante una serie de trabajos lograron dilucidar que las cepas deficientes en solo una de estas 3 proteínas (SopB, SopE y SopE2) aún exhibían una alta eficiencia para entrar a las células, mientras que las cepas deficientes de las 3 proteínas son completamente deficientes para entrar a las células (Zhou *et al*., 2001).

3.2.1 SopB y su expresión

Si bien, la mayoría de los efectores relacionados al TTSS-1 pueden ser encontrados en medio de cultivo estándar (Bai *et al*., 2014; Gong *et al*., 2010), la expresión de estos efectores y las proteínas estructurales relacionadas al TTSS-1 se ve aumentada por condiciones intestinales como la microaerofilia y la alta osmolaridad, las que facilitan la entrada de la bacteria a las células intestinales (Leclerc *et al*., 1998). Existe evidencia que nos indica que la expresión de SopB se ve aumentada por condiciones relacionadas a la etapa intestinal, como por ejemplo la microaerofilia, condición que aumenta la expresión de esta proteína, sugiriendo que en condiciones similares a la etapa de infección intestinal sus niveles de expresión son elevados (Gong *et al*.,

2010). En contraparte la alta osmolaridad, condición que *S.* Typhi también encuentra durante la etapa intestinal, no presenta un impacto significativo en la expresión de SopB en comparación a otros efectores relacionados al TTSS-1, como, por ejemplo, SipB, SipC y SipD (Gong *et al*., 2010; Huang *et al*., 2007), cuya expresión bajo esta condición si presenta niveles más elevados, no obstante, con el fin de generar un ambiente lo más parecido al que la bacteria se verá expuesta durante la etapa infectiva, es esencial probar con una combinación que englobe la mayoría de factores que puedan interferir en el desarrollo de la bacteria y la producción de nuestra proteína de interés.

Por otra parte, se sabe que SPI-5, la isla de patogenicidad donde podemos encontrar a SopB, presenta un patrón de expresión similar al de SPI-1, por lo que SopB presentaría altos niveles de expresión en condiciones que favorezcan la expresión de dicha isla (Kröger *et al*., 2013).

3.3 OMVs

Las vesículas de membrana externa, por sus siglas en inglés *Outer Membrane Vesicles* (OMVs), fueron inicialmente reportadas hace más de 50 años como micro compartimientos producidos por *Vibrio cholerae* durante su crecimiento normal (Chatterjee *y* Das, 1967). En las décadas posteriores se postuló que las vesículas eran artefactos relacionados al crecimiento bacteriano (Pathirana *y* Kaparakis-Liaskos, 2016), sugiriendo un rol esencial para las bacterias.

Actualmente las OMVs son descritas como nano proteoliposomas de unos 50 a 250 nanómetros de diámetro (Beveridge, 1999; Mashburn-Warren *y* Whiteley, 2006), son porciones esféricas de la envoltura bacteriana que contienen en su interior proteínas de membrana externa, lípidos y material soluble proveniente del periplasma (Kulp *y* Kuehn, 2010). Se ha descrito que principalmente en bacterias patogénicas se pueden encontrar moléculas inmunomoduladoras, efectores y factores de virulencia, tales como la toxina vacuolante VacA de *Helicobacter pylori,* (Ricci *et al*., 2005) la enterotoxina termolábil (LT) de *Escherichia coli* (Horstman *y* Kuehn, 2000), entre otros,

demostrando un rol estelar durante los procesos infectivos de estas bacterias, y en cómo interactúan con sus células hospedero.

Si bien, la producción y secreción de vesículas es un proceso característico de bacterias Gram negativo, arqueas y células eucariontes de mamíferos (Kim *et al*., 2009), existe evidencia de secreción de vesículas de membrana en bacterias Gram positivo, siendo *Staphylococcus aureus* uno de los únicos organismos donde se ha evidenciado su producción como proceso de secreción (Kim *et al*., 2009), indicando que la vesiculación es un proceso transversal y altamente conservado durante la evolución de las bacterias (Schwechheimer *y* Kuehn, 2015).

3.3.1 Biogénesis de OMVs

Estas estructuras son secretadas desde la envoltura bacteriana por un proceso de protuberancia y evaginación, además, su formación no está relacionada a un evento de lisis o muerte celular (Chatterjee *y* Das, 1967), sugiriendo que no es un proceso azaroso, sino más bien deliberado.

La formación y biogénesis de las OMVs depende de 3 procesos fundamentales: i) la disociación de la membrana externa de las bacterias gram negativo en zonas específicas, donde escasean las uniones con las capas adyacentes como el peptidoglicano (PG) (Kadurugamuwa *y* Beveridge, 1995; Schwechheimer *y* Kuehn, 2015; Yeh *et al*., 2010). ii) la presencia de proteínas mal formadas (Schwechheimer y Kuehn, 2015) y iii) cambios en la composición del lipopolisacárido (LPS)**,** el cual también modula la biogénesis de las OMVs (Elhenawy *et al*., 2016).

3.3.2 Funciones de las OMVs

Las OMVs cumplen un amplio espectro de funciones tanto en bacterias no patogénicas como en bacterias patógenas, se ha determinado que pueden tener diversos roles dependiendo de la especie que las produzca y las condiciones de cultivo (Schwechheimer y Kuehn, 2015), indicando que las bacterias utilizan las vesículas para mejorar sus opciones de supervivencia (Manning *y* Kuehn, 2011).

En primer lugar, presentan una función de protección para la bacteria, neutralizando agentes ambientales que tengan como objetivo la membrana externa (Manning y Kuehn, 2011). En segundo lugar, las OMVs presentan grandes ventajas en comparación a otros métodos de secreción, protegiendo su cargamento frente a enzimas degradativas o anticuerpos (Horstman y Kuehn, 2000), lo cual permite la entrega de material a grandes distancias sin necesidad de contacto entre la bacteria y la célula blanco, además, esto se ve complementado por la capacidad que presentan las OMVs de poder ser captadas e internalizadas por las células eucariontes (Jefferies *y* Khalid, 2020; O'Donoghue *y* Krachler, 2016) lo que puede mejorar significativamente la infectividad de la bacteria y, en tercer lugar, la adquisición de nutrientes, donde algunas OMVs transportan y liberan enzimas degradativas y proteínas receptoras (*e.g.* PQS en *P. aeruginosa*) las cuales contribuyen a la captación de nutrientes y por consiguiente la supervivencia de la bacteria durante el proceso de patogénesis (Kulp *y* Kuehn, 2010; Bauman y Kuehn, 2012; Vasilyeva *et al*., 2008).

3.3.3 Vesiculación y condiciones ambientales

Como fue descrito anteriormente, la vesiculación no está relacionada a un evento de lisis o muerte celular, ocurriendo de manera natural y viéndose alterada por factores ambientales como, disponibilidad de nutrientes, percepción de *quorum,* antibióticos, presencia de bilis que afecten la membrana (Bonnington *y* Kuehn, 2016; McBroom *y* Kuehn, 2007), presentándose de esta forma como un mecanismo independiente y flexible ante el manejo del estrés (McBroom y Kuehn, 2007), demostrando que el proceso de vesiculación puede variar en respuesta a diferentes estímulos. Si bien la influencia de las condiciones ambientales sobre las vesículas no se encuentra bien documentada, en estudios de nuestro laboratorio se ha reportado que condiciones ambientales seleccionadas para simular el ambiente intestinal al cual *Salmonella* Typhi se encuentra expuesta durante su proceso infectivo, como, por ejemplo, la alta osmolaridad, son capaces de alterar aspectos de las OMVs como por ejemplo su tamaño (Figura 4).

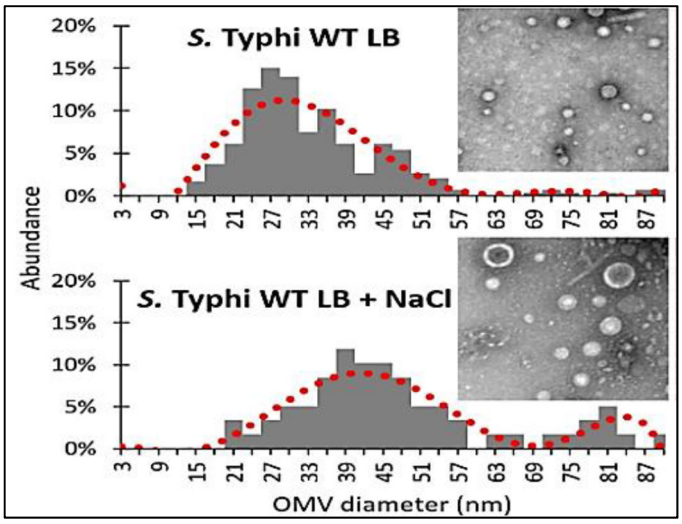


Figura 4. Tamaño de las OMVs de *S*. Typhi cultivadas aeróbicamente a 37°C en 2 medios. Medio LB (superior) y medio suplementado con NaCl (inferior) con sus respectivas TEM. Tesis Lorena Muñoz, 2019.

Indicando una alta sensibilidad a las condiciones ambientales, y que estas pueden modificar diferentes propiedades de la vesícula orientando a la bacteria para que actúe en diferentes ambientes, mejorando su supervivencia ante condiciones desfavorables (McBroom *y* Kuehn, 2007).

3.3.4 OMVs y efectores

Se sabe, por trabajos realizados en *S.* Typhimurium, que existe presencia de ciertas proteínas relacionadas al TTSS-1, en las vesículas secretadas por este serotipo. Estas proteínas incluyen a SipA, SipB, SipC, SopA, SopB y SopE2 (Bai *et al*., 2014), indicando que dichos efectores pueden ser incorporados o cargados a las OMVs mediante una vía desconocida.

En otro trabajo realizado por este grupo de estudio, se pudo visualizar una relación más cercana entre los efectores asociados al TTSS-1 y las OMVs de *S.* Typhimurium. Estos investigadores pudieron demostrar mediante análisis con proteínas marcadas, microscopia de fluorescencia y ensayos de invasión, la presencia de los factores de virulencia anteriormente mencionados en las vesículas y más concretamente su ubicación, basándose en la función protectora de cargamento de las OMVs (Horstman y Kuehn, 2000;

Schwechheimer y Kuehn, 2015), la cual protegería a estas proteínas marcadas de la actividad de la proteinasa K.

Además, se confirmó que estas OMVs poseen capacidad de internalizarse en las células hospedero, y que, adicionalmente, estos efectores pueden inducir los arreglos del citoesqueleto de la célula hospedero de la misma manera que al ser secretados por el TTSS-1, mejorando notablemente la virulencia de cepas mutantes (S. I. Kim *et al*., 2018), estos resultados sugieren que las vesículas cargadas con efectores del TTSS-1 ejercen su actividad biológica sobre las células hospedero, apoyando a la infección y funcionando de una manera complementaria y completamente distinta al ya conocido TTSS-1, mejorando notablemente la capacidad infectiva de *Salmonella* (Kim *et al*., 2018).

Es importante destacar que, estos estudios fueron realizados en *S.* Typhimurium y pese a su similitud con nuestro modelo de estudio, y el hecho de que para comprender la infección que produce *S.* Typhi es necesario el estudio en *S.* Typhimurium (Amavisit *et al*., 2003), debemos comprender que cada serotipo tiene hospederos distintos. Como fue descrito anteriormente *S.* Typhi tiene como único hospedero al ser humano (Hornick *et al*., 1970), provocando la fiebre tifoidea, mientras que Typhimurium infecta modelos murinos, donde produce un cuadro de fiebre tifoidea, pudiendo también infectar al humano donde solo produce un cuadro de gastroenteritis.

Por otra parte, también debemos comprender que existen diferencias genómicas que pueden afectar nuestros resultados, es decir, que existan genes homólogos entre ambos serotipos, no significa que estos genes presenten los mismos mecanismos de regulación o sean funcionales para ambos serotipos (Galán y Curtiss, 1991).

Es por esto por lo que postulamos este estudio, ya que es necesaria una aproximación experimental para poder extrapolar resultados y llegar a conclusiones similares en *S*. Typhi.

3.4 *S.* Typhi y las condiciones intestinales.

La etapa intestinal cumple un rol fundamental durante la infección de *Salmonella* Typhi, siendo una de las primeras barreras a las que esta bacteria debe enfrentarse al infectar un nuevo individuo, cumpliendo un rol vital para la exitosa colonización de este. Durante esta etapa la bacteria es internalizada por los mecanismos descritos anteriormente, como los arreglos del citoesqueleto de actina de la célula hospedero que forman los "*Ruffles"* gracias a la acción de las proteínas efectoras secretadas por el TTSS-1, dichas proteínas ven favorecida su expresión bajo condiciones intestinales (Leclerc *et al*., 1998), además, es sabido que bajo condiciones intestinales, como la alta osmolaridad, nuestra proteína de interés SopB presenta elevados niveles de expresión, indicando que estos efectores cumplen su rol principal durante esta etapa del ciclo infectivo, y que bajo estas condiciones su presencia debería ser mayor.

Por otra parte, en un análisis proteómico realizado previamente por nuestro laboratorio se pudo identificar la presencia de proteínas efectoras y factores de virulencia relacionados al TTSS-1 en las OMVs producidas por *S.* Typhi y que son críticos para el ciclo infectivo de la bacteria. Estas proteínas fueron encontradas en vesículas extraídas bajo condiciones estándar de laboratorio (Medio Luria Bertani y 37°C de incubación aeróbica) como se muestra en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, donde podemos visualizar la presencia de nuestra proteína de interés SopB, la cual presenta un 1.40% de péptidos únicos encontrados, dándonos un detalle de la abundancia en las OMVs de *S.* Typhi cultivadas en condiciones estándar de laboratorio (datos no publicados).

