

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**



**IDENTIFICACIÓN DE UN TRANSPORTADOR ALTERNATIVO A LA LACTOSA PERMEASA EN CEPAS DE *Shigella sonnei* FERMENTADORAS RÁPIDAS DE LACTOSA AISLADAS EN DOS BROTES DE DIARREA EN ANTOFAGASTA Y LA REGIÓN METROPOLITANA 2008-2009**

**LINA MARÍA RIVAS JIMÉNEZ**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y MÉDICAS MENCIÓN MICROBIOLOGÍA**

**Directores de Tesis: Prof. MSc. María Teresa Ulloa Flores y Prof. Dr. Germán Hermosilla Díaz**

**2015**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER**

**Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la tesis de Magíster presentada por la candidata**

**LINA MARÍA RIVAS JIMÉNEZ**

**Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Ciencias Biológicas y Médicas Mención Microbiología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 13 de Abril de 2015.**

**Directores de Tesis: Prof. MSc. María Teresa Ulloa Flores y Prof. Dr. Germán  
Hermosilla Díaz  
Programa de Microbiología y Micología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de  
Chile**

**COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS**

---

**Prof. Dr. Jonás Chnaiderman**

---

**Prof. Dr. José Manuel Pérez**

---

**Prof. Dr. Eduardo Álvarez**

---

**Prof. Dr. Juan Carlos Salazar  
Presidente Comisión**

A mi familia, la más grande de mis bendiciones.  
Los amo y les agradezco profundamente por el apoyo incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mis más sinceros agradecimientos a la profesora María Teresa Ulloa Flores, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y formar parte de la familia que ha construido en él. Así mismo, le agradezco por el cariño, la confianza, las enseñanzas y recomendaciones hechas en todo momento.

Al profesor Germán Hermosilla Díaz porque nunca me dio una respuesta corta, siempre tuvo la mejor disposición para ofrecerme sus valiosos conocimientos y experiencia profesional, por animarme y enseñarme gran parte de lo que sé sobre el trabajo de laboratorio.

A la comisión evaluadora integrada por los Doctores Dr. Jonás Chnaiderman, José Manuel Pérez Eduardo Álvarez y Juan Carlos Salazar por los comentarios y sugerencias que ayudaron al desarrollo de esta tesis.

A mis compañeras y amigas de laboratorio: Margareta Mühlhauser, Bárbara Ávila, Gissela Castillo, Marcela Molina, Victoria Moreno y Luisa Núñez por su amistad, su ayuda invaluable y el apoyo moral que siempre me han brindado.

Al profesor Ricardo Armisen y a los integrantes del laboratorio de Patología Molecular del Cáncer, especialmente a Eduardo Sagredo, Edgardo Salamanca, Rodrigo Andaur, Daniela Diez, Jessica Toro y Fernanda Morales por su amabilidad, su ayuda y las facilidades que me brindaron.

A las familias Benavides-Sarasty, Villa-Mesa y Villa-Hincapié por los gratos momentos compartidos fuera de la academia. En especial a Doña Diana por su cariño.

A mi mamá y papá, por su amor, cuidado, sacrificio, ejemplo y por hacer posible que todos mis sueños sean una realidad. A Luis por ser un ejemplo en valores que me hacen falta, a Pablo por enseñarme a crecer, a la hermana que nunca tuve por su ánimo constante, a mi tía favorita por su gran cariño, a Miguel y Nancy por su aprecio, a mi tías y tíos, primas y primos, abuelas, amigas y amigos porque, a pesar de la distancia, hacen que me sienta siempre acompañada.

Tesis financiada por el Proyecto Fondecyt 1130394.

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
3.1 Descripción general del género <i>Shigella</i> .....	5
3.2 Cuadro clínico y patogenia.....	5
3.3 Epidemiología de la infección por <i>Shigella</i> spp. ....	6
3.4 Fermentación de la lactosa en bacterias.....	7
3.5 Fermentación de la lactosa en <i>Shigella</i> spp. ....	8
3.6 Cepas de <i>S. sonnei</i> fermentadoras rápidas de lactosa.....	9
3.7 Transportadores galactosídicos en <i>S. sonnei</i> .....	10
3.8 Sistema transportador de maltosa.....	11
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>13</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
5.1 Objetivo general.....	13
5.2 Objetivos específicos.....	13
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
6.1 Cepas.....	14
6.1.1 Procedencia.....	14
6.1.2 Tipificación de las cepas.....	14

6.2 Caracterización de la fermentación de la lactosa en las cepas de <i>S. sonnei</i> aisladas de ambos brotes.....	15
6.2.1 Evaluación del tiempo de fermentación de la lactosa.....	15
6.2.2 Estabilidad fenotípica de la fermentación rápida de lactosa en placas de agar Mac Conkey.....	15
6.2.3 Curva de utilización de la lactosa: curva de crecimiento y medición de pH.....	16
6.2.4 Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa.....	16
6.2.4.1 Cualitativa.....	16
6.2.4.2 Cuantitativa.....	16
6.3 Análisis de la integridad del gen <i>lacY</i> en cepas de <i>S. sonnei</i> fermentadoras rápidas de lactosa aisladas del brote de Antofagasta y la Región Metropolitana.....	17
6.3.1 Extracción de DNA.....	18
6.3.2 Partidores.....	18
6.3.3 Reacción de PCR.....	19
6.3.4 Análisis de los productos de PCR.....	19
6.3.5 Purificación de los productos de PCR.....	20
6.3.6 Secuenciación de los productos de PCR.....	20
6.3.7 Análisis de las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas.....	20
6.4 Determinación de la participación de los sistemas transportadores de maltosa y arabinosa en la incorporación de lactosa, mediante análisis de secuencia de los genes de ambos sistemas, análisis de los niveles de expresión de <i>lamB</i> y <i>malF</i> y expresión heteróloga de estos genes en células de <i>S. sonnei</i> ATCC 25931.....	20
6.4.1 Análisis de las secuencias de los genes del sistema transportador de maltosa y arabinosa en una cepa de <i>S. sonnei</i> fermentadora rápida de lactosa representativa de cada brote.....	20
6.4.2 Análisis de los niveles de expresión de <i>lamB</i> y <i>malF</i> de una cepa de <i>S. sonnei</i> fermentadora rápida de lactosa representativa de cada brote mediante qPCR.....	21
6.4.2.1 Extracción de RNA.....	21

6.4.2.2 Síntesis de cDNA.....	22
6.4.2.3 qPCR.....	22
6.4.2.4 Análisis estadístico.....	22
6.4.3 Expresión heteróloga de los genes <i>lamB</i> y <i>malF</i> de una cepa de <i>S. sonnei</i> fermentadora rápida de lactosa representativa de cada brote en células de <i>S. sonnei</i> ATCC 25931.....	23
6.4.3.1 Extracción de ácidos nucleicos.....	23
6.4.3.2 Amplificación de los genes <i>lamB</i> y <i>malF</i> de cepas de <i>S. sonnei</i> fermentadoras rápidas de lactosa.....	23
6.4.3.3 Digestión del DNA con enzimas de restricción.....	24
6.4.3.4 Reacción de ligado.....	24
6.4.3.5 Transformación de <i>E. coli</i> DH5α y <i>S. sonnei</i> ATCC 25931.....	25
6.4.3.6 Selección de los vectores recombinantes <i>plamB</i> <sup>37A</sup> , <i>plamB</i> <sup>8273RM</sup> , <i>pmalF</i> <sup>37A</sup> y <i>pmalF</i> <sup>8273RM</sup> .....	25
6.4.3.7 Inducción de la expresión de los genes <i>lamB</i> y <i>malF</i> de una cepa de <i>S. sonnei</i> fermentadora rápida de lactosa representativa de cada brote en cepas de <i>S. sonnei</i> ATCC 25931.....	26
6.4.3.7.1 Determinación de la expresión de los genes <i>lamB</i> <sup>37A</sup> y <i>malF</i> <sup>37A</sup> de una cepa de <i>S. sonnei</i> fermentadora rápida de la lactosa representativa de cada brote en una cepa de <i>S. sonnei</i> ATCC 25931 mediante qPCR.....	27
6.4.3.7.1.1 Extracción de RNA.....	27
6.4.3.7.1.2 Cuantificación relativa de la expresión génica.....	28
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
7.1 Tipificación de las cepas.....	29
7.2 Caracterización de la fermentación de la lactosa en las cepas de <i>S. sonnei</i> aisladas de ambos brotes.....	29
7.2.1 Fermentación de la lactosa en placas de agar Mac Conkey.....	29
7.2.2 Estabilidad fenotípica de la fermentación rápida de la lactosa.....	30



7.2.3 Utilización de la lactosa en medio líquido. ....	30
7.2.4 Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa.....	32
7.2.4.1 Cualitativa.....	32
7.2.4.2 Cuantitativa.....	33
7.3 Análisis de la integridad del gen <i>lacY</i> en cepas de <i>S. sonnei</i> fermentadoras rápidas de lactosa aisladas del brote de Antofagasta y la Región Metropolitana.....	34
7.4 Determinación de la participación de los sistemas transportadores de maltosa y arabinosa en la incorporación de lactosa mediante análisis de secuencia de los genes de ambos sistemas, análisis de los niveles de expresión de <i>lamB</i> y <i>malF</i> y expresión heteróloga de estos genes la cepa control de <i>S. sonnei</i> ATCC 25931.....	36
7.4.1 Análisis de secuencia de los genes del sistema transportador de maltosa y arabinosa de las cepas 37A y 8273RM.....	36
7.4.1.1 Sistema transportador de maltosa.....	36
7.4.1.2 Sistema transportador de arabinosa.....	38
7.4.2 Análisis de los niveles de expresión de <i>lamB</i> y <i>malF</i> en una cepa de <i>S. sonnei</i> fermentadora rápida de lactosa representativa de cada brote mediante qPCR.....	39
7.4.3 Expresión heteróloga de los genes <i>lamB</i> <sup>37A</sup> , <i>lamB</i> <sup>8273RM</sup> , <i>malF</i> <sup>37A</sup> y <i>malF</i> <sup>8273RM</sup> en la cepa control de <i>S. sonnei</i> ATCC 25931.....	40
7.4.3.1 Inducción de la expresión de los genes <i>lamB</i> y <i>malF</i> de una cepa de <i>S. sonnei</i> fermentadora rápida de lactosa representativa de cada brote en cepas de <i>S. sonnei</i> ATCC 25931.....	42
7.4.3.2 Determinación de la expresión de los genes <i>lamB</i> <sup>37A</sup> y <i>malF</i> <sup>37A</sup> de una cepa de <i>S. sonnei</i> fermentadora rápida de lactosa representativa de cada brote en cepas de <i>S. sonnei</i> ATCC 25931 mediante qPCR.....	43
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>44</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>55</b>

<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>57</b>
------------------------------	-----------