Tabla 1. Proteínas encontradas en las OMVs de S. Typhi cultivadas en condiciones estándar de laboratorio.
Medio Luria Bertani y cultivo aeróbico a 37°C. Información de proteómica de OMVs (datos no publicados).

Factor de virulencia	OMVs (Cepa Wild type)	Replica
SipB	0,13%	3
SipC	0,84%	3
SopE	0,13%	3
SopB	**1,40%**	**3**
SipA	0,11%	3

*porcentaje del total del espectro de proteínas identificadas durante el experimento.

Esto nos indica que es posible observar la presencia de estas proteínas efectoras en las OMVs de *S.* Typhi incluso en condiciones estándar de cultivo, y nos permite reforzar la idea de que la presencia de estos factores puede verse aumentada bajo condiciones relacionadas al ciclo infectivo de *S.* Typhi, específicamente durante la fase intestinal, pudiendo contribuir a la virulencia mediada por vesículas en este serotipo, abriendo un método alternativo e inexplorado para la entrega de factores de virulencia y efectores como la proteína SopB.

Por último, otra arista del trabajo previo realizado en nuestro laboratorio pudo encontrar que bajo condiciones intestinales (microaerofilia y alta osmolaridad) las vesículas de *S.* Typhi exhiben una mayor capacidad de internalización en células epiteliales que las vesículas extraídas desde un medio de cultivo estándar (Medio Luria Bertani y cultivo aeróbico a 37°C) después de 5 minutos de ser incubadas con células epiteliales de la línea HT-29 (Figura 5).

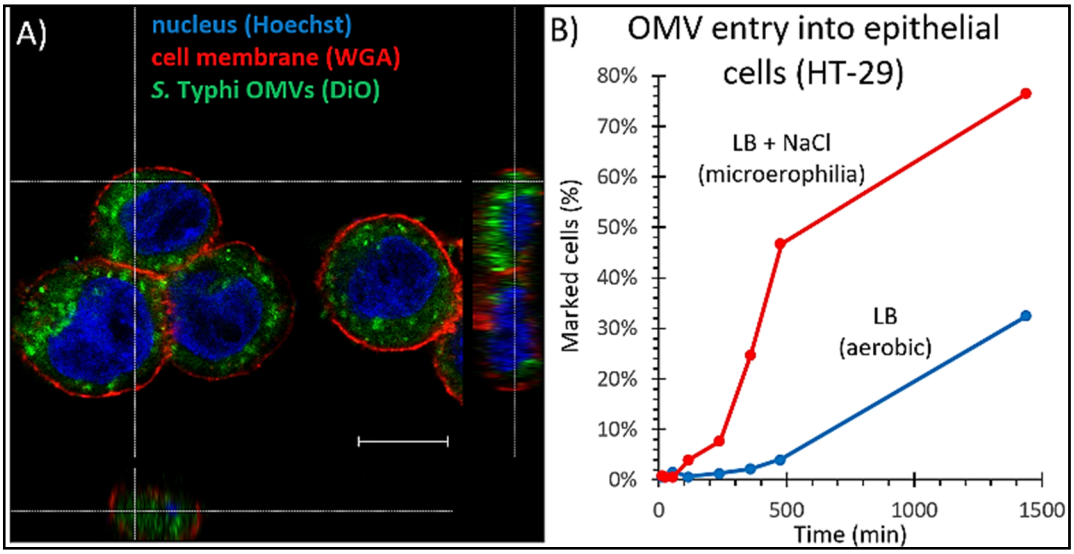


Figura 5. internalización de las OMVs de *S.* Typhi a las células epiteliales HT-29.
A) Microscopia confocal con tinción DIO. B) Citometría de flujo de las OMVs extraídas a partir de cultivos estándar (medio LB y cultivo aeróbico a 37°C) y cultivos con condiciones intestinales (microaerofilia y alta osmolaridad). Tesis Francisco Parra, 2019.

Este hallazgo nos demuestra que bajo condiciones intestinales las OMVs exhiben una mayor capacidad de internalización a las células hospedero, demostrando que las condiciones relacionadas al ciclo infectivo pueden potenciar el rol de entrega de factores de virulencia.

Según esta información y todos los antecedentes expuestos anteriormente, podemos resumir que: i) existe relación entre las condiciones intestinales y el aumento de la presencia de proteínas efectoras, entre ellas SopB ii) Las condiciones intestinales son esenciales para comprender cómo es modulada la producción de proteínas, el cargamento vesicular y cómo funcionan los métodos de internalización bacteriana. iii) las OMVs de *S.* Typhi incluso en condiciones de cultivo estándar pueden presentar presencia de proteínas efectoras, como SopB. iv) Bajo condiciones intestinales las OMVs secretadas por *S.* Typhi exhiben un mayor nivel de internalización en células epiteliales que OMVs extraídas desde cultivo estándar de laboratorio.

Es por esto por lo que con esta investigación y junto con los antecedentes recopilados esperamos obtener los resultados necesarios para confirmar si efectivamente las vesículas de *S.* Typhi extraídas desde cultivos que simulan

las condiciones intestinales de infección presentan una mayor presencia de la proteína efectora SopB en comparación con las OMVs extraídas desde cultivos estándar de laboratorio, siendo la presencia de esta proteína en vesículas un dato sumamente importante, ya que cómo hemos visto durante párrafos anteriores, las condiciones intestinales mejoran la internalización de las vesículas e influyen en el tipo y cantidad de cargamento en su interior, postulándose cómo un método alternativo, pero más importante, un método complementario a los sistemas de secreción clásicos utilizados por *Salmonella,* pudiendo mejorar la colonización de las células hospedero o incluso pudiendo ser eficaz para la secreción de las proteínas efectoras a distancia durante el ciclo infectivo de nuestra bacteria.

Estos resultados nos ayudarán a comprender que influencia presentan las condiciones de invasión en la producción de nuestra proteína de interés y como éste varía de una condición a otra, además, de ayudarnos a postular un método alternativo de entrega de SopB, diferente al ya conocido y estudiado TTSS-1 demostrando la adaptabilidad que presentaría esta bacteria durante su proceso de patogénesis.

4. HIPÓTESIS

Las muestras (Pellet celular, sobrenadante celular y OMVs) de *S.* Typhi obtenidas en condiciones de cultivo relacionadas a la fase intestinal (alta osmolaridad, microaerofilia y presencia de bilis) presentan una mayor presencia de la proteína efectora SopB en comparación con las muestras extraídas en condiciones estándar de laboratorio.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Comparar la presencia de la proteína efectora SopB en muestras (pellet celular y sobrenadante celular) de *S.* Typhi obtenidas en condiciones de cultivo relacionadas a la fase intestinal (alta osmolaridad, microaerofilia y presencia de bilis) con las muestras extraídas en condiciones estándar de laboratorio.

5.2 Objetivos específicos

1. Comparar la presencia de SopB en mutantes de *Salmonella* Typhi mediante “tagging” de proteínas en condiciones similares a la fase intestinal de su ciclo infectivo versus condiciones estándar de laboratorio.
    - 1.1 Construir la cepa de *S.* Typhi que presente la construcción *sopB*-3×FLAG.
    - 1.2 Comparar la presencia de la proteína SopB en la fracción celular, sobrenadante y vesículas de *Salmonella* Typhi cultivada en condiciones estándar de laboratorio y condiciones asociadas a la etapa intestinal de su ciclo infectivo.

.

6. METODOLOGÍA.

6.1 Construir la cepa de *S.* Typhi que presente la construcción *sopB*-3×FLAG.

6.1.1 Racional.

Para poder realizar las comparaciones entre las diferentes fracciones extraídas desde *S.* Typhi cultivada en condiciones estándar y condiciones intestinales es necesario poder detectar la presencia de nuestra proteína de interés. Esperamos poder construir la cepa que contenga el constructo SopB::3×FLAG capaz de producir proteínas marcadas fácilmente detectables por métodos clásicos de biología molecular.

6.1.2 Estrategia experimental 1.

Su finalidad es la confección de la cepa mutante que contenga dentro de su genoma el constructo denominado SopB::3×FLAG mediante 3 pasos. i) El diseño *in silico* del set de partidores necesarios para poder realizar el marcaje de nuestra proteína con el epítopo 3×FLAG, ii) la inserción mediante electro transformación y posterior confirmación del constructo que contiene tanto la proteína de interés, como el epítopo 3×FLAG y iii) la corroboración de la construcción y la confirmación de dicha cepa.

El diseño de los partidores fue realizado siguiendo las indicaciones descritas por Uzzau *et al*., 2001, brevemente, estos partidores deben ser diseñados para alinear específicamente con el comienzo de la secuencia que codifica el epítopo 3×FLAG (Partidor “Uzzau” Forward), mientras que el partidor opuesto debe alinear con el lado terminal del cassette de resistencia al antibiótico Kanamicina ubicado en el plásmido PSUB11 (Partidor “Uzzau” Reverse).

Estos partidores deben llevar extensiones homólogas de unos 36 a 40 nucleótidos. La primera, toma la región ubicada antes del codón Stop de nuestro gen de interés S*opB*, y debe añadirse en el partidor Forward, mientras que una región rio abajo del gen S*opB*, se añade en el partidor Reverse.

Por último, se diseñó otro set de partidores, denominados partidores comprobatorios, los cuales se alinean con una secuencia ubicada río arriba, en la región codificante de gen *sopB* (Partidor comprobatorio Forward) y con una secuencia río abajo de nuestro gen de interés (Partidor comprobatorio Reverse), con el fin de permitir comprobar mediante PCR la inserción de la secuencia de interés que lleva el epítopo 3×FLAG en el genoma de *Salmonella* Typhi.

Estos partidores fueron posteriormente utilizados para continuar el procedimiento descrito por Uzzau *et al*., 2001 y Datsenko y Wanner (Datsenko *y* Wanner, 2000) y formarán parte de la biblioteca de partidores de nuestro laboratorio para posteriores trabajos con SopB.
Posteriormente se marcó a nivel cromosomal el gen SopB de *S.* Typhi con el epítopo 3×FLAG utilizando una técnica que permite conservar el promotor endógeno en el mismo locus cromosomal, esto nos da la facultad de poder probar condiciones fisiológicas relacionadas al ciclo infectivo de *S.* Typhi y permite la producción de proteínas marcadas fácilmente detectables por un *Western blot.*

6.1.3 Metodología 1.

Los partidores fueron diseñados basándose en la secuencia de la isla de patogenicidad 5 (SPI-5) de *Salmonella* Typhi STH2370, la que fue secuenciada por Valenzuela y su grupo de estudio y obtenida desde el Hospital Lucio Córdova (Valenzuela *et al*., 2014)**.**
Posteriormente los partidores fueron diseñados de manera virtual utilizando el programa bioinformático SnapGene®, para esto, se siguieron las recomendaciones para el armado de partidores descritas por Uzzau *et al*., (2001).

El partidor Forward se diseñó para alinear específicamente con el principio de la región codificante para el epítopo 3×FLAG ubicado en el plásmido pSUB1111 (Uzzau *et al*., 2001), cuya secuencia y mapa genético fue obtenido desde la base de datos Addgene, además, este partidor lleva una región de 40 nucleótidos diseñada para alinear con el gen *sopB*, dicha región fue

seleccionada cuidadosamente y se encuentra ubicada antes del codón *Stop* del gen de interés. El partidor *Reverse* alinea por su parte con la región terminal del cassette de resistencia de Kanamicina ubicada en el plásmido pSUB11 (Uzzau *et al*., 2001), y también lleva una secuencia de 40 nucleótidos diseñada para alinear con una región rio abajo del gen de interés en la SPI-5 de *Salmonella* Typhi.

Los partidores comprobatorios fueron realizados de la misma manera, seleccionando secuencias que alinean con la región codificante del gen *sopB* (Partidor comprobatorio Forward), y con una región rio abajo del gen de interés (Partidor comprobatorio Reverse), ubicándolos a una distancia suficiente para poder detectar su fragmento resultante en un gel.

Para finalizar, se realizó una simulación de PCR con el fin de revisar los partidores comprobatorios utilizando el mismo programa SnapGene®, además, se realizó un análisis de las secuencias partidoras lo que nos permitió establecer las propiedades físicas de cada uno y los parámetros necesarios para realizar la metodología PCR descrita más adelante, utilizando el software bioinformático Online de acceso libre OligoCalc (Kibbe, 2007).

Para realizar el marcaje cromosomal de *sopB*-3×FLAG se siguió la técnica previamente descrita por Uzzau *et al*., 2001. A modo de resumen, esta técnica consiste en realizar un intercambio alélico en el locus original que codifica para nuestra proteína de interés, obteniendo como resultado la fusión con 3×FLAG, esto permite la producción de proteínas marcadas y la posterior detección mediante un *Western blot,* las colonias resultantes de la transformación fueron debidamente aisladas en placas suplementadas con el antibiótico Kanamicina, para así facilitar la selección del inserto.

Por último, la confirmación de la construcción de la cepa se realizó mediante 3 métodos, el primero, para confirmar la inserción del fragmento a nivel genómico, utilizando los partidores comprobatorios diseñados en los pasos anteriores las colonias resultantes fueron sometidas a PCRs comprobatorios realizados según las indicaciones del proveedor y de los parámetros

obtenidos mediante OligoCalc (Kibbe, 2007). El segundo método de confirmación fue realizado utilizando técnicas de microbiología básica, específicamente el Screening, el cual consiste en el aislamiento de las colonias y selección con antibióticos, para confirmar la inserción del epítopo de interés y la eliminación de los sitios de resistencia a kanamicina y ampicilina, brevemente, las placas fueron sometidas a procesos de aislamiento utilizando temperaturas que diferían con la temperatura óptima para el crecimiento del plásmido de interés, con la finalidad de que la bacteria por si sola eliminara tanto el plásmido Pkd46, requerido en pasos previos a la transformación, como el plásmido PSUB11 utilizado para la inserción del epítopo de interés (Uzzau *et al*., 2001), para terminar con una última transformación utilizando el plásmido Pcp20, el cual tiene como función la eliminación del cassette de resistencia a *Kanamicina* flanqueado por zonas FRT (Cherepanov *y* Wackernagel, 1995; Uzzau *et al*., 2001). El tercer método utilizado fue mediante secuenciación del fragmento resultante de los PCRs comprobatorios realizados, brevemente, las muestras resultantes de los PCRs comprobatorios fueron purificadas mediante un kit de purificación proteica estandar, posteriormente las muestras fueron enviadas a la Unidad de Secuenciación y Tecnologías Ómicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile, desde donde se recibió una base de datos con la muestra secuenciada, la cual fue analizada mediante el programa SnapGene®.

6.2 Comparar la presencia de SopB en muestras de *S.* Typhi obtenidas desde un cultivo con condiciones estándar de laboratorio y desde un cultivo con condiciones similares a la etapa intestinal del ciclo infectivo.

6.2.1 Racional.

La presencia de los factores de virulencia en *S*. Typhi y sus vesículas está respaldado por un análisis proteómico realizado bajo condiciones de laboratorio. Sin embargo, es necesario demostrar experimentalmente la presencia del factor de virulencia SopB en la bacteria cultivada bajo condiciones de infección, lo que nos daría un indicativo de su presencia o ausencia en las OMVs obtenidas en condiciones de cultivo similar a las

encontradas durante la fase de infección intestinal, permitiéndonos postular un método de entrega alternativo de la proteína de interés.

6.2.2 Estrategia experimental 2.

Para la realización de este objetivo las bacterias fueron cultivadas en dos condiciones: 1) Condiciones de laboratorio (Luria-Bertani, 0.086 M NaCl) con agitación (aeróbica) y 2) Condiciones intestinales (LB, 0.3 M NaCl en una jarra GasPakTM con OxoidTM CampyGemTM (microaerofilia) y 0.5% de bilis).

Posteriormente, las proteínas fueron extraídas utilizando métodos de extracción estándar y comparadas en cuanto a la presencia de SopB::3×FLAG mediante *Western Blot*. Como control positivo, se utilizó SipCC::3×FLAG, Mientras que, como control negativo, utilizaremos buffer de carga estándar.

6.2.3 Metodología 2.

El marcaje cromosomal de S*opB*-3×FLAG se realizó siguiendo la técnica previamente descrita por Uzzau *et al*., 2001. El *Western blot* se realizó siguiendo los protocolos estándar para esta técnica (Nevermann *et al*., 2019). Para detectar tanto SopB::3×FLAG y SipC:: 3×FLAG se utilizaron anticuerpos de ratón dirigidos al epítopo FLAG (Uzzau *et al*., 2001).

7. RESULTADOS.

7.1 Construir la cepa que presente la construcción *sopB*-3×FLAG.

7.1.1 Trabajo previo *In silico.*

La construcción de partidores específicos para poder realizar el marcaje de nuestra proteína de interés con el epítopo 3×FLAG, epítopo que nos permite detectar de mejor manera la presencia de SopB tanto en las fracciones celulares, cómo en las vesículas de *S.* Typhi extraídas desde distintos medios de cultivo, en este caso específico, cultivos estándar de laboratorio y cultivos que asemejan las condiciones de invasión a las que *Salmonella* se ve expuesta en el intestino.

Bajo este contexto y después de un análisis bibliográfico previo se realizó la construcción de dichas secuencias de manera virtual como fue descrito anteriormente.

Las secuencias de partidores utilizadas en este trabajo están especificadas en la Tabla 2

Partidor	Secuencia 5' → 3'	Gen	Código Uniprot
"Uzzau" Forward	TTGGCAGTCAGTAAAAGGTATTTCTTCATTAATCACATCTGACTACAAAGACCATGACGG	*sopB*	Q8Z7R1
"Uzzau" Reverse	CGCGTCATATAAACGATTTAATAGACTTTCCATATAGTTACATATGAATATCCTCCTTAG		
"Comprobatorio" Forward	ACGAGTTGGGGATGA		
"Comprobatorio" Reverse	CTTCTGGCGCATCCA		

, y tienen como finalidad la amplificación de la región de interés del plásmido pSUB11 y su posterior inserción dentro del genoma de *Salmonella* Typhi, y, además, la comprobación de que la inserción resulto de manera exitosa.

Tabla 2 Secuencias de partidores utilizados para la amplificación de la región de interés del plásmido PSUB11 que nos permitirá el marcaje de nuestra proteína de interés y posterior confirmación del exitoso inserto del constructo en el genoma de S. Typhi.

Partidor	Secuencia 5' → 3'	Gen	Código Uniprot
"Uzzau" Forward	TTGGCAGTCAGTAAAAGGTATTTCTTCATTAATCACATCT GACTACAAAGACCATGACGG	*sopB*	Q8Z7R1
"Uzzau" Reverse	CGCGTCATATAAACGATTTAATAGACTTTCCATATAGTTA CATATGAATATCCTCCTTAG		
"Comprobatorio" Forward	ACGAGTTGGGGATGA		
"Comprobatorio" Reverse	CTTCTGGCGCATCCA		

Los partidores denominados como Uzzau (Forward y Reverse), cuentan con 40 nucleótidos de largo que alinean con dos regiones de la SPI-5 de *Salmonella* Typhi como se muestra en la Figura 6 y poseen una región de 20 nucleótidos de longitud, la que alinea específicamente con la región de interés respectiva del plásmido PSUB11 que presenta un tamaño especifico de 1.546 pares de base (Tabla 3.), dentro de esta región podemos encontrar tanto el epítopo 3×FLAG, como un cassette de resistencia a antibióticos, específicamente un cassette de resistencia a Kanamicina y zonas Frt.

El alineamiento para cada set de partidores es especifico, en la Figura 6 se nos muestran las regiones de la isla 5 de *S.* Typhi, donde alinea el partidor Forward, dicho partidor presenta como particularidad su ubicación, este se encuentra emplazado justo antes del codón *stop* de la proteína, debido a que el inserto debe ser ubicado de tal forma que la proteína pueda sintetizarse junto con el epítopo insertado, permitiendo así la síntesis de una proteína funcional y además, el marcaje exitoso de esta, facilitando a su vez una posterior detección. Por otra parte, el partidor Reverse se encuentra ubicado

para alinear con una región de la isla 5 de *S.* Typhi que se encuentra rio abajo de nuestro gen de interés como se puede apreciar en la Figura 5.

Posterior al diseño de los partidores se realizaron PCRs *in silico* confirmando el funcionamiento teórico de estos y el tamaño total de nuestro fragmento de interés, que como fue mencionado anteriormente es de aproximadamente 1546 pares de bases (Tabla 3.).



Figura 6. Regiones donde alinean los partidores creados para realizar el inserto del epítopo 3×FLAG.

La imagen nos muestra las zonas de alineamiento en el gen *sopB* del partidor Forward (A) y Reverse (B), cada uno cuenta con una región sobrante que presenta como función el alineamiento con el fragmento respectivo del plásmido PSUB11.

Por otra parte, los partidores comprobatorios presentados en la Figura 7 tienen como finalidad amplificar el fragmento comprendido entre ellos, con el objetivo de detectar la inserción del epítopo 3×FLAG, el partidor Forward (Fwd) alinea específicamente con una zona ubicada en la región codificante del gen *sopB*, mientras que el partidor Reverse (Rvs) alinea con una región rio abajo del gen de interés (Figura 7). Ambos partidores presentan 25 nucleótidos de longitud y están distanciados por 403 pares de bases (bp),

distancia suficiente para poder ser visualizada en un gel de agarosa en caso de que no exista inserción del fragmento de interés, tal como se puede apreciar en la Tabla 3.



Figura 7. Regiones donde alinean los partidores comprobatorios del constructo sopB-3×FLAG.

La imagen nos muestra las zonas de alineamiento en el gen *sopB* de los partidores comprobatorios Forward (A) y Reverse (B), armados para confirmar la presencia del inserto dentro de la región planteada.

Tabla 3. Tamaños esperados para los productos PCR, resultados de la amplificación In Silico para cada set de partidores, estos tamaños serán cotejados con los resultados presentados en las electroforesis a realizar, con el fin de comparar resultados experimentales y teóricos.

Fragmento	Tamaño
3×FLAG - Psub11	1546 bp.
Región SopB entre los partidores comprobatorios	403 bp.
Gen SopB	1686 bp.
Constructo SopB::3×FLAG	1949 bp.
Fragmento KanR (Resistencia a Kanamicina)	795 bp.

7.1.2 Prueba de partidores y transformación de la cepa

Para corroborar el funcionamiento de los partidores diseñados se realizaron una serie de PCRs comprobatorios de control, los resultados expuestos en la **Figura 8** nos muestran que las bandas resultantes de la amplificación del fragmento de interés del plásmido PSUB11 presentan un tamaño de aproximadamente 1500 pares de bases, este tamaño se pudo corroborar mediante comparación con las bandas presentes en el Ladder de la Figura 8(B), indicando que nuestro fragmento obtenido tiene un tamaño aproximado al indicado previamente según el diseño de los partidores y los PCRs *in silico* (Tabla 3), dando como resultado una banda cercana a los 1500 bp (1546 bp exactos según nuestro PCR *in silico*). Este resultado puede interpretarse como una exitosa amplificación del fragmento de interés del plásmido pSUB11 lo que nos permitió continuar con una serie de PCRs de mayor volumen con la finalidad de “producir en masa” nuestro constructo para continuar con la inserción de este mediante la electro-transformación de nuestras bacterias para poder obtener nuestra cepa.

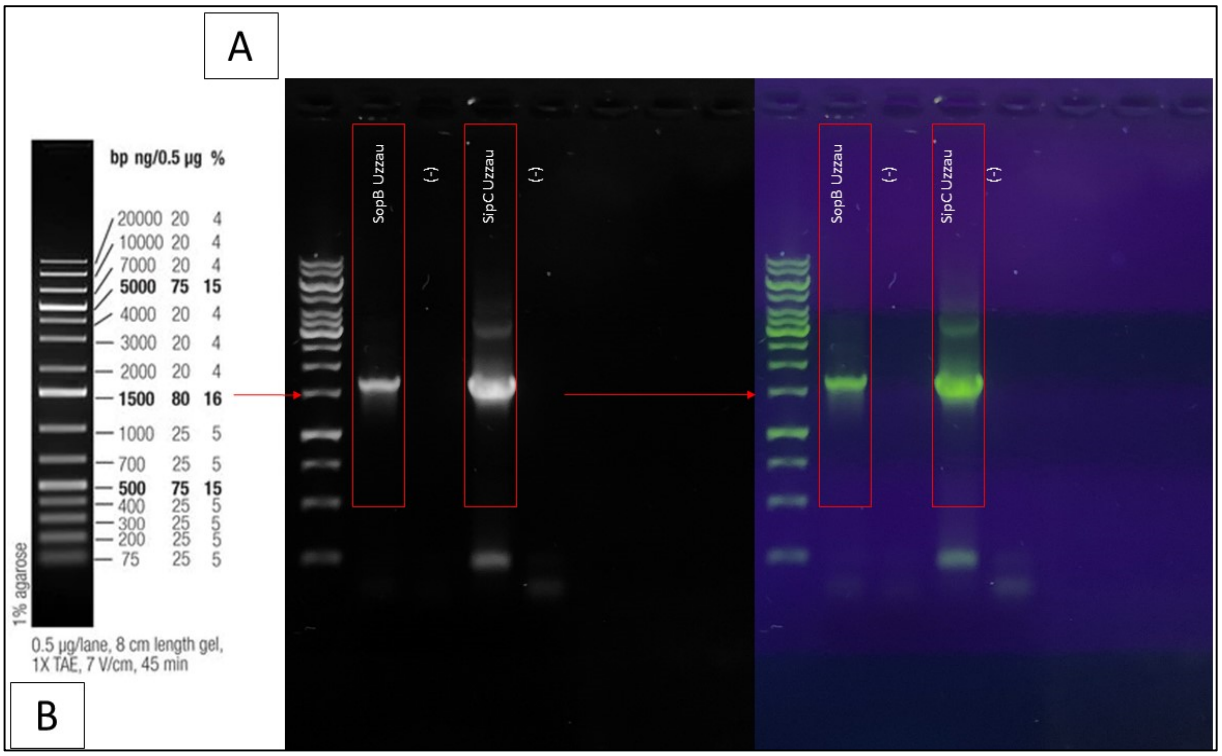


Figura 8. (A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% resultante de la amplificación por PCR de los partidores diseñados y presentados en las anteriores figuras junto con el plásmido PSUB11 como templado.

Carril 1: Ladder. Carril 2: SopB- Uzzau. Carril 3: control negativo SopB-Uzzau. Carril 4: Control positivo con partidores SipC-Uzzau. Carril 5: Control negativo SipC-Uzzau

(B) Especificación de tamaños del ladder 1kb Ladder de Thermofisher en un gel de agarosa al 1%.