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Componentes del sistema transportador de maltosa en <i>E. coli</i> .....	12
<b>Figura 2.</b> Partidores diseñados para el análisis de la integridad del gen <i>lacY</i> .....	19
<b>Figura 3.</b> Curva de crecimiento y variación de pH de cepas de <i>S. sonnei</i> fermentadoras rápidas de lactosa.....	31
<b>Figura 4.</b> Análisis de la integridad del gen <i>lacY</i> en cepas de <i>S. sonnei</i> fermentadoras rápidas de lactosa. ....	35
<b>Figura 5.</b> Productos de PCR para la detección de los genes del sistema transportador de maltosa: <i>malG</i> , <i>malF</i> , <i>malE</i> , <i>malK</i> y <i>lamB</i> .....	37
<b>Figura 6.</b> Productos de PCR para la detección de los genes del sistema transportador de arabinosa: <i>araC</i> , <i>araE</i> , <i>araF</i> , <i>araG</i> y <i>araH</i> .....	38
<b>Figura 7.</b> Análisis de los niveles de expresión de los genes <i>lamB</i> y <i>malF</i> de dos cepas de <i>S. sonnei</i> fermentadoras rápidas de lactosa y una cepa control fermentadora tardía.....	39
<b>Figura 8.</b> PCR de los fragmentos de DNA utilizados en el constructo <i>lamB</i> <sup>37A</sup> y <i>lamB</i> <sup>8273RM</sup> y <i>malF</i> <sup>37A</sup> y <i>malF</i> <sup>8273RM</sup> en pBAD24. ....	40
<b>Figura 9.</b> Análisis de restricción del DNA de las colonias transformantes de DH5α con los vectores recombinantes <i>plamB</i> <sup>37A</sup> , <i>plamB</i> <sup>8273RM</sup> , <i>pmalF</i> <sup>37A</sup> y <i>pmalF</i> <sup>8273RM</sup> .....	41
<b>Figura 10.</b> Análisis de restricción del DNA de las colonias transformantes de <i>S. sonnei</i> ATCC 25931 con los vectores recombinantes <i>plamB</i> <sup>37A</sup> , <i>plamB</i> <sup>8273RM</sup> , <i>pmalF</i> <sup>37A</sup> y <i>pmalF</i> <sup>8273RM</sup> .....	42
<b>Figura 11.</b> Inducción de la expresión de los genes <i>lamB</i> y <i>malF</i> de cepas fermentadoras rápidas de lactosa en <i>S. sonnei</i> ATCC 25931 en placas de agar Mac Conkey con arabinosa al 0,1%.....	43
<b>Figura 12.</b> Expresión relativa de los genes <i>lamB</i> y <i>malF</i> de una cepa fermentadora rápida de lactosa, clonados en el vector pBAD24 y transformado en la cepa <i>S. sonnei</i> ATCC 25931.....	43

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Partidores empleados durante el desarrollo de esta tesis.....	17
<b>Tabla 2.</b> Fermentación de lactosa de cepas de <i>S. sonnei</i> aisladas en dos brotes, Antofagasta y la Región Metropolitana 2008-2009. ....	30
<b>Tabla 3.</b> Actividades enzimáticas de cepas de <i>S. sonnei</i> fermentadoras rápidas de lactosa determinadas mediante el sistema comercial API ZYM®.....	32
<b>Tabla 4.</b> Actividad enzima $\beta$ -galactosidasa de las cepas de <i>S. sonnei</i> fermentadoras rápidas de lactosa. ....	34
<b>Tabla 5.</b> Cambios aminoacídicos de las proteínas codificadas por los genes <i>malG</i> , <i>malF</i> , <i>malE</i> , <i>malK</i> y <i>lamB</i> del sistema transportador de maltosa de las cepas 37A y 8273RM respecto de las cepas Ss046 y <i>S. sonnei</i> ATCC 25931.....	37
<b>Tabla 6.</b> Cambios aminoacídicos de las proteínas codificadas por los genes <i>araC</i> , <i>araE</i> , <i>araF</i> , <i>araG</i> y <i>araH</i> del sistema transportador de arabinosa de las cepas 37A y 8273RM respecto de las cepas Ss046 y <i>S. sonnei</i> ATCC 25931.....	39

## ABREVIATURAS

µg/mL: microgramos por mililitro.

ABC: *ATP Binding Cassette*.

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*.

CAP: proteína activadora de catabolito.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

dNTP: Desoxirribonucleótido trifosfato.

DO<sub>600</sub>: densidad óptica a una longitud de onda de 600 nanómetros.

ECEI: *Escherichia coli* enteroinvasiva.

ERIC: Secuencias consenso repetitivas intergénicas de enterobacterias.

ETAs: Enfermedades transmitidas por Alimentos.

h: hora.

IPTG: isopropil-β-D-thiogalactosido.

IS1: secuencia de inserción tipo 1.

LB: Luria-bertani.

M: molar

MFS: *Major Facilitator Superfamily*.

min: minutos.

mL: mililitro.

MLVA: Análisis de VNTR en locus múltiple.

mm: milímetros.

mM: milimolar.

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*).

ng/µL: nanograma por microlitro.

ng: nanogramo.

Nm: nanómetros.

OHS: *Oligosaccharide: H<sup>+</sup> symporter family*.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ONPG: orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosido.

pb: Pares de bases.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*).

PFGE: Electroforesis de campo pulsado.

pINV: plásmido de virulencia.

RFLP: Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

RNA: Ácido ribonucleico.

rpm: revoluciones por minuto.

rRNA: RNA ribosómico.

SDS: dodecil sulfato sódico.

UFC/mL: unidades formadoras de colonia por mililitro.

UI: unidades internacionales.

Umiller: unidades Miller.

VNTR: Número Variable de Repeticiones en Tándem.

$\Delta\Delta Ct$ : 2-Delta Delta Ct.

$\mu g/ml$ : microgramos por mililitro.

$\mu g$ : microgramos.

$\mu L$ : microlitro.

$\mu M$  : micromolar.

## 1. RESUMEN

Normalmente las cepas de *Shigella sonnei* aisladas de gastroenteritis presentan fenotipo de fermentación lenta de la lactosa (luego de 48 h de incubación), consignándose como cepas lactosa negativas; sin embargo, en una colección de cepas de dos brotes de diarrea: Antofagasta y la Región Metropolitana 2008-2009, en los subcultivos correspondientes, se aislaron cepas que presentaron fermentación rápida de lactosa (24 h). Existe el antecedente que en dos genomas secuenciados de *S. sonnei* (cepas Ss046 y 53G), el gen *lacZ* está intacto, mientras que el gen *lacY*, que codifica la lactosa permeasa, está incompleto y presenta una *ISI*. Por otro lado, en *Escherichia coli* se han descrito mutaciones en los componentes del sistema transportador de maltosa que amplían su rango de sustratos, permitiendo la incorporación de lactosa por esta vía. Considerando estos antecedentes, el objetivo de esta tesis fue identificar si un transportador alternativo a la lactosa permeasa, como el transportador de maltosa, media el ingreso de la lactosa, en cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas de lactosa, aisladas del brote de Antofagasta y la Región Metropolitana 2008-2009. Para ello se caracterizó fenotípicamente la fermentación rápida de la lactosa, evaluando tiempo de fermentación del azúcar, estabilidad del fenotipo, utilización de la lactosa en medio líquido y actividad  $\beta$ -galactosidasa. Por otro lado, se caracterizó molecularmente la integridad del gen *lacY* mediante PCR-secuenciación. Para determinar la participación del sistema transportador de maltosa en la incorporación de lactosa, se realizó un análisis de secuencia de los genes que codifican para componentes de este sistema, se midieron los niveles de expresión de los genes *lamB* y *malF* de una cepa fermentadora rápida representativa de cada brote y ambos genes fueron expresados en forma heteróloga en la cepa control de *S. sonnei* ATCC-25931 (fermentación tardía de lactosa, 48-72 h), mediante el vector de expresión, inducible por arabinosa, pBAD24. La expresión de *lamB* y *malF* se evaluó en placas de agar Mac Conkey suplementadas con arabinosa y por qPCR. De las 108 cepas de *S. sonnei* (17 de Antofagasta y 91 de la Región Metropolitana), 56 (51,8%) fueron fermentadoras rápidas, 24 (22,2%) fermentadoras tardías y 28 (25,9%) fueron no fermentadoras de lactosa. Se seleccionaron 10 cepas fermentadoras rápidas representativas de cada brote, las cuales presentaron un fenotipo de fermentación rápida estable, utilización de la lactosa en caldo Mac Conkey, similar al control de *S. sonnei* ATCC-25931 y actividad  $\beta$ -galactosidasa. En todas las cepas se confirmó la pérdida de la integridad e inserción del elemento *ISI* en el gen *lacY*. El análisis de las secuencias del sistema transportador de maltosa reveló cambios aminoacídicos

menores en las cepas fermentadoras rápidas de lactosa, respecto a dos cepas fermentadoras tardías como control. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de los genes *lamB* y *malF* de las cepas fermentadoras rápidas y la cepa control fermentadora tardía. Las cepas de *S. sonnei* ATCC-25931 transformadas con los genes *lamB* y *malF* no presentaron cambios en el fenotipo de fermentación de la lactosa y el análisis por qPCR reveló un aumento promedio de la expresión de 949 veces del gen *lamB* y 39 veces del gen *malF*, en las cepas inducidas con arabinosa, respecto de las cepas no inducidas. Estos resultados en su conjunto, evidencian que en las cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas, aisladas de los brotes de Antofagasta y la Región Metropolitana 2008-2009, los genes *lamB* y *malF* del sistema transportador de maltosa, no participarían en la internalización de la lactosa, lo cual sugiere que el fenotipo de fermentación rápida en estas cepas involucra otro transportador.



## 2. ABSTRACT

*S. sonnei* strains isolated from gastroenteritis typically present a lactose negative phenotype at 24 hours of incubation. However, rapid lactose fermenting strains were isolated from a strain collection deriving from two outbreaks in Antofagasta and the Metropolitan Region in 2008-2009. Other studies have reported *S. sonnei* genomes (Ss046 and 53G) with an intact *lacZ* gene and an incomplete lactose permease *lacY* gene, with *IS1*. Furthermore, some authors have described that mutations in the maltose transport system of *E. coli* extend its range of substrates allowing the incorporation of lactose by this way. The aim of this thesis was to identify an alternative lactose permease transporter (maltose) in fast lactose fermenting strains of *S. sonnei*, isolated from the outbreak of Antofagasta and Metropolitan Region 2008-2009. Rapid fermenters were phenotypically characterized through the evaluation of their lactose fermentation time, phenotypic stability, use of lactose in liquid medium and  $\beta$ -galactosidase activity. The integrity of the *lacY* gene was characterized by PCR-sequencing. To determine the participation of the maltose transport system in the incorporation of lactose, we analyzed the genomic sequence of the transporter genes, the gene expression of *lamB* and *malF* genes from a fast fermenter strain of each outbreak, and the heterologous expression in the control strain *S. sonnei* ATCC 25931 (lactose fermentation 48-72h) using the arabinose inducible expression vector pBAD24. The expression of *lamB* and *malF* genes was evaluated in Mac Conkey agar plates supplemented with arabinose and qPCR. Of the 108 strains of *S. sonnei* (17 Antofagasta and 91 of Metropolitan Region), 56 (51,8%) were fast fermenters, 24 (22,2%) late fermenters and 28 (25,9%) were non-lactose fermenters. Ten fast fermenting strains were selected from each outbreak based on a stable fast fermentation phenotype, lactose utilization in Mac Conkey broth similar to the control strain *S. sonnei* ATCC 25931, and  $\beta$ -galactosidase activity. In all strains the integrity loss and insertion element *IS1* in the *lacY* gene was confirmed. Sequence analysis of the maltose transport system revealed minor amino acid changes in the fast lactose fermenting strains. No statistically significant differences in the expression levels of *lamB* and *malF* was observed between the fast fermenters and the late fermenter control strain. The *S. sonnei* ATCC-25931 *lamB* and *malF* transformant strains showed the same lactose fermenting phenotype as the non-transformant ones. qPCR analysis revealed an average increase of 948 and 38 times in the expression of *lamB* and *malF*, respectively, in the arabinose-induced strains.

These results suggest that the maltose transport system is not involved in the internalization of lactose in the fast lactose fermenting strains, implying the participation of an alternative transporter.