La imagen nos muestra la amplificación positiva del fragmento de interés, probando que los partidores diseñados en los pasos anteriores funcionan de manera correcta.

La transformación para obtener la cepa de interés, denominada desde ahora cómo SopB::3×FLAG se realizó como fue mencionado en el apartado de metodología siguiendo los protocolos de Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner, 2000), esto dio como resultado 2 colonias viables que presentaron crecimiento post transformación en medio LB suplementado con el antibiótico Kanamicina, sugiriendo una posible inserción del constructo de interés dentro del genoma de *S.* Typhi, como se muestra en la Figura 9, dichas colonias fueron debidamente aisladas según los protocolos utilizados, con el objetivo de realizar los PCR comprobatorios para verificar la inserción de nuestro constructo.

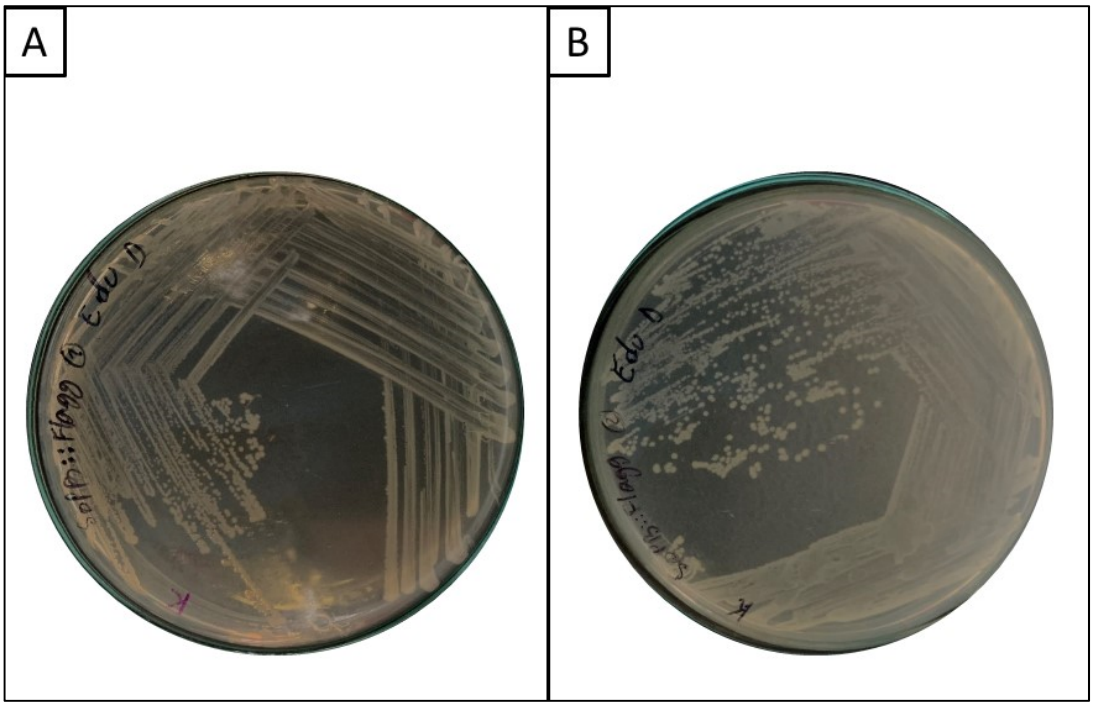


Figura 9. Fotografías de las placas donde fueron aisladas las colonias transformadas con el producto amplificado de PSUB11 que contiene el epítopo 3×FLAG.
La imagen muestra crecimiento bacteriano en dos placas suplementadas con el antibiótico kanamicina, resultante de una transformación exitosa con el plásmido pSub11.

7.1.3 Comprobación de la construcción

Los resultados de los PCRs comprobatorios a las colonias extraídas desde las placas presentadas en la Figura 9 muestran dos bandas cercanas a los 2000 pares de bases (Figura 10), ubicada en los carriles 3 y 4 respectivamente.
Según el trabajo *in silico* el tamaño previsto de nuestro constructo alcanzaría sobre los 1900 bp, en contraste con el carril 2, donde se presenta el resultado utilizando dna de una cepa *wild type* y en donde se obtiene una banda cercana a los 400 bp. El desglose de los tamaños se muestra en la tabla 3 expuesta anteriormente.

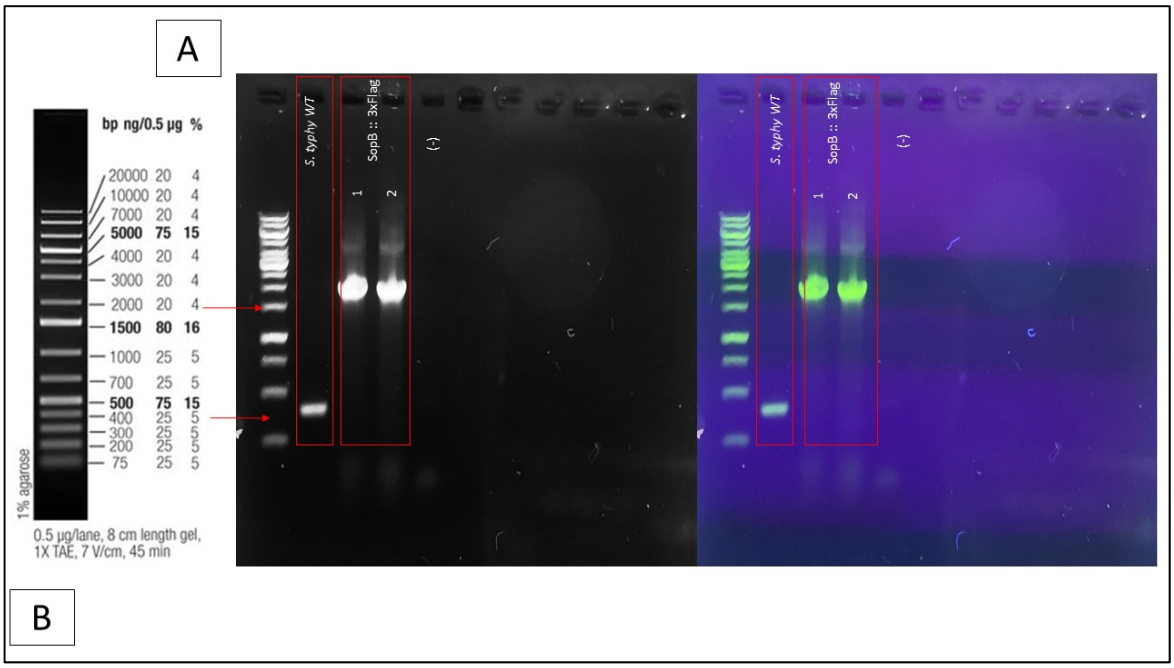


Figura 10. (A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% resultante de la amplificación por PCR de los partidores comprobatorios diseñados y presentados en las anteriores figuras utilizando como templado DNA extraído desde colonias de *S.* Typhi *wild type* y la cepa transformada Sopb:: 3×FLAG .
Carril 1: Ladder. Carril 2 y 3: SopB::3×FLAG , de ambas placas aisladas (Figura 8). Carril 4: control negativo.
(B) Especificación de tamaños del ladder 1kb Ladder de Thermofisher en un gel de agarosa al 1%.
Como se puede apreciar en la figura, la banda resultante del carril 2 tiene un tamaño cercano a los 400 pares de bases, lo que indicaría que en esta colonia de *S.* Typhi *wild type* **no posee** la inserción del constructo, contrario a los carriles 3 y 4 cuyo DNA fue extraído de colonias aisladas post transformación, por ende presentan un tamaño cercano a los 2000 pares de base, indicando que en ambas placas las colonias presentan este constructo integrado en su genoma, y más específicamente en la zona prevista. Los tamaños específicos para cada constructo se encuentran especificados en la **Tabla 3.**

Con esto, es posible confirmar que, la inserción del epítopo 3×FLAG en el genoma de las colonias extraídas desde las placas presentadas en la Figura 9, fue exitoso, es decir, el fragmento previamente amplificado fue insertado en el marco propuesto de manera teórica en las etapas tempranas de nuestro trabajo, ya que las bandas resultantes expuestas en la Figura 10 presentan un tamaño cercano al tamaño teórico especificado en la Tabla 3.

Estos resultados nos permitieron continuar con el proceso de armado de la cepa cómo fue expuesto en la sección de metodología, a modo de resumen, fue realizada una última transformación utilizando el plásmido Pcp20, con el fin de eliminar las zonas de resistencia a antibióticos presentes en la cepa

mediante la unión de las zonas Frt propias del plásmido pSUB11 utilizado en las fases tempranas del armado de la cepa.

El resultado exitoso de la transformación posterior fue corroborado de tres maneras:

1) PCRs comprobatorios: Cómo se puede observar en la Figura 10, en los carriles 4 y 5, podemos notar la presencia de una banda de menor tamaño en comparación a las bandas observadas en el carril 3 de esta misma figura y, además, en los carriles 3 y 4 de la Figura 10. Esto nos indica la pérdida de un fragmento dentro del inserto, dicho fragmento corresponde al fragmento que contiene el cassette de resistencia al antibiótico Kanamicina, el cual, según lo expuesto en la Tabla 3, tiene un tamaño de 759 pares de bases, dicha perdida indica que el plásmido insertado pudo eliminar la zona de resistencia al antibiótico (Kanamicina) mediante la unión de las zonas Frt propias del constructo genético.

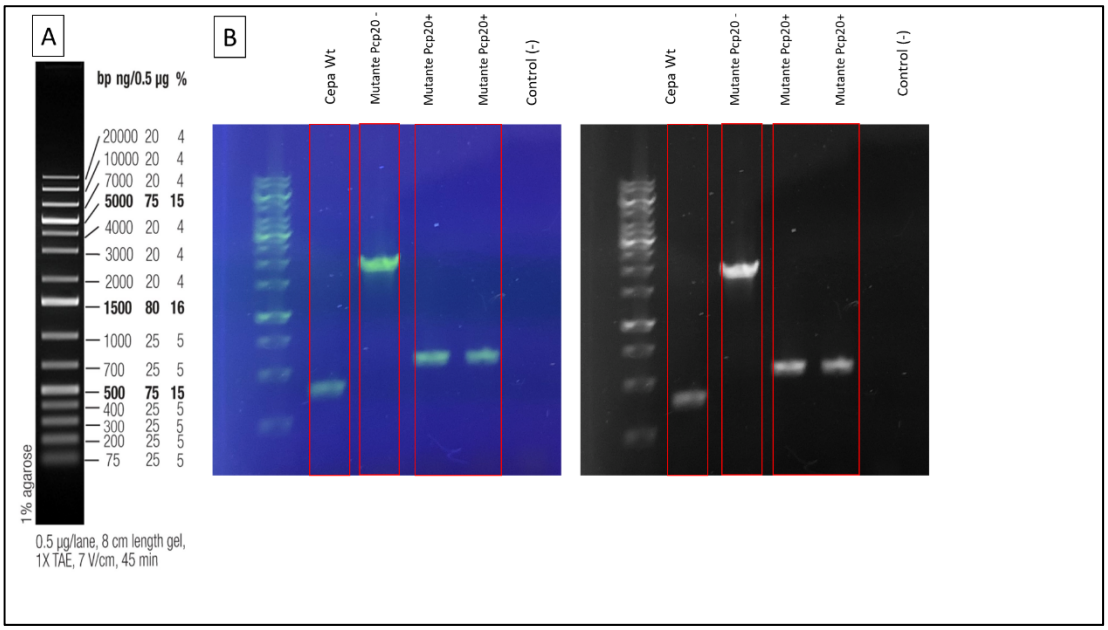


Figura 11.. (A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% resultante de la amplificación por PCR de los partidores comprobatorios y DNA post transformación con Pcp20.

El DNA utilizado como templado fue extraído desde colonias de *S.* Typhi *wild type*, la cepa transformada Sopb:: 3×FLAG, una colonia previa a la transformación con Pcp20 (Pcp20 -) y dos colonias resultantes de la transformación con Pcp20 (Pcp20+), la imagen nos muestra que la mutante Pcp20+ presenta un menor tamaño, indicando la pérdida del fragmento de resistencia a Kanamicina.

(B) Especificación de tamaños del ladder 1kb Ladder de Thermofisher en un gel de agarosa al 1%.

Carril 1: Ladder. Carril 2: *S.* Typhi *wild type*, Carril 2: *S.* Typhi SopB :: 3×FLAG (Pcp20 -), Carril 3 y 4: *S.* Typhi SopB :: 3×FLAG (Pcp20 +) y Carril 4: Control negativo.

2) Plaqueo con antibióticos y Screening: Adicionalmente al método de comprobación genómico presentado anteriormente la cepa fue sometida a una serie de procesos de aislados y exposiciones a temperaturas que diferían de sus temperaturas de crecimiento optimas, en la Figura 11 podemos observar que la cepa perdió todo tipo de resistencia a antibióticos, la ausencia de crecimiento en placas LB suplementadas con los antibióticos Ampicilina y Kanamicina (B y C, Figura 11.) indica la eliminación completa de la zona de resistencia a Kanamicina propia del plásmido PSUB11 y, además, de los plásmidos adicionales utilizados en las fases tempranas del proceso de construcción de la cepa, cómo Pkd46, el cual posee una zona de resistencia a Ampicilina.

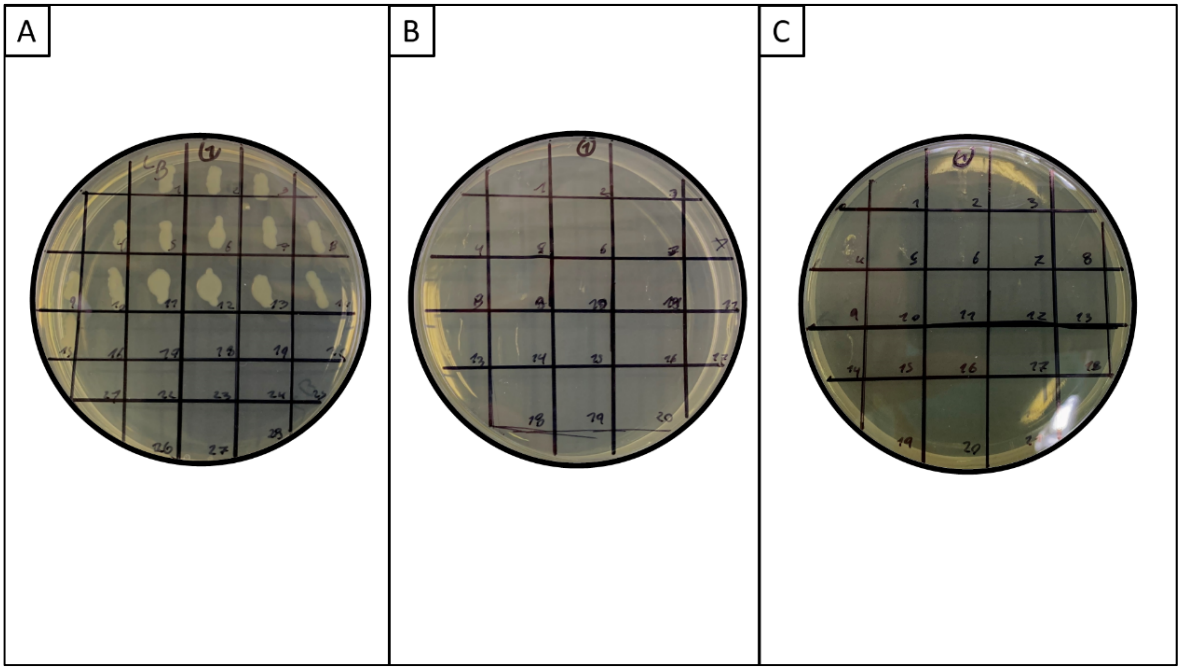


Figura 12. Sembrado de 15 colonias de la cepa SopB::3×FLAG /Pcp20 en placas suplementadas con antibióticos. A. medio LB; B. placa suplementada con ampicilina, C. Placa suplementada con Kanamicina.

Es posible observar el nulo crecimiento de las 15 colonias en las réplicas B y C, resultado que nos permite inferir una efectiva eliminación de los plásmidos resistentes, obteniendo así una cepa completamente apta para el trabajo.

3) Secuenciación: Por último, el resultado obtenido mediante el PCR comprobatorio fue debidamente purificado y enviado a secuenciar, lo que resultó en dos fragmentos a analizar, los cualesse exponen en la siguiente tabla.

Tabla 4 Tamaños específicos de las secuencias entregadas por el laboratorio.

Nombre secuencia de interés	SopB::3×FLAG Fw	SopB::3×FLAG Rv	Epítopo 3×FLAG
Longitud	529 bp	866 bp	66 bp

El siguiente paso fue analizar si las secuencias resultantes tienen relación al genoma de *Salmonella* Typhi, para esto se decidió alinear la secuencia SopB::3×FLAG FW y la secuencia del gen SopB de *Salmonella* Typhi Sth 2370, cuyos resultados podemos observar a continuación

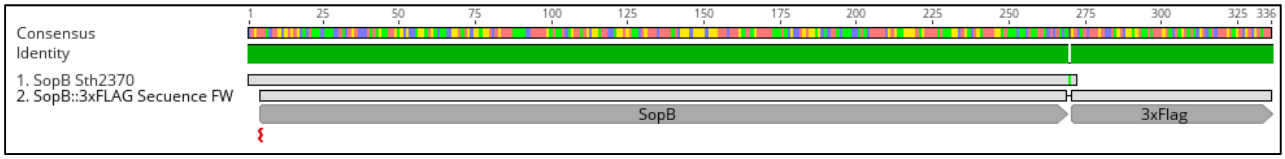


Figura 13.. Alineamiento de secuencias nucleotídicas mediante el programa Geneious (1). Secuencia de nucleótidos extraída desde el genoma de *Salmonella* Typhi STH 2370. (2). Secuencia SopB::3×FLAG Fw presentada en la tabla 4 obtenida mediante el proceso de secuenciación del tipo Sanger de los fragmentos amplificados por PCR presentados en la Figura 10. La longitud total de las secuencias alineadas es de 268 bp, con 267 de ellas perfectamente alineadas, dando un porcentaje de identidad de 99,6%.

Simbología: Adenina, Timina, Citosina y Guanina.

En la Figura 13 se presenta un alineamiento mediante el programa *Geneious prime*, donde de las secuencias SopB Sth2370 de 270 bp visibles, correspondiente al gen *wild type* que codifica para SopB, y la secuencia SopB::3×FLAG Fw, correspondiente al resultado de la secuenciación de la cepa. En la figura es posible apreciar que no existen incongruencias dentro del alineamiento a lo largo de la secuencia que codifica para SopB, el único gap que se puede apreciar se ubica en la región de inserto del epítopo 3×FLAG , lo que probablemente no afectaría a la traducción de la proteína de interés ni del epítopo insertado.

El análisis nos indica que existe un porcentaje de similitud del 99,6% entre ambas secuencias, particularmente en la región marcada en la Figura 13 como SopB, indicando que ambas secuencias comparten 267 de un total de 268 pares de bases, mostrando que la inserción del epítopo de interés no generó mayores alteraciones en la secuencia de nuestro gen, es más, se podría postular que este no vería afectada su transcripción y posterior traducción. Por lo que el siguiente paso en la comprobación del constructo fue analizar las secuencias proteicas resultantes de la traducción de nuestros productos mediante un alineamiento de las secuencias proteicas resultantes SopB'-3×FLAG 3×FLAG Fw y SopB STH2370.

En la Figura 14 se presentan las secuencias mencionadas en la figura anterior traducidas *in silico*, podemos observar que presentan un elevado porcentaje de identidad (92,6 %), solo observando incongruencias en el alineamiento en el sector que corresponde al inicio de nuestra secuencia resultante (superior izquierda de la Figura 14), la cual puede corresponder a los extremos de baja fidelidad propios de la secuenciación, además se puede apreciar en la parte inferior derecha de la figura la secuencia "DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK" la cual corresponde a la secuencia proteica del epítopo 3×FLAG, indicando (de manera teórica) la traducción eficiente de nuestra proteína y epítopo de interés.

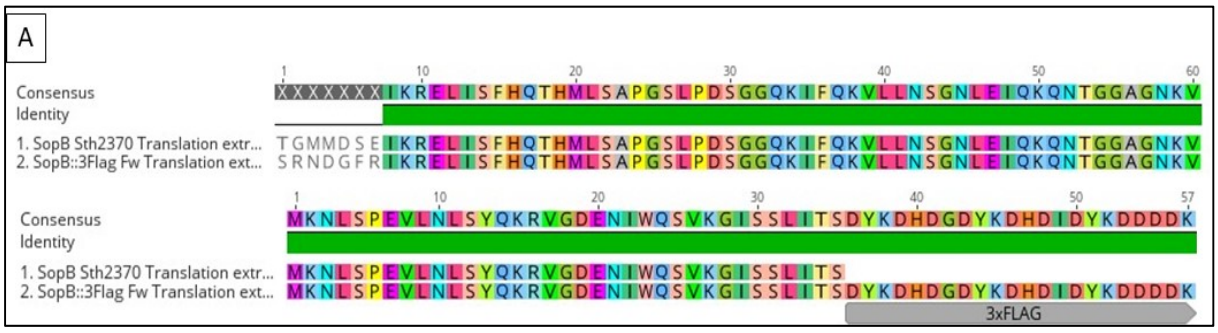


Figura 14.. A) Alineamiento de secuencias proteicas mediante el programa Geneious (1). Secuencia de nucleótidos extraída desde el genoma de *Salmonella* Typhi STH 2370. (2). Secuencia SopB::3×FLAG Fw presentada en la tabla 4 obtenida mediante el proceso de secuenciación del tipo Sanger de los fragmentos amplificados por PCR presentados en la Figura 10. El alineamiento presenta un porcentaje de identidad de 92,6 %.

Con estos resultados podemos concluir que la inserción del fragmento de interés y por ende la construcción de nuestra cepa resultó exitosa, esta cepa fue posteriormente almacenada en el cepario perteneciente al laboratorio con el fin de ser utilizada en futuros experimentos, cabe destacar que dichos análisis fueron realizados *in silico* y no toman en cuenta la funcionalidad de la proteína resultante, la cual se verá analizada en futuros experimentos con SopB.

7.2 Comparar la presencia de la proteína SopB en la fracción celular y el sobrenadante de *Salmonella* Typhi cultivada en condiciones estándar de laboratorio y condiciones asociadas a la etapa intestinal de su ciclo infectivo.

7.2.1 Western Blot

El trabajo *in silico* realizado previo al *western blot* nos indicó los tamaños referenciales, tanto para nuestro epítopo, nuestra proteína de interés SopB y para la proteína marcada, dichos tamaños pueden ser observados en la siguiente tabla.

Tabla 5 tamaños proteicos teóricos basados en la bibliografía y el trabajo *in silico.*

Proteína	Tamaño (Kda)
SopB *Wild type*	62 Kda
3×FLAG	2.7 Kda
SopB::3×FLAG	64.7 Kda

En lo que respecta a la identificación de la proteína de interés marcada con el epítopo 3×FLAG, en la Figura 15 podemos apreciar un gel de poliacrilamida al 12%, en donde se realizó el *western blot* para la fracción del pellet celular extraído desde condiciones de cultivo relacionadas a las etapas intestinales de infección y condiciones de cultivo estándar de laboratorio. Los resultados nos indican que es posible identificar claramente las bandas que nos muestran la presencia de la proteína de interés SopB, la cual presenta un tamaño cercano a la banda que marca los 70 Kda, (64,7 Kda de tamaño conocido) en los carriles 4 y 5 de nuestra figura, indicando que en la fracción del pellet celular, la presencia de SopB puede ser identificada en el medio intracelular de células de *Salmonella* Typhi cultivadas tanto en condiciones relacionadas al ciclo infectivo, cómo en cultivos estándar de laboratorio, demostrando que la producción de esta proteína puede ocurrir sin la necesidad de verse estimulada por agentes estresores, cómo nuestra condición intestinal.

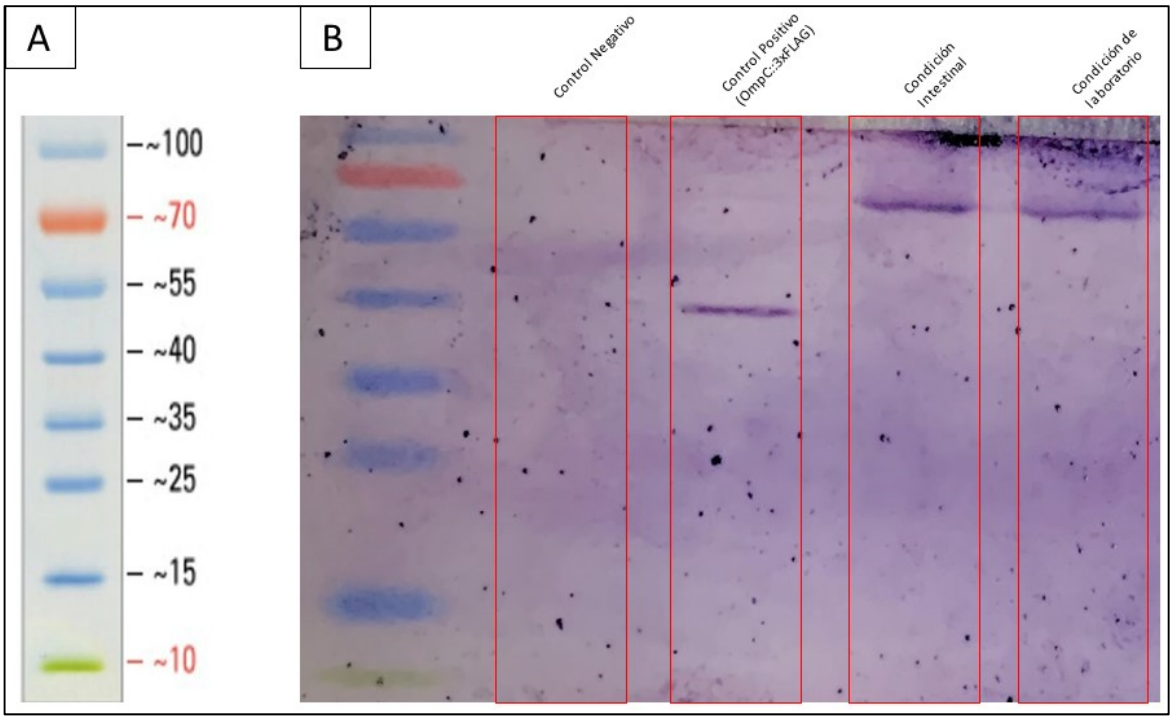


Figura 15. *Western blot* con muestras de pellet celular extraído de condiciones estándar de laboratorio y condiciones de cultivo relacionadas al ciclo infectivo

A) Especificación de tamaños de Ladder proteico en un gel de poliacrilamida.