### **3. INTRODUCCIÓN**

#### **3.1 Descripción general del género *Shigella***

El género *Shigella* forma parte de la familia *Enterobacteriaceae* y está conformado por bacilos Gram negativo, inmóviles no capsulados y no esporulados. En función del antígeno somático y pruebas bioquímicas se reconocen cuatro especies: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei*<sup>1,2</sup>.

La fermentación de la lactosa es una propiedad bioquímica, ampliamente utilizada para diferenciar las enterobacterias. Ésta se utiliza para distinguir las cepas de *Shigella* spp. de las cepas de *Escherichia coli*, debido a que la mayoría de las cepas de *Shigella* spp. no fermentan lactosa, salvo algunas cepas de *S. dysenteriae* serotipo 1 y *S. sonnei* que son fermentadoras tardías (más de 24 horas), por lo que en la práctica clínica, generalmente se observan fenotípicamente lactosa negativa en el momento de su lectura a las 18-24 horas de incubación<sup>3,4</sup>.

#### **3.2 Cuadro clínico y patogenicidad**

La shigelosis es una infección aguda que afecta la porción distal del intestino delgado y el intestino grueso. Los signos y síntomas pueden variar desde molestias abdominales leves hasta dolor abdominal intenso, cólico, diarrea, fiebre, vómito y tenesmo. En los casos típicos, las deposiciones contienen sangre, moco y pus (disentería), como consecuencia de la aparición de úlceras y microabscesos en la mucosa<sup>1,5</sup>.

Los genes implicados en las funciones de virulencia están codificados en su cromosoma y en el plásmido pINV de aproximadamente 200 kb, el cual es esencial en el proceso de invasión, ya que codifica los genes para la producción de adhesinas e invasinas, la diseminación en el tejido blanco y la secreción de diversos factores de virulencia<sup>6,7</sup>.

El proceso patológico de *Shigella* spp. involucra factores de virulencia bacterianos, mecanismos celulares y de defensa del hospedero. Luego de su paso por la mucosa gástrica, *Shigella* spp. induce su endocitosis por parte de las células M del epitelio intestinal, posteriormente la bacteria es fagocitada por los macrófagos residentes. Una vez dentro del macrófago, escapa de la vacuola fagocítica e induce piroptosis proinflamatoria; en el interior del citoplasma de las células del epitelio intestinal, se multiplica y disemina hacia la célula vecina, mediante la inducción de la polimerización de actina en un polo de la bacteria. Cuando la bacteria llega a la célula basolateral y es endocitada, escapa de la vacuola endocítica y prolifera en el citoplasma de la célula hospedera, nicho que la protege de la acción del sistema inmunológico. Después del escape de la vacuola endocítica, *Shigella* spp. queda libre en el citoplasma e inicia un nuevo ciclo de replicación. Este proceso genera una fuerte respuesta inflamatoria que atrae polimorfonucleares hacia los tejidos infectados, lo cual desestabiliza la pared intestinal, incrementa la inflamación y se produce la colitis aguda que caracteriza la shigelosis<sup>6-10</sup>.

### **3.3 Epidemiología de la infección por *Shigella* spp.**

La diarrea causada por *Shigella* spp. constituye un problema importante de salud pública en el mundo. La OMS estima 160 millones de episodios anuales de shigelosis y 1,1 millones de muertes. *S. sonnei* es la principal causa de diarrea en países desarrollados, mientras que *S. flexneri* serotipo 2a, es la principal causa de diarrea en países en desarrollo. Las tasas más elevadas de infección y muerte por *Shigella* spp. se presentan en niños menores de 5 años<sup>5</sup>.

La vía de infección es fecal – oral, principalmente, por contacto persona a persona; sin embargo; las moscas, el agua y los alimentos contaminados son vectores importantes en la transmisión de *Shigella* spp., siendo estos dos últimos, frecuentemente asociados a brotes<sup>5</sup>. La diarrea causada por *Shigella* es una de las diarreas bacterianas más transmisibles, debido a que la dosis infectante es de tan solo de 10 a 100 microorganismos<sup>1,5</sup>.

En Chile, durante el periodo enero de 2010 – marzo de 2012, el Laboratorio Nacional Referencia de Agentes ETAs del Instituto de Salud Pública, confirmó un total de 867 cepas de

*Shigella* spp. La especie identificada con mayor frecuencia fue *S. sonnei* (58%), seguido de *S. flexneri* 2a (21%). Además, se observó un aumento del 34% de *S. sonnei* en el primer trimestre de 2012, en comparación con el mismo período en 2011, y de un 68% en comparación con 2010<sup>11</sup>.

La sensibilidad antibiótica de las especies del género *Shigella* spp. se ha modificado en los últimos años, en gran medida, probablemente por la fuerte presión selectiva ejercida por el uso masivo de antimicrobianos. Este fenómeno se ve reflejado en el aumento del número de casos causados por cepas resistentes en todo el mundo<sup>12</sup>. Chile, no ha estado ajeno a este fenómeno, describiéndose una resistencia mayor al 70% a sulfatrimetoprim y cloranfenicol<sup>13,14</sup>.

### **3.4 Fermentación de la lactosa en bacterias**

La fermentación de la lactosa es una propiedad bioquímica ampliamente utilizada para reconocer diversas especies de enterobacterias. Algunos microorganismos son fermentadores de lactosa rápidos (menos de 24 horas), tardíos (más de 24 horas), o no pueden fermentar lactosa bajo ninguna circunstancia<sup>4,15</sup>. El modelo más estudiado de la fermentación de la lactosa es *E. coli*. En esta especie, los genes requeridos para el metabolismo de la lactosa se encuentran organizados en el operón lactosa (operón *lac*). Éste está constituido, por un promotor, un operador y tres genes estructurales adyacentes. El promotor es la secuencia de DNA donde se une la RNA polimerasa, mientras que al operador se une la proteína represora LacI. Los genes estructurales *lacZ*, *lacY* y *lacA* codifican para las enzimas involucradas en el metabolismo de la lactosa: la  $\beta$ -galactosidasa (*lacZ*) cataliza la hidrólisis de lactosa, una vez que el disacárido ha ingresado a la célula, la lactosa permeasa (*lacY*), permite el transporte de la lactosa al interior de la célula y la tiolactosa transferasa (*lacA*), que transfiere grupos acetilo desde acetil-CoA a  $\beta$ -galactósidos, aunque este paso no es esencial para el metabolismo de la lactosa. La transcripción del operón es controlada por el represor LacI y por la CAP<sup>16,17</sup>.

La regulación del operón *lac* ha sido ampliamente estudiada y existen numerosas revisiones que describen con detalle los mecanismos de inducción y represión<sup>17-20</sup>. Brevemente, la transcripción de los genes *lac* está sujeta a una regulación tanto positiva como negativa,

dependiendo de la disponibilidad de lactosa y/o glucosa en el medio. En la fase de inducción, se transcriben los genes estructurales del operón, cuando la lactosa está presente y la glucosa se ha reducido drásticamente del medio. Por el contrario, en ausencia de lactosa, la síntesis de las enzimas está bloqueada por la proteína represora LacI. En la fase de represión los niveles de las enzimas catabólicas son bajos, debido a la presencia de glucosa en el medio, que produce un descenso en la concentración de cAMP y CAP <sup>17-20</sup>.

### 3.5 Fermentación de la lactosa en *Shigella* spp.

La fermentación de la lactosa y organización del operón *lac* en el género *Shigella* ha sido poco estudiada. Ito *et al.* (1991) mediante hibridación por *Southern blot*, empleando como sondas las regiones de los genes *lacZ* y *lacY-A*, observaron que el DNA cromosómico de *S. sonnei* y *S. dysenteriae* tipo 1 hibridó con la sonda *lacZ* con una estrictez similar al DNA control positivo de *E. coli* K-12, mientras que el DNA cromosómico de *S. flexneri* 1b y 3a y *S. boydii* 2 y 4 no hibridó con esta sonda. Estos resultados son concordantes con el fenotipo  $\beta$ -galactosidasa positivo de *S. sonnei* y *S. dysenteriae* tipo 1, determinado por hidrólisis de ONPG de acuerdo con el método descrito por Miller *et al.* (1972), y con el fenotipo negativo de *S. flexneri* 1b y 3a y *S. boydii* 2 y 4 <sup>21</sup>.

Así mismo, se determinó la actividad y el peso molecular de la enzima  $\beta$ -galactosidasa en cepas de *S. sonnei*, *S. dysenteriae* tipo 1 y *E. coli* K-12, observándose que la actividad enzimática de *S. sonnei* fue variable, en algunas cepas con una actividad similar a *E. coli*. Mientras que la actividad enzimática de *S. dysenteriae* tipo 1 fue menor. Por otro lado, los pesos moleculares de las enzimas de *S. sonnei* y *E. coli* fueron similares <sup>21</sup>.

El análisis con la sonda *lacY-A*, reveló que sólo el DNA cromosómico de *S. sonnei* hibridó, aunque con baja estrictez <sup>25</sup>. Considerando que la sonda empleada corresponde a la región completa de los genes *lacY-A*, estos resultados sólo sugieren la presencia de una región homóloga al gen *lacY* y/o *lacA* en el genoma de *S. sonnei*. Finalmente, en este mismo estudio, se determinó la actividad lactosa permeasa, en las cepas de *S. sonnei* y *S. dysenteriae* tipo 1, no detectándose actividad permeasa <sup>21</sup>.

Por su parte, Yang *et al.* (2005), a través del análisis de la secuencia de los genomas completos de *Shigella* spp., identificaron que tanto *lacY* como *lacZ* han sido eliminados del genoma de *S. flexneri* 301 y *S. boydii* 227, mientras que en *S. dysenteriae* tipo 1, *lacZ* está intacto y *lacY* está ausente. En este mismo estudio, se encontró que en *S. sonnei*, el gen *lacZ* está intacto, mientras que *lacY* está presente como un pseudogen, debido a la presencia de una *IS1* en la región codificante y a la ausencia de la secuencia que codifica para su región amino-terminal<sup>2</sup>. Por lo tanto, a pesar de presentar actividad  $\beta$ -galactosidasa, la ausencia de una permeasa funcional para lactosa explicaría la fermentación tardía en *S. sonnei*<sup>4,21,22</sup>, una propiedad bioquímica ampliamente utilizada para diferenciar las cepas de *Shigella* spp. de las cepas de *E. coli*, debido a que la mayoría de las cepas de *Shigella* spp. no fermentan la lactosa a las 24 h de incubación.

### **3.6 Cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas de lactosa**

Cook *et al.* (1951) al estudiar cepas de *S. sonnei* fermentadoras lentas de lactosa, describieron la aparición de variantes que fermentaban de forma rápida este azúcar, pero no profundizaron en el tema<sup>15</sup>. En Chile, en dos brotes de diarrea en Antofagasta y la Región Metropolitana, en el verano de 2008-2009, se aislaron algunas cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas de lactosa (menos de 24 horas).

La relación clonal entre las cepas de ambos brotes fue analizada previamente en el laboratorio de la Dra. Cecilia Toro del Programa de Microbiología y Micología, ICBM, Universidad de Chile, mediante tres métodos de genotipificación: PFGE, ERIC y MLVA. Dichos análisis revelaron que las cepas del brote de Antofagasta están relacionadas genéticamente con las cepas del brote de la Región Metropolitana<sup>23</sup>, sugiriendo la diseminación de un mismo clon a lo largo de Chile.

De acuerdo con los estudios de Ito *et al.* (1991) y Yang *et al.* (2005), se sabe que las cepas de *S. sonnei* poseen el gen de la  $\beta$ -galactosidasa intacto y funcional<sup>2,21</sup>. Mientras que un análisis *in silico* de los genomas de dos cepas de *S. sonnei*, típicamente fermentadoras tardías de lactosa, Ss046 y 53G, confirmó la condición de pseudogen de *lacY*, y reveló la presencia del elemento

IS1, a partir de la posición nucleotídica 271, y la ausencia de 957 pb del extremo 3' terminal del gen, en comparación con su homólogo en *E. coli*.

En atención a estos antecedentes, es plausible plantear tres alternativas que expliquen la fermentación rápida de la lactosa en las cepas aisladas de los brotes de Antofagasta y la Región Metropolitana. La primera, involucra la presencia de un gen *lacY* intacto y funcional; la segunda posibilidad podría estar dada por cepas que sobreexpresen o que presenten una mayor actividad  $\beta$ -galactosidasa, aunque no hay estudios que sugieran variabilidad en la actividad de esta enzima en cepas de *S. sonnei*<sup>21</sup>. La tercera alternativa, podría estar dada por la presencia de otro u otros transportadores capaces de internalizar la lactosa. Al respecto de esta última alternativa, se ha documentado de forma extensa en *E. coli* mutaciones que alteran la especificidad de los sustratos de diferentes transportadores galactosídicos<sup>24-27</sup>, permitiendo el transporte eficiente tanto de disacáridos como de monosacáridos por vías alternativas. Así, una posibilidad podría ser que en las cepas de *S. sonnei* de los brotes de Antofagasta y la Región Metropolitana, la fermentación rápida de la lactosa se deba a la presencia de mutaciones, en uno o varios componentes de otros transportadores, que modifiquen su rango de sustratos transportados y con ello permitan el ingreso de la lactosa.

### **3.7 Transportadores galactosídicos en *S. sonnei***

Con el propósito de encontrar transportadores activos de azúcares que pudiesen ser una alternativa para el transporte de la lactosa en las cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas, se analizaron los genomas de *S. sonnei* de las cepas Ss046 y 53G. Se encontraron los genes que codifican para la fucosa, sacarosa y melibiosa permeasa y los sistemas transportadores de ribosa, arabinosa y maltosa. De estos, sólo el gen de la melibiosa permeasa corresponde a un pseudogen debido a la presencia de una IS2 en su región codificante<sup>2</sup>.

La fucosa, sacarosa y melibiosa permeasa pertenecen a la Superfamilia MFS de proteínas transportadoras, las cuales están formadas por un único polipéptido y transportan, de forma exclusiva, pequeños solutos en respuesta a gradientes iónicos quimiosmóticos<sup>28</sup>. Particularmente, la lactosa y la sacarosa permeasa (CscB) forman parte de la subfamilia OHS,



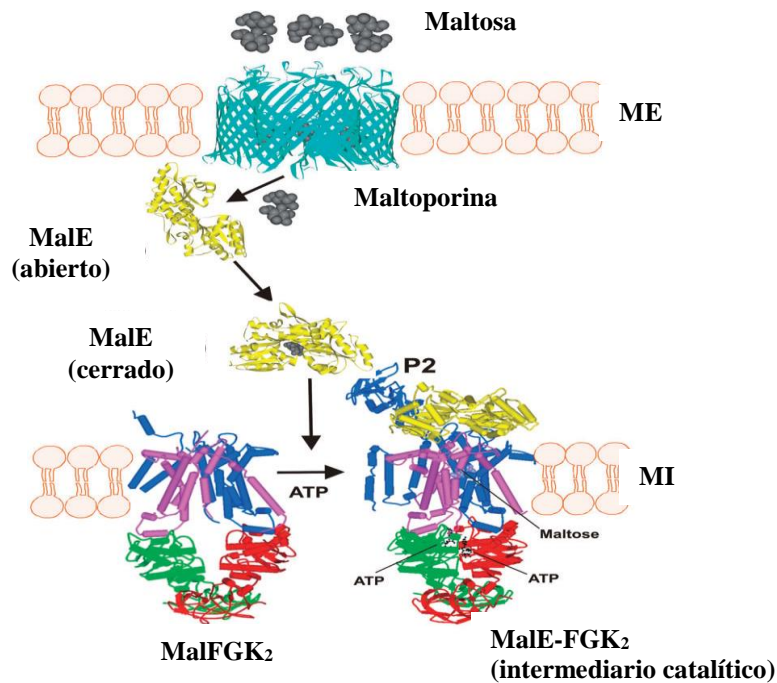
transportadores secundarios que catalizan una translocación acoplada de azúcar y H<sup>+</sup> y poseen una estructura de 12 hélices  $\alpha$  transmembrana, cuyos roles funcionales de los residuos aminoacídicos son conservados<sup>29-30</sup>. Interesantemente, Sugihara *et al.* (2011) demostraron que CscB no sólo reconoce sacarosa, sino que también es capaz de transportar fructosa y lactulosa, aunque no lactosa<sup>30</sup>.

Por otro lado, los sistemas de transporte de ribosa, arabinosa y maltosa pertenecen a la superfamilia de transportadores ABC, los cuales están formados por varios componentes y transportan, tanto moléculas pequeñas, como macromoléculas en respuesta a la hidrólisis de ATP<sup>29, 31-33</sup>.

### 3.8 Sistema transportador de maltosa

La característica común de los transportadores ABC es que constan de dos dominios diferentes, el dominio transmembrana (*Transmembrane domain*, TMDs) y el dominio de unión a ATP (ATP-binding cassette) ó *Nucleotide Binding Domain*, NBDs. Los dominios TMD están localizados en la membrana, formando un canal que determina la especificidad hacia el sustrato y permite su translocación a través de la membrana. Su secuencia y arquitectura es variable, reflejando la diversidad química de los sustratos transportados. En contraste, los dominios NBD se caracterizan por poseer motivos altamente conservados, están localizados en el citoplasma celular y su función es unir e hidrolizar ATP para la obtención de energía<sup>31-34</sup>. Además, los sistemas de importación ABC, hasta ahora exclusivos de procariotas, requieren de componentes adicionales, tales como receptores para el reconocimiento del sustrato y proteínas de unión extra citoplasmáticas para iniciar el ciclo del transporte<sup>33,34</sup>.

En *E. coli*, el transporte de maltosa al interior de la célula requiere la participación de cinco proteínas, **Figura 1**: LamB, receptor  $\lambda$  ó maltoporina, codificada por el gen *lamB*; una proteína periplasmática de unión a la maltosa (MBP) ó maltodextrina, codificada por el gen *malE*; dos proteínas integrales de membrana, MalF y MalG, codificadas por genes similares (Dominios TMD); y dos copias de la subunidad hidrolizante de ATP, MalK, codificado por el gen *malK* (Dominios NBD)<sup>35,36</sup>.



**Figura 1.** Componentes del sistema transportador de maltosa en *E. coli* <sup>32</sup>.

En cuanto a los monosacáridos y disacáridos transportados por las proteínas mencionadas, Merino *et al.* (1997, 1998), identificaron mutaciones en las posiciones 99 y 334 del gen *malF* del sistema transportador de maltosa, las cuales se tradujeron en alteraciones en los dominios transmembrana de la proteína MalF, modificando el rango de sustratos transportados por el sistema, lo que permite un transporte eficiente de la lactosa en cepas de *E. coli* <sup>37,38</sup>.

Por otra parte, Messer (1974), aisló 24 cepas de *E. coli* que transportaban lactosa y algunos de sus análogos vía el sistema de transporte de la arabinosa. El sitio de mutación fue el gen *araC* lo cual permitió una expresión constitutiva de todo el operón arabinosa <sup>39</sup>.

Considerando lo anterior, las proteínas involucradas en la especificidad hacia el sustrato (como *lamB*) y las proteínas que forman parte de los dominios TMD (como *malF*) del sistema transportador de maltosa, constituyen buenos candidatos para evaluar su participación en la internalización de la lactosa en las cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas aisladas de los brotes de Antofagasta y la Región Metropolitana.

## **4. HIPÓTESIS**

Considerando los antecedentes expuestos, esta tesis propone la siguiente hipótesis:

**La fermentación rápida de lactosa en cepas de *S. sonnei*, aisladas de los brotes de Antofagasta y la Región Metropolitana 2008-2009, se debe a la presencia del sistema transportador de maltosa capaz de internalizar lactosa.**

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Identificar un transportador alternativo a la lactosa permeasa (maltosa) en cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas de lactosa, aisladas del brote de Antofagasta y la Región Metropolitana 2008-2009.

### **5.2 Objetivos específicos**

- 5.2.1** Caracterizar el fenotipo de fermentación rápida de lactosa en las cepas de *S. sonnei* aisladas del brote de Antofagasta y la Región Metropolitana.
- 5.2.2** Analizar la integridad del gen *lacY* en cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas de lactosa aisladas del brote de Antofagasta y la Región Metropolitana.
- 5.2.3** Determinar la participación de los genes *lamB* y *malF* del sistema transportador de maltosa, en la incorporación de lactosa y su correlación con la fermentación rápida en cepas de *S. sonnei*.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Cepas**

#### **6.1.1 Procedencia**

Se estudiaron dos colecciones de cepas de *S. sonnei*, la primera corresponde a 17 cepas aisladas de pacientes entre enero y junio de 2008 en Antofagasta, las cuales fueron cedidas gentilmente por el profesor Juan Silva del Departamento de Tecnología Médica, Universidad de Antofagasta. La segunda colección corresponde a 91 cepas aisladas de pacientes entre los años 2008 y 2009 en diferentes centros médicos de Integramédica de la Región Metropolitana, éstas forman parte de un cepario mantenido en el Laboratorio de Patógenos Entéricos y Resistencia Antimicrobiana del Programa de Microbiología y Micología, ICBM, Universidad de Chile. En la actualidad, estas cepas de *S. sonnei* están siendo analizadas fenotípicamente y genotípicamente en el desarrollo del proyecto Fondecyt 1130394, Population dynamics of *Shigella sonnei* strains in Chile: Emerging of a new pathogen?.

#### **6.1.2 Tipificación**

La identificación de género de las 108 cepas en estudio, se realizó mediante el sistema automatizado Vitek2 (BioMérieux®). La especie se confirmó mediante reacción de aglutinación en lámina utilizando antisueros comerciales (Probac®) y el biotipo, se determinó de acuerdo con el método descrito por Nastasi *et al.* (1993), el cual combina la capacidad de fermentación de la ramnosa y xilosa y la hidrólisis de ONPG, como esquema de tipificación<sup>40</sup>. Se emplearon como controles las cepas de *S. sonnei* ATCC 25931 y *E. coli* ATCC 25922.

La evaluación del tiempo de fermentación de la lactosa se realizó en las 108 de *S. sonnei* aisladas de los brotes de Antofagasta (17) y la Región Metropolitana (91) 2008-2009. La caracterización del fenotipo de fermentación de la lactosa y el análisis de la integridad del gen *lacY* se llevó a cabo en 10 cepas fermentadoras rápidas representativas de cada brote. Se evaluó

en una cepa fermentadora rápida de cada brote la participación del sistema transportador de maltosa en la incorporación de lactosa y su correlación con la fermentación rápida.

## **6.2 Caracterización de la fermentación de la lactosa en cepas de *S. sonnei* aisladas de ambos brotes**

La caracterización de la fermentación rápida de la lactosa en las cepas aisladas de los brotes de Antofagasta y la Región Metropolitana contempló las siguientes actividades:

### **6.2.1 Evaluación del tiempo de fermentación de la lactosa**

El tiempo de fermentación de la lactosa se determinó en placas de agar Mac Conkey para las 108 cepas de *S. sonnei* aisladas. Se registró el tiempo en el que se produjo el viraje del pH, por cambio de color de las colonias, consignando como cepas fermentadoras rápidas aquellas que viran el pH a las 24 h de incubación; cepas fermentadoras tardías, aquellas que viran pH a las 48 h y como no fermentadores las que lo hacen después de 48 h.