(B) Gel de poliacrilamida al 12% con muestras correspondientes al pellet celular resultante de la extracción de proteínas desde células cultivadas en nuestras condiciones de estudio estándar y condiciones relacionadas al ciclo infectivo (Bilis 0,5%, NaCl 300 µM y micoraereofilia) bajo los métodos previamente descritos.

Carril 1: Ladder, Carril 2: Control negativo (Buffer), Carril 3: Contro positivo (OmpC:: 3×FLAG), Carril 4: SopB:: 3×FLAG condición estándar de laboratorio, Carril 4: SopB:: 3×FLAG

Posteriormente, en la Figura 16 se presenta un segundo gel de poliacrilamida al 12% en donde se realizó el *western blot* de la fracción sobrenadante, extraída desde condiciones de cultivo que asemejan el ciclo infectivo de *S.* Typhi y condiciones estándar de laboratorio. Los resultados nos indican que en la condición estándar se presenta de manera tenue la banda que marca la presencia de SopB, mientras que en la columna siguiente podemos observar la notoria presencia de la banda donde se debería encontrar nuestra proteína, indicando que en el sobrenadante celular y por ende en su medio externo la presencia de esta proteína se ve aumentada en condiciones intestinales, por lo que la estimulación por parte de un ambiente estresor, cómo las condiciones que simulan el ambiente intestinal durante la infección de un hospedero, ven aumentada la liberación y exportación de esta proteína al medio extracelular, por medio de los distintos métodos de secreción.

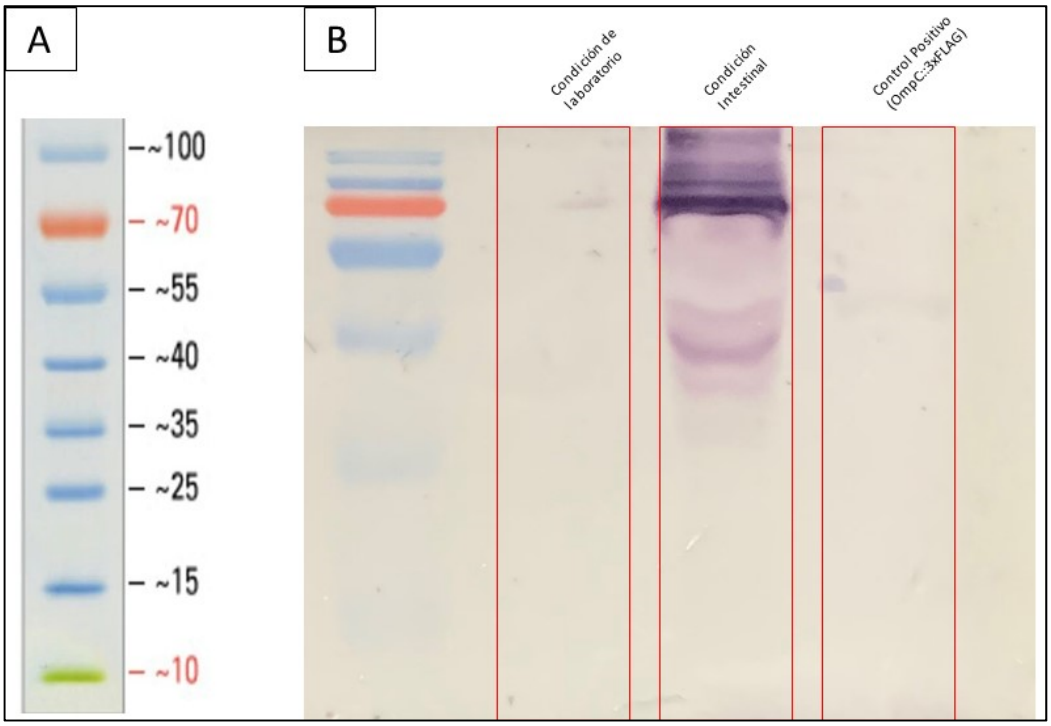


Figura 16. *Western blot* con muestras de sobrenadante celular extraído de condiciones estándar de laboratorio y condiciones de cultivo relacionadas al ciclo infectivo.

(A) Especificación de tamaños de Ladder proteico en un gel de poliacrilamida.

(B) Gel de poliacrilamida al 12% con muestras correspondientes al sobrenadante celular resultante de la extracción de proteínas desde células cultivadas en nuestras condiciones de estudio estándar y condiciones relacionadas al ciclo infectivo (Bilis 0,5%, NaCl 300 µM y microaereofilia) bajo los métodos previamente descritos.

Carril 1: Ladder, Carril 2: SopB::3×FLAG en condiciones estándar de laboratorio, Carril 3: SopB:: 3×FLAG en condiciones relacionadas al ciclo infectivo, Carril 4: Control positivo (OmpC:: 3×FLAG)

8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo hemos aplicado las herramientas desarrolladas para el marcaje a nivel molecular de proteínas de interés mediante epítopos fácilmente detectables mediante anticuerpos, o marcaje mediante epítopos (*Epitope tagging*) con el objetivo de marcar, detectar y analizar la producción de la proteína de interés SopB en distintas condiciones de cultivo relacionadas a la invasión de *Salmonella* Typhi.

Brevemente, mediante el trabajo de marcaje mediante epítopos se logró la construcción de la cepa SopB::3×FLAG, corroborando mediante métodos moleculares como PCRs y secuenciación, y mediante métodos de microbiología básica el correcto armado de esta cepa, la cual fue debidamente almacenada en el cepario propio del laboratorio. Posteriormente la cepa fue incubada en nuestras condiciones de crecimiento planteadas durante este trabajo y mediante el método de *western blot*, fue analizada la presencia de SopB en tres fracciones distintas, intracelular (Pellet), extracelular (Sobrenadante) y más específicamente en las vesículas de membrana externa u OMVs por sus siglas en inglés, obteniendo como resultados niveles de presencia que indicarían que la producción de esta proteína no tiene relación con la condición ambiental a la que *Salmonella* Typhi se ve expuesta, mostrando presencia de SopB en la fracción intracelular extraída de ambas condiciones de estudio, por otra parte pudimos observar que la presencia de SopB en el medio extracelular si se ve afectada por las condiciones de invasión, mostrando una elevada producción de la proteína tanto en el medio extracelular, como en las vesículas, en contraste con los niveles mostrados para las condiciones de cultivo estándar, cimentando también la relación entre la función ejercida por la proteína y el ciclo infectivo de nuestro modelo de estudio.

8.1 De la construcción de la cepa

El marcaje mediante epítopos consiste en la unión de una región (epítopo) ampliamente conocida a una proteína de interés mediante ingeniería genética, dicha técnica hace posible detectar proteínas para las que no existe un anticuerpo especifico (Brizzard, 2008). El marcaje mediante epítopos se ha

convertido rápidamente en una herramienta estándar para la caracterización purificación y detección de proteínas expresadas bajo ciertas condiciones de interés (Jarvik y Telmer, 1998), según lo expuesto por Uzzau (Uzzau *et al*., 2001), el método de marcaje mediante epítopos ofrece un buen número de ventajas por sobre otras técnicas de genes reporteros: i no requiere la actividad enzimática del producto de un gen reportero, y ii es mínimamente disruptivo debido al pequeño tamaño del epítopo agregado, algo que claramente podemos apreciar en nuestros resultados, donde observamos que la inserción del epítopo no altera de manera considerable el tamaño del gen, ni el tamaño y composición proteica de SopB, presentándonos unos niveles de similitud entre las secuencias de un 92,6% (Figura 14), gracias a estos resultados se puede confirmar con propiedad, que la inserción del epítopo de interés fue dentro de los marcos postulados al principio de nuestra investigación, además, dicha inserción no genera una alteración estructural en el gen ni en la proteína de interés, permitiendo su expresión y posterior detección, tal y como fue corroborado en los resultados posteriores, cabe destacar que pese a que nuestro epítopo no altera la estructura del gen ni de la proteína, desconocemos si esta inserción tiene algún efecto en la función de esta, aunque existe evidencia que nos indica que el marcaje mediante el epítopo 3xFLAG no altera la actividad de las diferentes proteínas marcadas, ni la habilidad de internalización de cepas de *Salmonella* Typhimurium que presenten el inserto (Giacomodonato *et al*., 2007; Lobbestael *et al*., 2010; Uzzau *et al*., 2001), es necesaria una futura aproximación experimental relacionada a la internalización de células SopB::3×FLAG que nos permita corroborar que la función de la proteína SopB no se ve alterada en nuestro modelo de estudio, ya sea disminuyendo su eficacia, o evitando que la función pueda realizarse del todo.

8.2 De la presencia de SopB

Nuestros resultados nos indican que, las muestras extraídas y purificadas del pellet celular de cultivos de *S.*Typhi expuestos a nuestras condiciones de cultivo, mostraron presencia de la proteína SopB marcada con el epítopo 3×FLAG, al analizar la figura de pellet celular presentada en el acápite de resultados (Figura 15) podemos inferir que, i) la proteína marcada se presenta de manera similar en cultivos estándar de laboratorio y cultivos relacionados al ciclo infectivo de *Salmonella* Typhi y ii) dicha presencia de la proteína SopB podría indicar niveles de producción de la proteína similares entre las dos condiciones estudiadas, sugiriendo que el proceso de producción de la proteína no dependiente de las condiciones ambientales a las que *Salmonella* Typhi se ve enfrentada.

Esto último presenta concordancia con lo expuesto en la literatura, ya que previamente se ha demostrado que en muestras de *S. enterica* pertenecientes a distintos serotipos (entre ellos Typhi y Typhimurium) es posible identificar producción de SopB bajo condiciones estándar de cultivo, pero con diferencias cuantitativas entre los distintos serotipos analizados (Streckel *et al*., 2004).

Al analizar las muestras de sobrenadante celular (Figura 16) podemos concluir que existe una mayor presencia de SopB en las muestras extraídas desde cultivos con condiciones similares a la etapa intestinal, esto se puede asociar a que dicha proteína estaría siendo externalizada de mayor manera en condiciones relacionadas al ciclo infectivo en comparación a las condiciones estándar de laboratorio, previamente se ha demostrado que existe presencia y secreción de proteínas efectoras en condiciones relacionadas al ciclo infectivo, o en las denominadas condiciones de expresión de la SPI-1, tal como lo describieron los investigadores, condiciones que pretenden simular el ambiente intestinal al que se ve expuesta la bacteria (Giacomodonato *et al*., 2007), cabe destacar que si bien el estudio de Giacomodonato y su grupo utiliza el serotipo Typhimurium, pese a todas las diferencias genotípicas y de hospedero ya mencionadas, sugerimos que es posible extrapolar dichas afirmaciones y respaldarlas con nuestros datos obtenidos, presencia que además se relaciona fuertemente con la función que cumple SopB dentro del ciclo infectivo de *Salmonella enterica,* y más en específico de nuestro serotipo

de estudio (Typhi). Al ser una proteína efectora, SopB cumple su rol después de ser secretada al ambiente extracelular, más específicamente en la célula hospedero mediante distintos métodos ya profundizados y que ahondaremos más adelante, estos resultados nos permiten inferir que bajo condiciones similares al ciclo infectivo (Presencia de bilis, microaerofilia y alta osmolaridad), la presencia de SopB en el ambiente extracelular se verá aumentada, sugiriendo la secreción de nuestra proteína al ambiente con el fin de cumplir su función, ya que detectaría señales ambientales similares a esta fase de la invasión.

Si bien nuestros resultados son auspiciosos, cabe destacar que pese a que ambos *western blot* realizados fueron estandarizados para que las muestras cargadas llevaran la misma cantidad de proteínas (50µg), estos no incluyeron un control de carga, necesario para dilucidar visualmente si las diferencias entre las bandas son resultado de la presencia de la proteína o efecto de una carga desigual de muestra en los carriles del gel. Por lo que dicha ausencia puede resultar en una incertidumbre para nuestros resultados obtenidos.

Pese a las incertidumbres asociadas a la metodología, se logró obtener evidencia de la presencia de la proteína SopB en la fracción del sobrenadante celular extraído de medios de cultivo que simulan las condiciones intestinales que experimenta *Salmonella* Typhi dentro del hospedero, infiriendo que esta proteína estaría siendo externalizada por parte de las células bacterianas, lo que nos plantea la siguiente pregunta, ¿mediante qué métodos estaría siendo externalizada?, es sabido que la proteína SopB es externalizada mediante el sistema de secreción del tipo 3 codificado en la isla de patogenicidad 1 (Hapfelmeier *et al*., 2004) con la finalidad de cumplir su función en el interior de las células hospedero. En un análisis anexo, realizado posteriormente al desarrollo de esta tesis, nuestro grupo de estudio pudo identificar una mayor presencia de la proteína SopB en vesículas de *S.* Typhi cultivada en las mismas condiciones de cultivo que en nuestro trabajo (0,5 % de bilis, 0,3 µM NaCl y microaerofilia). Esto sumado a que anteriormente durante estudios proteómicos realizados por nuestro grupo de estudio se logró identificar la presencia de varios efectores relacionados al TTSS-1, entre ellos SopB en condiciones estándar de laboratorio (datos no publicados). Estos datos nos sugieren que las vesículas podrían actuar como un método de entrega

alternativo y complementario para dichos factores, modulando su cargamento bajo agentes estresores, tal como sugirió Bai y su grupo de estudio el 2014 (Bai *et al*., 2014).