### **6.2.2 Estabilidad fenotípica de la fermentación rápida de lactosa en placas de agar Mac Conkey**

La estabilidad del fenotipo de fermentación rápida de la lactosa se analizó, en 10 cepas fermentadoras rápidas representativas de cada brote. De cada cepa, se preparó una suspensión de  $1 \times 10^5$  UFC/mL y se inoculó un volumen de 0,2 mL en placas de agar Mac Conkey, empleando asa de Drigalski. Luego de 24 h de incubación a 37°C, de cada cultivo se seleccionó una colonia lactosa positiva. A partir de cada colonia lactosa positiva seleccionada, se realizaron cinco cultivos seriados y la estabilidad del fenotipo de fermentación, se definió como: la proporción de colonias lactosa positivo del total de colonias crecidas en agar Mac Conkey.

### **6.2.3 Curva de utilización de la lactosa: Curva de crecimiento y medición del pH**

La utilización de la lactosa en las cepas seleccionadas fue determinada en forma indirecta, registrando a diferentes tiempos el cambio de pH en caldo Mac Conkey y en caldo M9 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 48 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 22 mM, NaCl 4,5 mM, NH<sub>4</sub>Cl 19 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2 mM, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,1 mM) suplementado con lactosa (1%). El inóculo para cada cultivo fue de 1 x 10<sup>6</sup> UFC/mL. Paralelamente, se construyó una curva de crecimiento, determinando la DO<sub>600</sub> del cultivo entre 6 y 24 h.

### **6.2.4 Determinación de la actividad β-galactosidasa**

#### **6.2.4.1 Cualitativa**

La actividad β-galactosidasa se evaluó cualitativamente en las 20 cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas seleccionadas previamente, así como otras 19 actividades enzimáticas. Para esto, se utilizó el sistema comercial API ZYM® (BioMerieux, Francia), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### **6.2.4.2 Cuantitativa**

Los niveles de actividad β-galactosidasa fueron determinados por hidrólisis de ONPG como se ha descrito previamente por Miller, 1972<sup>41</sup>. Para ello, las 20 cepas en estudio, así como los controles (*S. sonnei* ATCC 25931 y *E. coli* ATCC 25922), fueron cultivadas en medio M9 suplementado con triptona con y sin IPTG, como inductor de la β-galactosidasa, y se incubaron a 37°C hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,5.

Cuando el cultivo alcanzó la DO<sub>600</sub> de 0,5, se tomaron alícuotas de 200 μL y se llevaron a un volumen final de 1000 μL con el buffer Z (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 60 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, pH a 7,0). Posteriormente, las células fueron permeabilizadas agregando cloroformo y SDS al 0,1%, agitando la mezcla en vórtex y equilibrando los tubos a temperatura ambiente.

Se cronometraron los tiempos de inicio de la reacción, al agregar el sustrato ONPG (4 mg/mL) hasta la aparición de una coloración amarilla. La reacción se detuvo, agregando Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 M) y se midió la absorbancia a 420nm. La actividad enzimática se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula: 
$$\text{Actividad (U/ml)} = \frac{\text{DO}_{420\text{nm}} \cdot 1000}{\text{volumen} \cdot \text{tiempo} \cdot \text{DO}_{550\text{nm}}}$$

### 6.3 Análisis de la integridad del gen *lacY* en cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas de lactosa aisladas del brote de Antofagasta y la Región Metropolitana

La integridad del gen *lacY*, así como la presencia del elemento *IS1* en *lacY*, se analizó mediante PCR-secuenciación; los partidores empleados (LacZF/LacYR1 y LacZF/IS1R) se describen en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Partidores empleados durante el desarrollo de esta tesis.

Nombre	Secuencias 5'– 3'	Tamaño del producto (pb)
LacZF	CCAGTTGGTCTGGTGTCAAA	1002
LacYR1	GCGAACGATGAGCCAATAAT	
LacZF	CCAGTTGGTCTGGTGTCAAA	745
IS1R	GACATAGCCCCACTGTTCGT	
LamBF2	CGTTTAAGCACCCACAAA	1474
LamBR2	ACCTGTTTTTATGCCGGATG	
MalEF	GCGTTTCAGTTTTGTAGGCC	1331
MalER	GATGGAAAGAGGTTGCCGTA	
MalF2F	GGGAACATAATCGCCGCG	1739
MalF2R	AGGCCTGATAAGACGCATCA	
MalGF	CGCCGAATAACAGTCACAAGTT	1017
MalGR	TAGTGAACCTGAAAGCCACG	
MalKF	GCATAGTCAGCCCATCATGAAT	1244
MalKR	TCTCCTGAGTCATTGCTTTTCT	
AraCF	AGAGCCAGTAAAAGACGCAG	1040
AraCR	TCAAATGGACGAAGCAGGGA	
AraEF	CCAGGTGCCCAATCTCTATT	1543
AraER	CACCTGTGTGAGTTGTTACG	
AraFF	TTCTCGCTAAAACACTATGTCAACACG	1177
AraFR	AATCACTGGTTCGTTACACCCC	
AraGF	TGCCAAGCCCGGACGTACAT	1864
AraGR	GAGCACCGCAAACACCACCA	
AraHF	GAGCCTTGCGATGCCTAAAG	1087
AraHR	GCTGGCTGTGGTGGGAAAA	

<b>LamBCIF</b>	CCGAATTCACCATGATGATTACTCTGCGCA	1350
<b>LamBCIR</b>	CCAAGCTTTTACCACCAGATTTCCATCT	
<b>MalFCIF</b>	CCAAGCTTCCTTAATCAAACCTTCATTCGCG	1555
<b>MalFCIR</b>	CCGAATTCATGGATGTCATTAAAAAGAA	
<b>pBAD24F</b>	CTGTTTCTCCATACCCGTT	112
<b>pBAD24R</b>	CTCATCCGCCAAAACAG	
<b>qlamBF</b>	TGCCGGTCTGAAAAACATC	180
<b>qlamBR</b>	TCTGCGCTAAACGCACATC	
<b>qmalFF</b>	CGGATTCCCGGGTAAACAT	180
<b>qmalFR</b>	ACGCGCTGAAATGGTCAGT	
<b>16ScortoF</b>	CAGCCACACTGGAAGTGA	204
<b>16ScortoR</b>	GTTAGCCGGTGCTTCTTCTG	

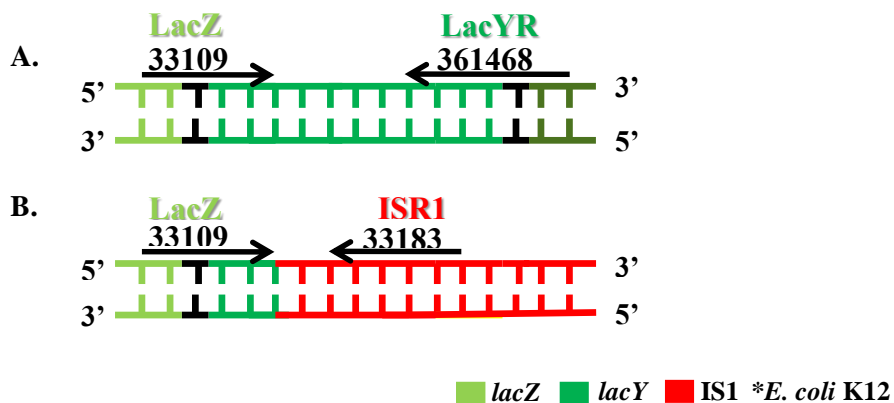
### 6.3.1 Extracción de DNA

La extracción del DNA genómico de todas las cepas empleadas en el estudio se realizó mediante el kit comercial E.Z.N.A® Bacterial DNA Kit OMEGA bio-tek, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 6.3.2 Partidores

Las secuencias de los partidores utilizados en esta tesis se describen en la **Tabla 1**. El diseño de los partidores para las PCRs convencionales, se realizó con el software Primer 3, mientras que el diseño de los partidores para las qPCRs se realizó con el programa Geneious®. Los partidores para amplificar el gen *lacY* completo (*lacZF/lacYR*) fueron diseñados a partir de las secuencias de *E. coli* K12 MG1655. Por otra parte, con base en las secuencias de las cepas de *S. sonnei* Ss046 y 53G se diseñó un partidor para el extremo 3' (ISR1) que permita amplificar parte de la *IS1* presente en el gen de *lacY*, **Figura 2**.





**Figura 2.** Partidores diseñados para el análisis de la integridad del gen *lacY*. (A) Amplificación del gen *lacY* completo, fragmento 1002 pb. (B) Amplificación del gen *lacY* + *IS1*, fragmento 745 pb.

### 6.3.3 Reacción de PCR

La reacción de PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: Buffer 5X (10 mM), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), dNTP (50 μM), partidores (0,4 μM), Taq DNA Polimerasa Promega® (1,25 UI/μL) y DNA (20 ng/μL), en un volumen final de 50 μL. Los ciclos, las temperaturas y los tiempos de reacción fueron: un paso de desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 1min; para luego concluir con un ciclo de extensión final por 10min a 72°C. Las reacciones se realizaron en un termociclador G-Storm Thermal Cyclers.

Se empleó como control positivo para el gen *lacY* completo DNA genómico de la cepa de *E. coli* ATCC 25922 y como control del gen *lacY* interrumpido con *IS1* se utilizó DNA de la cepa *S. sonnei* ATCC 25931.

### 6.3.4 Análisis de los productos de PCR

10 μL del volumen total de cada reacción de PCR fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 0,5X utilizando como estándar del tamaño molecular el marcador de 1kb (New England Biolabs®). Los geles fueron teñidos con 1 μg/mL de bromuro de etidio y fotografiados bajo luz UV (Spectroline UC 312-R) en formato electrónico utilizando el sistema de captura digital EDAS 2009 de KODAK y el Software KODAK 1D3.6.

### **6.3.5 Purificación de los productos de PCR**

Los productos amplificados por PCR fueron purificados usando E.Z.N.A® Cycle-Pure Kit OMEGA bio-tek, según instrucciones del proveedor.

### **6.3.6 Secuenciación de los productos de PCR**

Los productos de PCR purificados fueron secuenciados en MacroGen Sequencing System - Corea por el método de Sanger.

### **6.3.7 Análisis de las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas**

El análisis de las secuencias se realizó en el programa BLAST y los alineamientos de secuencia se realizaron con el programa CLUSTAL-W a través del software Geneious®.

## **6.4 Determinación de la participación de los sistemas transportadores de maltosa y arabinosa en la incorporación de lactosa mediante análisis de secuencia de los genes de ambos sistemas, análisis de los niveles de expresión de *lamB* y *malF* y expresión heteróloga de estos genes en células de *S. sonnei* ATCC 25931**

### **6.4.1 Análisis de las secuencias de los genes del sistema transportador de maltosa y arabinosa en una cepa de *S. sonnei* fermentadora rápida de lactosa representativa de cada brote**

Con el objetivo de identificar mutaciones que amplíen el rango de sustrato y permitan incorporar lactosa a través de los transportadores de maltosa o arabinosa, se analizó la secuencia de los genes *malG*, *malF*, *malE*, *malK* y *lamB* del transportador de maltosa y los genes *araC*, *araH*, *araG*, *araF* y *araE* del transportador de arabinosa, en dos cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas, 37A y 8273RM. Para ello, los genes fueron amplificados por PCR y secuenciados por el método de Sanger.