Por otra parte, también existe evidencia de presencia de estas proteínas efectoras en vesículas de *Salmonella* Typhimurium, donde además se observó que dichos efectores inducen la modificación de los filamentos de actina de las células hospedero inclusive ante la ausencia de interacción celular directa (Kim *et al*, 2018), indicando que estos factores pueden ejercer su función sin necesidad de ser secretados por el TTSS-1 directamente en el interior de la célula hospedero, cimentando la idea de que las vesículas sirven como un medio de entrega alternativo o incluso complementario, mejorando las opciones y la eficiencia de *Salmonella* ante la invasión de células hospedero. Implicando que, ante condiciones de invasión, la presencia de esta proteína efectora es mayor, tanto en el sobrenadante celular, como en las vesículas de *Salmonella* Typhi, formando parte de su cargamento, y según la bibliografía pudiendo ejercer su función en la célula hospedero.

Estos resultados nos permiten además postular las vesículas como método de entrega alternativo de SopB. Tal y como fue descrito durante los primeros párrafos de este estudio, las OMVs cumplen un amplio espectro de funciones, tomando distintos roles dependiendo de factores, cómo la especie, y ahora con mayor énfasis, las condiciones de cultivo en donde sean producidas (Schwechheimer y Kuehn, 2015), mejorando las opciones de supervivencia de las bacterias. Por otra parte, cómo método de entrega, las OMVs presentan grandes ventajas en comparación a otros métodos de secreción, permitiendo la protección de su cargamento frente a enzimas degradativas o anticuerpos, debido a su estructura (Horstman y Kuehn, 2000), facilitando la entrega de material a grandes distancias sin necesidad de contacto entre la bacteria y la célula blanco**,** tal como lo presentó Kim y su grupo de estudio (), exhibiendo que los efectores relacionados al TTSS-1 generan arreglos en los filamentos de actina al ser entregados mediante OMVs, además de la capacidad que presentan las OMVs de poder ser captadas e internalizadas por las células eucariontes (Jefferies y Khalid, 2020; O'Donoghue y Krachler, 2016), capacidad que en *Salmonella* Typhi se ve aumentada por condiciones

ambientales, tal como fue discutido anteriormente, lo que puede mejorar significativamente la infectividad de la bacteria.

Esto nos permite indicar que ante condiciones relacionadas con el ciclo infectivo de *Salmonella*, específicamente la etapa intestinal, tanto la presencia de proteínas efectoras (SopB) en el sobrenadante, el cargamento de estas proteínas efectoras y la internalización de las OMVs se ve considerablemente aumentada, funcionando de manera complementaria o incluso independiente a otros sistemas de secreción, implicando una adaptabilidad del organismo ante dichas condiciones permitiendo inclusive entregar su cargamento ante grandes distancias.

En cuanto a proyecciones, este estudio sienta las bases para la exploración de SopB, su comportamiento ante condiciones de invasión, su presencia en vesículas y su rol como proteína efectora, dichas bases deben ser profundizadas con posteriores ensayos de invasión, y estudios cuantitativos que nos permitan comprender en que cantidad y cómo las vesículas pueden internalizar SopB en condiciones de invasión y si el marcaje de nuestra proteína disminuye su efectividad y función.

9. CONCLUSIONES

Este estudio nos presenta una aproximación al comportamiento de la proteína SopB en condiciones de infección, dando luces de las variaciones que esta proteína puede presentar cuando se encuentra expuesta a un ambiente hostil.

En un principio, se logró realizar la construcción genética que permitió el posterior trabajo en laboratorio, utilizando mecanismos de biología molecular fuimos capaces de insertar el epítopo 3×FLAG dentro del genoma de *S.* Typhi en el marco de lectura postulado previamente, la cepa fue posteriormente confirmada mediante métodos convencionales de biología molecular (PCR), métodos de microbiología básica (*Screening* de colonias) y métodos de secuenciación en laboratorio. Dando cumplimiento al objetivo específico 1.1, la nueva cepa, denominada SopB::3×FLAG, fue almacenada en el cepario del laboratorio de Genética y Patogénesis Bacteriana, disponible para realizar posteriores estudios que involucren SopB.

Por otra parte, se logró confirmar la hipótesis propuesta dado que según los resultados obtenidos, existen variaciones en la expresión de la proteína SopB al ser cultivada en un ambiente que simula las condiciones intestinales a las que la bacteria se ve expuesta durante la invasión. Principalmente las diferencias se detectaron en el ambiente extracelular (muestras de sobrenadante celular) de las células cultivadas en condiciones intestinales, presentando una expresión mayor que las muestras extracelulares de bacterias cultivadas en condiciones estándar de laboratorio, además. Por otra parte, las muestras intracelulares (Pellet celular) no mostraron variaciones visualmente significativas. Es importante mencionar, que trabajos posteriores a la realización de esta Tesis mostraron de manera preliminar que además existe una diferencia en la presencia de SopB en las vesículas de *Salmonella* Typhi, siendo visualmente mayor en aquellas muestras extraídas desde condiciones de cultivo intestinales (utilizando las mismas condiciones que en este estudio). Estos resultados indicarían que la bacteria al verse expuesta a un ambiente estresor, secreta en mayor medida esta proteína con la finalidad de cumplir su función en las células hospederos, además la presencia de la proteína marcada en las vesículas de la bacteria nos da indicios de un método

alternativo o incluso complementario de entrega de estos efectores, método que ya había sido explorado por algunos grupos de estudio en otros serotipos. Pese a las incertidumbres asociadas a este trabajo, se logró dar cumplimiento a los objetivos específicos planteados para este estudio, obteniendo resultados prometedores, los cuales nos presentan una línea de investigación auspiciosa para nuestro grupo de estudio, la cual radica en comprender el funcionamiento de SopB, de que manera esta proteína es seleccionada y cargada en las vesículas y además, de cómo es internalizada en las células hospedero mediante este método de entrega.

10. BIBLIOGRAFÍA

Amavisit, P., Lightfoot, D., Browning, G. F., *y* Markham, P. F. (2003). Variation between pathogenic serovars within *Salmonella* pathogenicity islands. *Journal of Bacteriology*, *185*(12), 3624–3635. https://doi.org/10.1128/JB.185.12.3624-3635.2003

Bai, J., Kim, S. I., Ryu, S., *y* Yoon, H. (2014). Identification and characterization of outer membrane vesicle-associated proteins in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and Immunity*, *82*(10), 4001–4010. https://doi.org/10.1128/IAI.01416-13

Bauman, S. J., y Kuehn, M. J. (2006). Purification of outer membrane vesicles from Pseudomonas aeruginosa and their activation of an IL-8 response. *Microbes and infection*, *8*(9-10), 2400-2408.

Bakowski, M. A., Braun, V., Lam, G. Y., Yeung, T., Heo, W. Do, Meyer, T., Finlay, B. B., Grinstein, S., *y* Brumell, J. H. (2010). The phosphoinositide phosphatase SopB manipulates membrane surface charge and trafficking of the *Salmonella*-containing vacuole. *Cell Host and Microbe*, *7*(6), 453–462. https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.011

Beveridge, T. J. (1999). Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles. *Journal of Bacteriology*, *181*(16), 4725 LP – 4733. https://doi.org/10.1128/JB.181.16.4725-4733.1999

Bonnington, K. E., *y* Kuehn, M. J. (2016). *Outer Membrane Vesicle Production Facilitates LPS Remodeling and Transitions*. https://doi.org/10.1128/mBio.01532-16.Invited

Brizzard, B. (2008). Epitope tagging. *BioTechniques*, *44*(5), 693–695. https://doi.org/10.2144/000112841

Chatterjee, S. N., *y* Das, J. (1967). Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by Vibrio cholerae. *Journal of General Microbiology*, *49*(1), 1–11. https://doi.org/10.1099/00221287-49-1-1

Cherepanov, P. P., *y* Wackernagel, W. (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc R and Km R cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant (Antibiotic-resistance markers; endA; Flp recombinase; FRT site; gene replacement mutant; site-specific recombination; transposon). In *Gene* (Vol. 158).

Coburn, B., Grassl, G. A., *y* Finlay, B. B. (2007). *Salmonella*, the host and

disease: A brief review. *Immunology and Cell Biology*, *85*(2), 112–118. https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100007

Cornelis, G. R. (2000). *a Ssembly and F Unction of T Ype Iii*.

Crump, J. A., Ram, P. K., Gupta, S. K., Miller, M. A., *y* Mintz, E. D. (2008). Part I. Analysis of data gaps pertaining to *Salmonella enterica* serotype Typhi infections in low and medium human development index countries, 1984-2005. *Epidemiology and Infection*, *136*(4), 436–448. https://doi.org/10.1017/S0950268807009338

Daigle, F. (2008). Typhi genes expressed during infection or involved in pathogenesis. *Journal of Infection in Developing Countries*, *2*(6), 431–437. https://doi.org/10.3855/jidc.157

Datsenko, K. A., *y* Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(12), 6640–6645. https://doi.org/10.1073/pnas.120163297

Elhenawy, W., Bording-Jorgensen, M., Valguarnera, E., Haurat, M. F., Wine, E., *y* Feldman, M. F. (2016). LPS remodeling triggers formation of outer membrane vesicles in *Salmonella*. *MBio*, *7*(4), 1–12. https://doi.org/10.1128/mBio.00940-16

Faucher, S. P., Porwollik, S., Dozois, C. M., McClelland, M., *y* Daigle, F. (2006). Transcriptome of *Salmonella enterica* serovar Typhi within macrophages revealed through the selective capture of transcribed sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(6), 1906–1911. https://doi.org/10.1073/pnas.0509183103

Feng, Y., Wente, S. R., *y* Majerus, P. W. (2001). Overexpression of the inositol phosphatase SopB in human 293 cells stimulates cellular chloride influx and inhibits nuclear mRNA export. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(3), 875–879. https://doi.org/10.1073/pnas.98.3.875

Fica, A., Acosta, G., Dabanch, J., Perret, C., Torres, M., López, J., Jofré, L., *y* Weitzel, T. (2012). Brotes de salmonelosis y el tamaño y rol del Estado en Chile. *Revista Chilena de Infectologia*, *29*(2), 207–214. https://doi.org/10.4067/S0716-10182012000200014

Fica Cubillos, A., Alexandre S., M., Prat M., S., Fernández R., A., Fernández O., J., *y* Heitmann G., I. (2001). Cambios epidemiológicos de las salmonelosis en Chile. Desde *Salmonella* Typhi a *Salmonella enteritidis*. *Revista Chilena de Infectologia*, *18*(2), 85–93. https://doi.org/10.4067/s0716-10182001000200002

Foley, S. L., Lynne, A. M., *y* Nayak, R. (2008). *Salmonella* challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *Journal of Animal Science*, *86*(14 Suppl). https://doi.org/10.2527/jas.2007-0464

Francis, C. L., Ryan, T. A., Jones, B. D., Smith, S. J., *y* Falkow, S. (1993). Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature*, *364*(6438), 639–642. https://doi.org/10.1038/364639a0

Fuentes, J. A., Villagra, N., Castillo-Ruiz, M., *y* Mora, G. C. (2008). The *Salmonella* Typhi hlyE gene plays a role in invasion of cultured epithelial cells and its functional transfer to S. Typhimurium promotes deep organ infection in mice. *Research in Microbiology*, *159*(4), 279–287. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.02.006

Galán, J. E. (1999). Interaction of *Salmonella* with host cells through the centisome 63 type III secretion system. *Current Opinion in Microbiology*, *2*(1), 46–50. https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80008-3

Galán, J. E., *y* Bliska, J. B. (1996). Cross-talk between bacterial pathogens and their host cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *12*, 221–255. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.12.1.221

Galán, J. E., *y* Collmer, A. (1999). Type III secretion machines: Bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, *284*(5418), 1322–1328. https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1322

Galán, J. E., *y* Curtiss, R. (1991). Distribution of the invA, -B, -C, and -D genes of *Salmonella* Typhimurium among other *Salmonella* serovars: invA mutants of *Salmonella* Typhi are deficient for entry into mammalian cells. *Infection and Immunity*, *59*(9), 2901–2908. https://doi.org/10.1128/iai.59.9.2901-2908.1991

Giacomodonato, M. N., Uzzau, S., Bacciu, D., Caccuri, R., Sarnacki, S. H., Rubino, S., *y* Cerquetti, M. C. (2007). SipA, SopA, SopB, SopD, and

SopE2 effector proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium are synthesized at late stages of infection in mice. *Microbiology*, *153*(4), 1221–1228. https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/002758-0

Gobierno de Chile, M. de S. (2018). *Informe epidemiológico anual. FIEBRE TIFOIDEA Y PARATIFOIDEA 2014 - 2018*. http://epi.minsal.cl/fiebre-tifoidea-paratifoidea-materiales-relacionados/

Gong, H., Vu, G. P., Bai, Y., Yang, E., Liu, F., *y* Lu, S. (2010). Differential expression of *Salmonella* type III secretion system factors InvJ, PrgJ, SipC, SipD, SopA and SopB in cultures and in mice. *Microbiology*, *156*(1), 116–127. https://doi.org/10.1099/mic.0.032318-0

Gonzalez-Escobedo, G., Marshall, J. M., *y* Gunn, J. S. (2011). Chronic and acute infection of the gall bladder by *Salmonella* Typhi: Understanding the carrier state. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(1), 9–14. https://doi.org/10.1038/nrmicro2490

Hapfelmeier, S., Ehrbar, K., Stecher, B., Barthel, M., Kremer, M., *y* Hardt, W. D. (2004). Role of the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Effector Proteins SipA, SopB, SopE, and SopE2 in *Salmonella enterica* Subspecies 1 Serovar Typhimurium Colitis in Streptomycin-Pretreated Mice. *Infection and Immunity*, *72*(2), 795–809. https://doi.org/10.1128/IAI.72.2.795-809.2004

Hong, K. H., *y* Miller, V. L. (1998). Identification of a novel *Salmonella* invasion locus homologous to *Shigella* ipgDE. *Journal of Bacteriology*, *180*(7), 1793–1802. https://doi.org/10.1128/jb.180.7.1793-1802.1998

Hornick, R. B., Greisman, S. E., Woodward, T. E., Dupont, H. L., Hawkins, A. T., *y* Snyder, M. J. (1970). Typhoid Fever: Pathogenesis and Immunologic Control. *New England Journal of Medicine*, *283*(14), 739–746. https://doi.org/10.1056/NEJM197010012831406

Horstman, A. L., *y* Kuehn, M. J. (2000). Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(17), 12489–12496. https://doi.org/10.1074/jbc.275.17.12489

Huang, X., Xu, H., Sun, X., Ohkusu, K., Kawamura, Y., *y* Ezaki, T. (2007). Genome-wide scan of the gene expression kinetics of *Salmonella enterica* serovar Typhi during hyperosmotic stress. *International Journal of*

Molecular Sciences, *8*(2), 116–135. https://doi.org/10.3390/i8020116

Hueck, C. J. (1998). Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *62*(2), 379–433. https://doi.org/10.1128/mmbr.62.2.379-433.1998

Instituto de Salud Publica. Ministerio De Salud. Gobierno de Chile. (2017). *Salmonella* spp. 2012-2016. *Boletín de Vigilancia de Laboratorio*, *6*(9), 1–16. http://www.ispch.cl/sites/default/files/Boletin*Salmonella*-23012017A.pdf

Jarvik, J. W., *y* Telmer, C. A. (1998). EPITOPE TAGGING. *Annual Review of Genetics*, *32*(1), 601–618. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.32.1.601

Jefferies, D., *y* Khalid, S. (2020). To infect or not to infect: molecular determinants of bacterial outer membrane vesicle internalization by host membranes. *Journal of Molecular Biology*, *432*(4), 1251–1264. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.01.008

Jofré, M. R., Rodríguez, L. M., Villagra, N. A., Hidalgo, A. A., Mora, G. C., *y* Fuentes, J. A. (2014). RpoS integrates CRP, Fis, and PhoP signaling pathways to control *Salmonella* Typhi hlyE expression. *BMC Microbiology*, *14*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-139

Johnson, R., Ravenhall, M., Pickard, D., Dougan, G., Byrne, A., *y* Frankel, G. (2018). Comparison of *Salmonella enterica* serovars Typhi and Typhimurium reveals typhoidal serovar-specific responses to bile. *Infection and Immunity*, *86*(3). https://doi.org/10.1128/IAI.00490-17

Jurado Jiménez, R., Arenas Muñoz, C., Doblas Delgado, A., Rivero, A., *y* Torre-Cisneros, J. (2010). Fiebre tifoidea y otras infecciones por *Salmonella*s. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, *10*(52), 3497–3501. https://doi.org/10.1016/s0304-5412(10)70069-x

Kadurugamuwa, J. L., *y* Beveridge, T. J. (1995). Virulence factors are released from *Pseudomona aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: A novel mechanism of enzyme secretion. *Journal of Bacteriology*, *177*(14), 3998–4008. https://doi.org/10.1128/jb.177.14.3998-4008.1995

Karkey, A., Thwaites, G. E., *y* Baker, S. (2018). The evolution of antimicrobial

resistance in *Salmonella* Typhi. *Current Opinion in Gastroenterology*, *34*(1), 25–30. https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000406

Kaur, J., y Jain, S. K. (2012). Role of antigens and virulence factors of Salmonella enterica serovar Typhi in its pathogenesis. Microbiological research, 167(4), 199-210.

Khanam, F., Darton, T. C., Meiring, J. E., Sarker, P. K., Biswas, P. K., Bhuiyan, M. A. I., Rajib, N. H., Tonks, S., Pollard, A. J., Clemens, J. D., *y* Qadri, F. (2021). *Salmonella* Typhi Stool Shedding by Patients with Enteric Fever and Asymptomatic Chronic Carriers in an Endemic Urban Setting. *Journal of Infectious Diseases*, *224*(Suppl 7), S759–S763. https://doi.org/10.1093/infdis/jiab476

Kibbe, W. A. (2007). OligoCalc: An online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research*, *35*(SUPPL.2), 43–46. https://doi.org/10.1093/nar/gkm234

Kim, S. H., Kim, K. S., Lee, S. R., Kim, E., Kim, M. S., Lee, E. Y., Gho, Y. S., Kim, J. W., Bishop, R. E., *y* Chang, K. T. (2009). Structural modifications of outer membrane vesicles to refine them as vaccine delivery vehicles. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1788*(10), 2150–2159. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.08.001

Kim, S. I., Kim, S., Kim, E., Hwang, S. Y., *y* Yoon, H. (2018). Secretion of *Salmonella* pathogenicity island 1-encoded type III secretion system effectors by outer membrane vesicles in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Frontiers in Microbiology*, *9*(NOV), 1–13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02810

Kohbata, S., y Yokoyama, H. (1986). *Cytopathogenic Effect of Salmonella* Typhi *GIFU 10007 on M cells of Murine Ileal Peyer ' s Patches in Ligated Ileal Loops : An Ultrastructural Study Since the end of the 19th century , the lower part of the human small intestine , particularly Peyer ' s pa*. *30*(12), 1225–1237.

Kröger, C., Colgan, A., Srikumar, S., Händler, K., Sivasankaran, S. K., Hammarlöf, D. L., Canals, R., Grissom, J. E., Conway, T., Hokamp, K., *y* Hinton, J. C. D. (2013). An infection-relevant transcriptomic compendium for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Cell Host and Microbe*,

14(6), 683–695. https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.11.010

Kulp, A., *y* Kuehn, M. J. (2010). Functions and Biogenesis of OMVs. *Annual Review of Microbiology*, *64*, 163–184. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073413.Biological

Leclerc, G. J., Tartera, C., *y* Metcalf, E. S. (1998). Environmental regulation of *Salmonella* Typhi invasion-defective mutants. *Infection and Immunity*, *66*(2), 682–691. https://doi.org/10.1128/iai.66.2.682-691.1998

Levine, M. M., Black, R. E., *y* Lanata, C. (1982). Precise estimation of the numbers of chronic carriers of *Salmonella* Typhi in santiago, chile, an endemic area. *Journal of Infectious Diseases*, *146*(6), 724–726. https://doi.org/10.1093/infdis/146.6.724

Lobbestael, E., Reumers, V., Ibrahimi, A., Paesen, K., Thiry, I., Gijsbers, R., Van den Haute, C., Debyser, Z., Baekelandt, V., *y* Taymans, J. M. (2010). Immunohistochemical detection of transgene expression in the brain using small epitope tags. *BMC Biotechnology*, *10*. https://doi.org/10.1186/1472-6750-10-16

Lostroh, C. P., *y* Lee, C. A. (2001). The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microbes and Infection*, *3*(14–15), 1281–1291. https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01488-5

Manning, A. J., *y* Kuehn, M. J. (2011). Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiology*, *11*(December). https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-258

Marcus, S. L., Brumell, J. H., Pfeifer, C. G., *y* Finlay, B. B. (2000). *Salmonella* pathogenicity islands: Big virulence in small packages. *Microbes and Infection*, *2*(2), 145–156. https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00273-2

Mashburn-Warren, L. M., *y* Whiteley, M. (2006). Special delivery: Vesicle trafficking in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, *61*(4), 839–846. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05272.x

McBroom, A. J., *y* Kuehn, M. J. (2007). Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Molecular Microbiology*, *63*(2), 545–558. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05522.x

Nevermann, J., Silva, A., Otero, C., Oyarzún, D. P., Barrera, B., Gil, F., Calderón, I. L., *y* Fuentes, J. A. (2019). Identification of genes involved in

biogenesis of Outer Membrane Vesicles (OMVs) in *Salmonella enterica* Serovar Typhi. *Frontiers in Microbiology*, *10*(FEB). https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00104

Norris, F. A., Wilson, M. P., Wallis, T. S., Galyov, E. E., *y* Majerus, P. W. (1998). SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(24), 14057–14059. https://doi.org/10.1073/pnas.95.24.14057

O'Donoghue, E. J., *y* Krachler, A. M. (2016). Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells. *Cellular Microbiology*, *18*(11), 1508–1517. https://doi.org/10.1111/cmi.12655

Pathirana, R. D., *y* Kaparakis-Liaskos, M. (2016). Bacterial membrane vesicles: Biogenesis, immune regulation and pathogenesis. *Cellular Microbiology*, *18*(11), 1518–1524. https://doi.org/10.1111/cmi.12658

Pfeifer, C. G., Marcus, S. L., Steele-Mortimer, O., Knodler, L. A., *y* Finlay, B. B. (1999). *Salmonella* Typhimurium virulence genes are induced upon bacterial invasion into phagocytic and nonphagocytic cells. *Infection and Immunity*, *67*(11), 5690–5698. https://doi.org/10.1128/iai.67.11.5690-5698.1999

Raffatellu, M., Chessa, D., Wilson, R. P., Tükel, Ç., Akçelik, M., *y* Bäumler, A. J. (2006). Capsule-mediated immune evasion: A new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infection and Immunity*, *74*(1), 19–27. https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.19-27.2006

Raffatellu, M., Wilson, R. P., Winter, S. E., *y* Bäumler, A. J. (2008). Clinical pathogenesis of typhoid fever. *Journal of Infection in Developing Countries*, *2*(4), 260–266. https://doi.org/10.3855/jidc.219

Ray, B., *y* Bhunia, A. (2013). Fundamental food microbiology: Fifth edition. In *Fundamental Food Microbiology: Fifth Edition*.

Ricci, V., Chiozzi, V., Necchi, V., Oldani, A., Romano, M., Solcia, E., *y* Ventura, U. (2005). Free-soluble and outer membrane vesicle-associated VacA from *Helicobacter pylori*: Two forms of release, a different activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *337*(1), 173–178. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.09.035

Rowe, B., Ward, L. R., *y* Threlfall, E. J. (1997). *Salmonella* Typhi : A Worldwide

Epidemic. *Clinical Infectious Diseases*, *24*(S1), S106–S109.

Schwechheimer, C., *y* Kuehn, M. J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: Biogenesis and functions. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(10), 605–619. https://doi.org/10.1038/nrmicro3525

Srikanth, C. V., Mercado-Lubo, R., Hallstrom, K., *y* McCormick, B. A. (2011). *Salmonella* effector proteins and host-cell responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *68*(22), 3687–3697. https://doi.org/10.1007/s00018-011-0841-0

Streckel, W., Wolff, A. C., Prager, R., Tietze, E., *y* Tschäpe, H. (2004). Expression profiles of effector proteins SopB, SopD1, SopE1, and AvrA differ with systemic, enteric, and epidemic strains of *Salmonella enterica*. *Molecular Nutrition and Food Research*, *48*(7), 496–503. https://doi.org/10.1002/mnfr.200400035

Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S., *y* Bossi, L. (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(26), 15264–15269. https://doi.org/10.1073/pnas.261348198

Valenzuela, C., Ugalde, J. A., Mora, G. C., Álvarez, S., Contreras, I., *y* Santiviago, C. A. (2014). Draft Genome Sequence of *y*lt;span class=*y*quot;named-content genus-species*y*quot; id=*y*quot;named-content-1*y*quot;*y*gt;*Salmonella entericay*lt;/span*y*gt; Serovar Typhi Strain STH2370. *Genome Announcements*, *2*(1), e00104-14. https://doi.org/10.1128/genomeA.00104-14

Vasilyeva, N. V., Tsfasman, I. M., Suzina, N. E., Stepnaya, O. A., *y* Kulaev, I. S. (2008). Secretion of bacteriolytic endopeptidase L5 of Lysobacter sp. XL1 into the medium by means of outer membrane vesicles. *FEBS Journal*, *275*(15), 3827–3835. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06530.x

Yeh, Y. C., Comolli, L. R., Downing, K. H., Shapiro, L., *y* McAdams, H. H. (2010). The Caulobacter Tol-Pal complex is essential for outer membrane integrity and the positioning of a polar localization factor. *Journal of Bacteriology*, *192*(19), 4847–4858. https://doi.org/10.1128/JB.00607-10

Zhou, D., Chen, L. M., Hernandez, L., Shears, S. B., *y* Galán, J. E. (2001). A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other

bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Molecular Microbiology*, *39*(2), 248–260. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02230.x

Zhou, D., *y* Galán, J. (2001). *Salmonella* entry into host cells: The work in concert of type III secreted effector proteins. *Microbes and Infection*, *3*(14–15), 1293–1298. https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01489-7

Zilkenat, S., Franz-Wachtel, M., Stierhof, Y. D., Galán, J. E., Macek, B., *y* Wagner, S. (2016). Determination of the stoichiometry of the complete bacterial type III secretion needle complex using a combined quantitative proteomic approach. *Molecular and Cellular Proteomics*, *15*(5), 1598–1609. https://doi.org/10.1074/mcp.M115.056598