Se emplearon los partidores MalGF/MalGR, MalFF/MalFR, MalEF/MalER, MalEF/MalER y LamBF/LamBR para amplificar los genes del sistema transportador de maltosa, y los partidores, AraCF/AraCR, AraHF/AraHR, AraGF/AraGR, AraFF/AraFR y AraEF/AraER para amplificar los genes del sistema transportador de arabinosa, **Tabla 1**. La reacción de PCR, la visualización de los productos, la secuenciación y el análisis de las secuencias, fue similar a lo descrito para el análisis de la integridad del gen *lacY* (6.3).

#### **6.4.2 Análisis de los niveles de expresión de *lamB* y *malF* de una cepa de *S. sonnei* fermentadora rápida de lactosa representativa de cada brote mediante qPCR**

La determinación de los niveles de expresión de los genes *lamB* y *malF*, del sistema transportador de maltosa de una cepa fermentadora rápida representativa de cada brote, se realizó mediante qPCR empleando como control la cepa de *S. sonnei* ATCC 25931, fermentadora tardía de lactosa. Considerando que los vectores de expresión disponibles en nuestro laboratorio son inducibles por arabinosa, solo se determinaron los niveles de expresión de los genes *lamB* y *malF*, del sistema transportador de maltosa.

##### **6.4.2.1 Extracción de RNA**

Se extrajo RNA total de las cepas de *S. sonnei* 37A, 8273RM y ATCC 25931, como control, mediante el kit RNeasy® de Qiagen®. Para ello, las cepas fueron cultivadas en caldo LB a 37°C por 6 h a 190 rpm. El RNA extraído se trató con DNasa libre de RNasas de Promega® a 37°C por 1 h.

La concentración del RNA se determinó en el equipo Cytation™ 3 de Biotek® y la pureza se determinó estableciendo la relación de absorbancia 260/280. Finalmente, el grado de integridad se evaluó en un gel de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

#### 6.4.2.2 Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se realizó mediante el kit AffinityScript™ Multiple Temperature Reverse Transcriptase®, según las instrucciones del fabricante.

#### 6.4.2.3 qPCR

Para realizar las curvas de calibración se realizó una qPCR empleando los partidores para los genes *lamB*, *malF* y 16S rRNA, **Tabla 1** (qlamBF/qlamBR, qmalFF/qmalFR y 16ScortoF/16ScortoR, respectivamente). Alícuotas de 20 µL de cada producto de PCR fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con 5 µL de GelRed™ 5.000x, durante 50 min. Finalizada la electroforesis, los productos se aislaron desde el gel utilizando QIAquick® Gel Extraction kit de QIAGEN® y se cuantificaron en el Cytation™ 3, BioTeck®. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas (1/10) de los productos purificados hasta alcanzar una concentración de 10<sup>-9</sup> ng/µL y generar la curva de calibración estándar de cada gen.

Para la cuantificación de los niveles de expresión se realizó una qPCR de 45 ciclos a 95°C por 15 segundos, 58°C por 15 segundos y 72°C por 15 segundos, usando para ello el *Master Mix Brilliant II SYBR*® QPCR de Agilent Technologies®. Los valores de expresión obtenidos desde el software EcoRealtime v4.0. se normalizaron respecto al gen 16S rRNA.

#### 6.4.2.4 Análisis estadístico

La significancia estadística se estableció con un valor de  $p < 0,05$ , mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa Prisma v5.0 for Windows, GraphPad® Software Inc.

### **6.4.3 Expresión heteróloga de los genes *lamB* y *malF* de una cepa de *S. sonnei* fermentadora rápida de lactosa representativa de cada brote en células de *S. sonnei* ATCC 25931**

Para evaluar el papel funcional del sistema transportador de maltosa en la incorporación de la lactosa, se clonaron los genes *lamB* y *malF* de una cepa fermentadora rápida de lactosa aislada de cada brote (37A y 8273RM) en el vector de expresión pBAD24<sup>42</sup>, gentileza del Dr. Juan Carlos Salazar del Programa de Microbiología y Micología, ICBM, Universidad de Chile. Posteriormente, se indujo la expresión heteróloga de ambos genes en la cepa de *S. sonnei* ATCC 25931, fermentadora tardía de la lactosa.

#### **6.4.3.1 Extracción de ácidos nucleicos**

Para la extracción del DNA plasmidial se utilizó el kit comercial E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid DNA Mini kit I ó Mini kit II OMEGA bio-tek, dependiendo de la cantidad de DNA necesaria. La purificación de los productos de PCR y de las digestiones, se realizó con el kit comercial E.Z.N.A.<sup>®</sup> Cycle Pure Kit OMEGA Bio-tek siguiendo las especificaciones del fabricante. Finalmente, la determinación de la concentración de DNA plasmidial se realizó en el equipo Cytation™ 3, BioTeck<sup>®</sup>.

#### **6.4.3.2 Amplificación de los genes *lamB* y *malF* de cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas de lactosa**

Una vez extraído el DNA genómico de las cepas en estudio, se realizó la amplificación de los genes *lamB* y *malF* mediante PCR. Para ello, se diseñaron los partidores lamBCIF/lamBCIR y malFCIF/malFCIR, **Tabla 1**, los cuales contienen un sitio de restricción para las enzimas *EcoRI* y *HindIII* (Fermentas<sup>®</sup>), para facilitar su clonamiento direccional en pBAD24<sup>42</sup>. El diseño de la estrategia de clonación se realizó en el software Plasma DNA, versión 1.4, Universidad de Helsinki.

La reacción de PCR, para todos los fragmentos amplificados, fue realizada bajo las siguientes condiciones: Buffer 10X (10 mM), MgCl<sub>2</sub> (2 mM), dNTP (0,25 mM), partidores (0,2 μM), High Fidelity PCR Enzyme Mix Fermentas® (5 UI/μL) y DNA (100 ng/μL), en un volumen final de 50 μL.

El programa de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización de 95°C por 10 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, alineamiento a 56°C para *lamB* y 57°C para *malF*, extensión a 72°C por 1 min y extensión final por 10 min a 72°C. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador G-Storm.

Los fragmentos obtenidos por PCR fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con 1 μg/mL de bromuro de etidio y fotografiado bajo luz ultravioleta en formato electrónico con cámara digital. Los productos amplificados fueron purificados y cuantificados para calcular la concentración de las enzimas de restricción para la digestión.

#### **6.4.3.3 Digestión del DNA con enzimas de restricción**

Los fragmentos de DNA amplificados de los genes *lamB* de las cepas 37A (*lamB*<sup>37A</sup>) y 8273RM (*lamB*<sup>8273RM</sup>) y *malF* de las cepas 37A (*malF*<sup>37A</sup>) y 8273RM (*malF*<sup>8273RM</sup>) así como el vector pBAD24 fueron digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* (Fermentas®), siguiendo las indicaciones de los fabricantes. Una vez transcurrido el tiempo de digestión, las reacciones fueron purificadas y cuantificadas.

#### **6.4.3.4 Reacción de ligado**

Ambos genes fueron ligados al vector de expresión digerido con las mismas enzimas utilizando 100 U de T4 DNA ligasa (Promega®). Se utilizaron cantidades de inserto y vector en concentraciones entre 800-1000 ng/μL y 200-250 ng/μL, respectivamente. La incubación se realizó a 4°C de temperatura durante toda la noche. Los vectores recombinantes fueron denominados plamB<sup>37A</sup>, plamB<sup>8273RM</sup>, pmalF<sup>37A</sup> y pmalF<sup>8273RM</sup>.

#### 6.4.3.5 Transformación de *E. coli* DH5α y *S. sonnei* ATCC 25931

Con los vectores plamb<sup>37A</sup>, plamb<sup>8273RM</sup>, pmalF<sup>37A</sup> y pmalF<sup>8273RM</sup>, se transformaron células de *E. coli* DH5α y de *S. sonnei* ATCC 25931. Para ello, se prepararon células quimiocompetentes mediante el método adaptado de Inoue *et al.* (1990) y se conservaron a -80°C en glicerol. Brevemente, a partir de un cultivo fresco, se inoculó un matraz con medio LB, el cual fue incubado a 37°C con agitación hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> ~ 0,3. Una vez obtenida la densidad óptica deseada, se mantuvo el matraz en hielo durante 10 min y se colectaron las células por centrifugación a 4°C, por 10 min a 3.000 rpm. Las células fueron resuspendidas suavemente en 40 mL de solución de Inoue fría (PIPES 10 mM; CaCl<sub>2</sub> 15 mM; KCl 250 mM, ajustada a pH 6.7). Después de mantener la suspensión en hielo por 10 minutos, se centrifugó a 3.000 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante y resuspendió en 4 mL de solución de Inoue fría<sup>43</sup>.

Para la transformación, se tomó una alícuota de 200 µL de células de *E. coli* DH5α y *S. sonnei* ATCC 25931 quimiocompetentes descongeladas y mantenidas en hielo y se mezcló suavemente con 5 µL del DNA ligado y se dejó 30 min en hielo. Luego se incubó por 45 seg en baño maría a 42°C y se pasó a hielo por 2 min. Posteriormente se adicionaron 900 µL de caldo SOC (caldo LB; Glucosa 2 M; MgCl<sub>2</sub> 2 M) y se incubó 1 h a 37°C con agitación. Finalmente, se plaquearon alícuotas de 200 µL de la mezcla en placas de medio LB ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron por un máximo de 18 h a 37°C<sup>44</sup>.

#### 6.4.3.6 Selección de transformantes para los vectores plamb<sup>37A</sup>, plamb<sup>8273RM</sup>, pmalF<sup>37A</sup> y pmalF<sup>8273RM</sup>

La selección de las colonias transformadas se realizó en placas de LB con ampicilina (100 µg/mL) incubadas a 37°C durante 18 h. Posteriormente, las colonias transformantes fueron verificadas por PCR, empleando los partidores pBAD24F/pBAD24R, **Tabla 1**, específicos para el vector. Las condiciones de PCR fueron similares a las descritas en el análisis de la integridad del gen *lacY*.

A partir de los clones positivos de las células de *E. coli* DH5 $\alpha$ , se purificó el DNA plasmidial y se realizó un análisis de RFLP con las enzimas *Bgl*II, *Eco*RV y *Ava*I (Fermentas®) para los constructos *plamB*<sup>37A</sup> y *plamB*<sup>8273RM</sup>, y *Eco*RV, *Hind*III y *Ava*I (Fermentas®) para los constructos *pmalF*<sup>37A</sup> y *pmalF*<sup>8273RM</sup>. Los productos de restricción fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, empleando el marcador de tamaño molecular de 1 kb como estándar (New England Biolabs®).

En el caso de las células de *S. sonnei* ATCC 25931, sólo los productos de PCR fueron analizados mediante RFLP, no se analizaron los vectores recombinantes (*pBAD24 + lamB* y *pBAD24 + malF*) debido a la presencia de otros plasmidios que presentan los sitios de restricción para las enzimas seleccionadas. En el análisis de los productos de PCR para los vectores *plamB*<sup>37A</sup> y *plamB*<sup>8273RM</sup> se emplearon las enzimas *Nde*I, *Ava*I y *Eco*RV (Fermentas®) mientras que para los productos de *pmalF*<sup>37A</sup> y *pmalF*<sup>8273RM</sup> se emplearon las enzimas *Ava*I y *Ava*II (Fermentas®).

Las restricciones fueron analizados en gel de agarosa al 1,5% usando el marcador de tamaño molecular de 100bp (New England Biolabs®). Finalmente, los fragmentos amplificados por PCR fueron secuenciados en MacroGen Sequencing System, Corea. Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas, fueron analizadas con el software BLAST del Instituto Nacional de Salud, EU.

Las cepas transformantes fueron denominadas *SAmalF37A*, *SAmalF8273RM*, *SAlamB37A* y *SAlamB8273RM*.

#### **6.4.3.7 Inducción de la expresión de los genes *lamB* y *malF* de una cepa de *S. sonnei* fermentadora rápida de lactosa representativa de cada brote en cepas de *S. sonnei* ATCC 25931**

Se prepararon placas de agar Mac Conkey con arabinosa en concentraciones decrecientes (1,0 a 0,001%), para establecer el porcentaje del carbohidrato que permitiera revelar el fenotipo de fermentación de la lactosa en la cepa de *S. sonnei* ATCC 25931 e inducir la expresión de los



genes *lamB*<sup>37A</sup>, *lamB*<sup>8273RM</sup>, *malF*<sup>37A</sup> y *malF*<sup>8273RM</sup> clonados en el vector pBAD24. Los medios de cultivo fueron incubados a 37°C por 24 h. Se emplearon como control las cepas clínicas de *S. sonnei* aisladas de los brotes 37A y 8273RM, *E. coli* ATCC 25922 (fermentador rápido de lactosa), *S. sonnei* ATCC 25931 y *S. sonnei* ATCC 25931 clonada con el vector solo (fermentadores tardíos de la lactosa).

#### **6.4.3.7.1 Determinación de la expresión de los genes *lamB*<sup>37A</sup> y *malF*<sup>37A</sup> de una cepa de *S. sonnei* fermentadora rápida de la lactosa representativa de cada brote en una cepa de *S. sonnei* ATCC 25931 mediante qPCR**

Para confirmar la expresión de los genes *lamB* y *malF* clonados en el vector pBAD24, se realizó una qPCR empleando los partidores *qlamBF/qlamBR*, *qmalFF/qmalFR* y *16ScortoF/16ScortoR*, **Tabla 1**. La cuantificación se realizó de forma relativa empleando el método comparativo de  $\Delta\Delta Ct$ , un modelo matemático que permite determinar los cambios relativos de un gen de interés con referencia a un gen endógeno que no cambia su expresión a pesar de que los estados fisiológicos se modifiquen <sup>45</sup>.

##### **6.4.3.7.1.1 Extracción de RNA**

Se extrajo RNA total de las cepas de *S. sonnei* ATCC 25931 transformadas con el gen *lamB*<sup>37A</sup>, con *malF*<sup>37A</sup> y con el vector solo, como control, mediante el kit RNeasy® de Qiagen®. Para ello, las cepas fueron cultivadas en caldo LB con y sin el inductor arabinosa a 37°C por 6 h a 190 rpm. El RNA extraído se trató con DNasa libre de RNasas de Promega® a 37°C por 1 h.

La concentración y la pureza del RNA se determinó en el equipo Cytation™ 3 de Biotek®. La pureza se determinó estableciendo la relación de absorbancia 260/280. Finalmente, el grado de integridad se evaluó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

#### 6.4.3.7.1.2 Cuantificación relativa de la expresión génica

Para la cuantificación de los niveles de expresión se realizó una qPCR de 40 ciclos a 95°C por 3 seg, 55°C por 20 seg y 72°C por 15 seg, empleando el kit Kapa™ SYBR® FAST One-step qRT-PCR. La reacción de PCR para todos los fragmentos amplificados fue realizada bajo las siguientes condiciones: KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (1X), partidores (10 µM), KAPA RT MIX (1X), RNA (1 ng/µL), en un volumen final de 10 µL.

La cuantificación de la expresión génica de *lamB* y *malF* clonados en el vector pBAD24, se realizó utilizando el método del  $\Delta\Delta C_t$ , el cual consiste en la comparación directa de los valores de  $C_t$  entre los genes a estudiar (*lamB* y *malF*) y el gen de referencia (gen que codifica al rRNA 16S) <sup>45</sup>. Los valores de expresión obtenidos desde el software EcoRealtime v4.0. se normalizaron respecto al gen que codifica al rRNA 16S.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Tipificación de las cepas

Para confirmar el género y la especie de las dos colecciones de cepas de *S. sonnei*, disponibles en el Laboratorio de Patógenos Entéricos y Resistencia Antimicrobiana del Programa de Microbiología y Micología, se realizaron pruebas bioquímicas de forma automatizada empleando el sistema Vitek2 y pruebas de aglutinación en lámina empleando antiseros comerciales, respectivamente.

Las 108 cepas aisladas de los brotes de Antofagasta (17 cepas) y la Región Metropolitana (91 cepas) fueron identificadas como *S. sonnei* de acuerdo con la tipificación serológica mediante prueba de aglutinación (Probac®). Por otro lado, el total de las cepas fueron positivas para ONPG y negativas para la utilización de ramnosa y xilosa, por lo que todas las cepas fueron tipificadas como biotipo g (Nastasi *et al.* 1993) <sup>40</sup>.

### 7.2 Caracterización de la fermentación de la lactosa en cepas de *S. sonnei* aisladas de ambos brotes

Considerando los escasos antecedentes respecto a la fermentación rápida de la lactosa en cepas de *S. sonnei*, se realizó una caracterización de este fenotipo.

#### 7.2.1 Fermentación de la lactosa en placas de agar Mac Conkey

Se determinó el fenotipo de fermentación de la lactosa de las cepas de *S. sonnei* aisladas de los brotes de Antofagasta y la Región Metropolitana estableciendo el tiempo en el que se produce el viraje del pH por cambio en el color de las colonias. De 108 cepas de *S. sonnei* estudiadas, 56 (51,8%) fueron fermentadoras rápidas, 24 (22,2%) fermentadoras tardías y 28 (25,9%) fueron no fermentadoras de lactosa, **Tabla 2**.

**Tabla 2:** Fermentación de lactosa de cepas de *S. sonnei* aisladas en dos brotes, Antofagasta y la Región Metropolitana 2008-2009.

Fermentación de la lactosa	Origen		Total
	Antofagasta	Región Metropolitana	
Fermentadoras rápidas (24 h)	10 (58,8%)	46 (50,5%)	56 (51,8%)
Fermentadoras tardías (48 h)	3 (17,6%)	21 (23,1%)	24 (22,2%)
No fermentadoras	4 (23,5%)	24 (26,3%)	28 (25,9%)
<b>Total</b>	17 (15,7%)	91 (84,3%)	108 (100%)

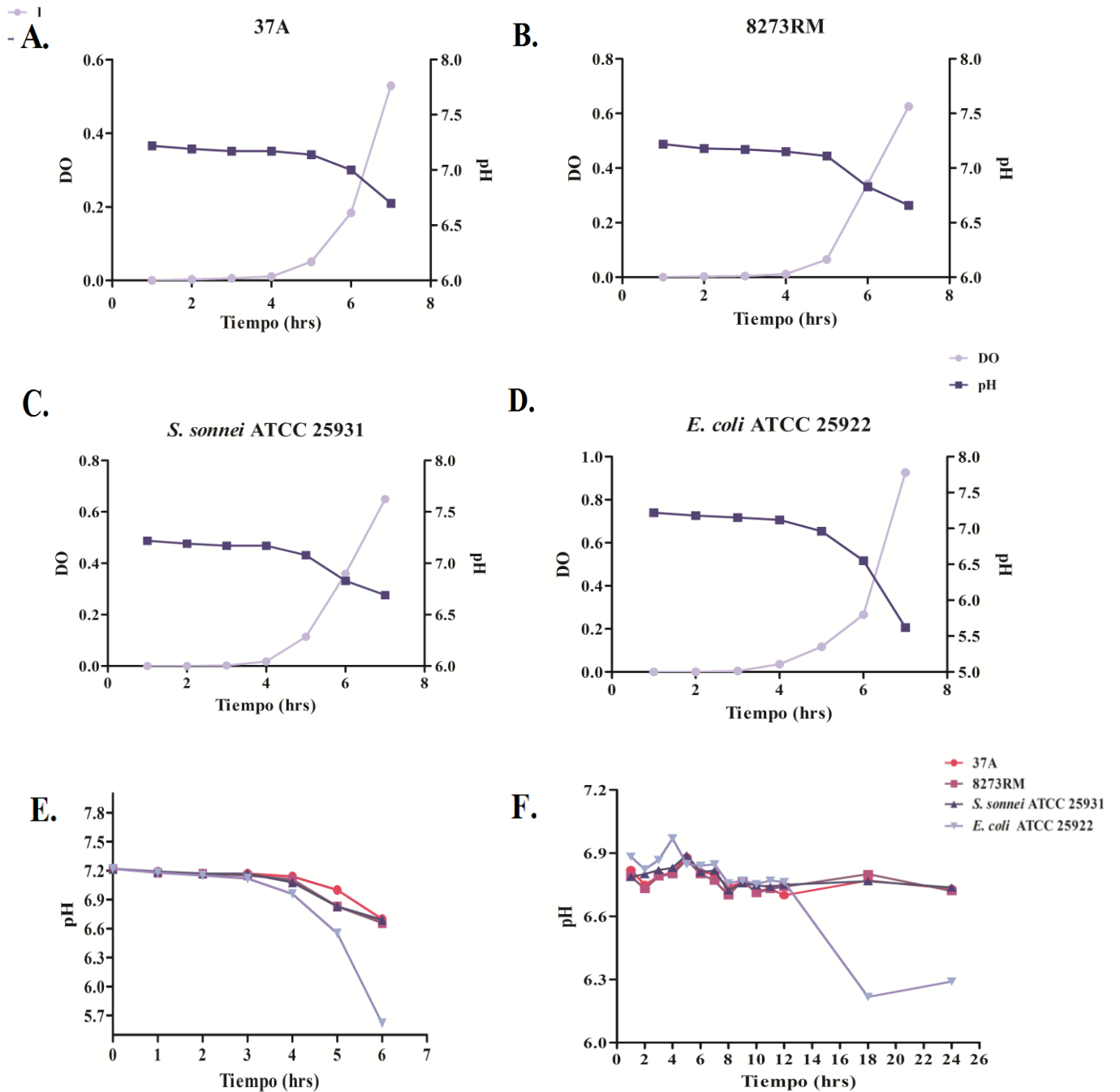
### 7.2.2 Estabilidad fenotípica de la fermentación rápida de la lactosa

Con el objetivo de investigar la estabilidad de la fermentación rápida de la lactosa, de estas cepas, se realizó una evaluación de este fenómeno. Las 20 cepas de *S. sonnei* (10 cepas representativas de cada brote) presentaron un fenotipo estable, evidenciándose que la totalidad de las colonias desarrolladas, en cada uno de los subcultivos, en placas de agar Mac Conkey, fueron lactosa positiva.

### 7.2.3 Utilización de la lactosa en medio líquido

La utilización de la lactosa en las 20 cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas seleccionadas fue determinada de forma indirecta, para lo cual se registró a diferentes tiempos el cambio de pH en medio líquido y paralelamente, se construyó una curva de crecimiento, determinando la densidad óptica del cultivo.

En la curva de crecimiento en caldo Mac Conkey y en medio mínimo, se observa que tanto en los controles como, en las cepas fermentadoras rápidas de lactosa el pH disminuye durante la fase de crecimiento exponencial, **Figura 3, A-D**. Al comparar la variación del pH de las cepas en estudio, no se observan diferencias entre las cepas fermentadoras rápidas y la cepa control de *S. sonnei* tanto en caldo Mac Conkey, **Figura 3, E**, como en medio mínimo suplementado con lactosa, **Figura 3, F**.



**Figura 3:** Curva de crecimiento y variación de pH de cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas de lactosa **A:** cepa aislada del brote de Antofagasta (37A), **B:** cepa aislada del brote de la Región Metropolitana (8273RM), **C:** *S. sonnei* ATCC 25931 y **D:** *E. coli* ATCC 25922. **E:** Comparación de la variación de pH de las cepas 723A, 8273RM, *S. sonnei* ATCC 25931 y *E. coli* ATCC 25922 en caldo Mac Conkey. **F:** Comparación de la variación de pH de las cepas 723A, 8273RM, *S. sonnei* ATCC 25931 y *E. coli* ATCC 25922 en caldo MM9.

## 7.2.4 Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa

Con el fin de verificar y caracterizar la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa de las 10 cepas fermentadoras rápidas de lactosa representativas de cada brote seleccionadas, se realizó una determinación cualitativa y cuantitativa de la misma. Además, las actividades específicas fueron inducidas por IPTG.

### 7.2.4.1 Cualitativa

Al analizar los perfiles de las 20 cepas seleccionadas, se confirmó la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa (destacada en azul claro) para todas las cepas, **Tabla 2**.

**Tabla 3:** Actividades enzimáticas de cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas de lactosa determinadas mediante el sistema comercial API ZYM® (+) reacción positiva; (-) reacción negativa.

ENZIMA	CEPA																					
	<i>S. sonnei</i> ATCC 25931	<i>E. coli</i> ATCC 25922	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Fosfatasa alcalina	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Esterasa (C4)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esterasa lipasa (C8)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lipasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leucina arilamidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Valina arilamidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cistina arilamidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tripsina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -quimotripsina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fosfatasa ácida	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -galactosidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -galactosidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\beta$ -glucuronidasa	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -glucosidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -glucosidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -mannosidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -fucosidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

#### 7.2.4.2 Cuantitativa

Se analizaron 20 cepas fermentadoras rápidas, las cuales fueron tratadas con IPTG para inducir la expresión del operón *lac*. Los resultados de los niveles de  $\beta$ -galactosidasa permiten agrupar las cepas en dos grupos principales, **Tabla 3**, el primer grupo consiste en cepas cuya actividad basal de  $\beta$ -galactosidasa (sin IPTG) es varias veces mayor, entre 253 y 7.124 Umiller, que los niveles de la cepa control *E. coli* ATCC 25922, aunque alcanzaron niveles de actividad similares a éste control después de la inducción (cepas 113A, 121A, 725A, 8055RM, 8200RM, 8273RM, 8491RM, 8546RM y 8631RM). El otro grupo está representado por cepas cuyo nivel basal de  $\beta$ -galactosidasa es inferior a la cepa control de *E. coli*, pero después de la inducción exhiben una actividad enzimática similar al control (cepas 37A, 719A, 739A, 752A, 758A, 8194RM, 8336RM, 8455RM y 8848RM). Una excepción fue la cepa 723A que mostró un nivel basal e inducido similar a *E. coli*, mientras que la cepa 120A mostró actividad inducida 28 veces inferior a *E. coli*. Por otra parte, todas las cepas fermentadoras rápidas analizadas de ambos brotes presentaron actividad  $\beta$ -galactosidasa, basal e inducida, superior a la cepa control *S. sonnei* ATCC25931, **Tabla 3**, excepto la cepa 120A.

**Tabla 4:** Actividad enzima  $\beta$ -galactosidasa de las cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas de lactosa.

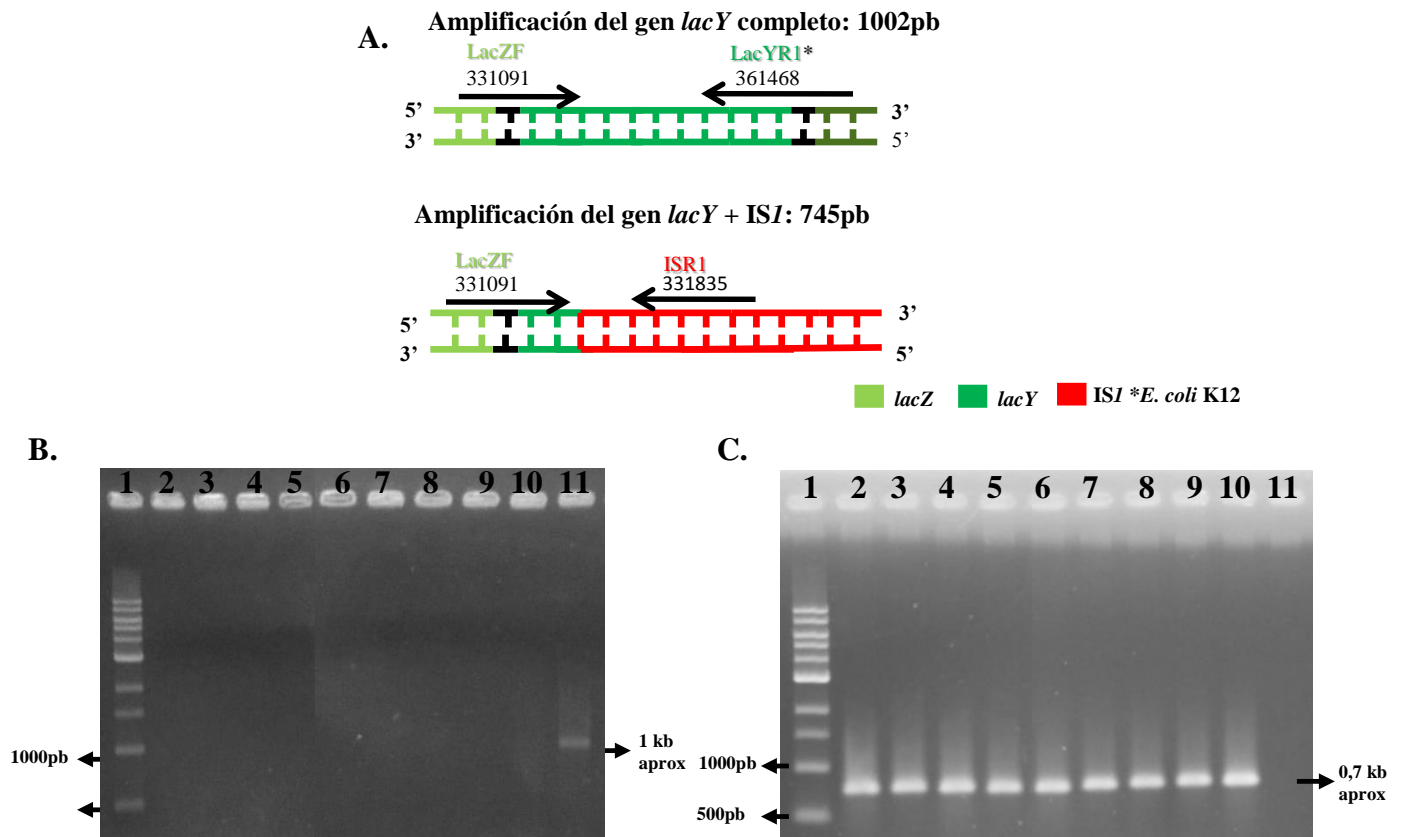
Cepa	Actividad $\beta$ -galactosidasa (U/mg de proteína)			
	Sin Inducir		Inducida	
<b>37A</b>	13,48	$\pm 1,2$	8506,24	$\pm 369,05$
<b>719A</b>	13,7	$\pm 2,6$	5603,78	$\pm 602,99$
<b>739A</b>	15,11	$\pm 4,93$	8553,35	$\pm 1021,21$
<b>752A</b>	18,15	$\pm 2,38$	8780,55	$\pm 150589$
<b>758A</b>	3,42	$\pm 0,26$	3522,92	$\pm 561,73$
<b>8194RM</b>	6,05	$\pm 1,92$	6899,83	$\pm 976,19$
<b>8336RM</b>	14,31	$\pm 2,09$	9369,87	$\pm 1201,24$
<b>8455RM</b>	4,13	$\pm 0,5$	10945,45	$\pm 348,5$
<b>8848RM</b>	1,04	$\pm 0,94$	8348,1	$\pm 360,93$
<i>S. sonnei</i> ATCC 25931	0	0	6807,23	$\pm 286,49$
<b>113</b>	354,32	$\pm 45,37$	8587,96	$\pm 360,1$
<b>121A</b>	7225,59	$\pm 116,45$	6235,72	$\pm 990,17$
<b>723A</b>	113,07	$\pm 24,59$	7954,7	$\pm 83,11$
<b>725A</b>	4237,79	$\pm 501,47$	7273,37	$\pm 736,13$
<b>8055RM</b>	1127,9	$\pm 76,88$	5551,85	$\pm 657,22$
<b>8200RM</b>	1517,5	$\pm 190,75$	5077,68	$\pm 770,1$
<b>8273RM</b>	5012,74	$\pm 49,59$	8129,2	$\pm 626,39$
<b>8491RM</b>	3699,2	$\pm 278,06$	7435,83	$\pm 973,59$
<b>8546RM</b>	756,03	$\pm 21,14$	1953,24	$\pm 299,4$
<b>8631RM</b>	2569,54	$\pm 243,7$	13067,99	$\pm 1305,95$
<i>E. coli</i> ATCC 25922	101,79	$\pm 5,05$	7882,55	$\pm 548,94$
<b>120A</b>	9,76	$\pm 5$	282,74	$\pm 2,98$

### 7.3 Análisis de la integridad del gen *lacY* en cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas de lactosa aisladas del brote de Antofagasta y la Región Metropolitana

Se analizó la integridad del gen *lacY* para confirmar que la organización de los genes estructurales del operón *lac* de las cepas aisladas de los brotes es similar a la organización de las dos cepas de *S. sonnei* secuenciadas (Ss046 y 53G).

Las 20 cepas de *S. sonnei* representativas de ambos brotes y el control de *S. sonnei* ATCC 25931, no presentaron amplificación del gen que codifica la lactosa permeasa **Figura 4, B**. Así mismo, se obtuvo un producto de amplificación de 745 pb, conteniendo la región de 270 pb del gen *lacY*, más 448 pb correspondientes a la IS1, **Figura 4, C**.





**Figura 4.** Análisis de la integridad del gen *lacY* en cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas de lactosa. (A) Diseño de los partidores para la detección del gen *lacY* completo y el gen *lacY* + *ISI*. (B) Productos de PCR para la detección del gen *lacY* en cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas de lactosa representativas de ambos brotes. (C) Productos de PCR para la detección del gen *lacY* + *ISI* en cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas de lactosa representativas de ambos brotes. Carril 1: marcador de tamaño molecular 1 kb (New England Biolabs®), carril 2-5: cepas de Antofagasta (37A, 120A, 719A, 725A, respectivamente); carril 6-9: cepas de la Región Metropolitana (8055RM, 8273RM, 8336RM, 8491RM, respectivamente); carril 10: *S. sonnei* ATCC 25931; carril 11: *E. coli* ATCC 25922.

El amplicón correspondiente al fragmento del gen *lacY*, fue secuenciado en algunas cepas fermentadoras rápidas de lactosa, representativas de ambos brotes (37A, 723A, 8336RM y 8273RM). En todas ellas, se observó la presencia de la región 5' del gen y la inserción del elemento *ISI*, por alineamiento con la secuencia de *lacY* de *S. sonnei* Ss046 (CP00039). La región *LacY* de las cepas de Antofagasta tiene un 99,5% de homología con la región *LacY* de *S. sonnei* Ss046, por la sustitución aminoacídica C178S en la *ISI*, mientras que las cepas de la Región Metropolitana mostraron una homología del 99,1%, por las sustituciones M86T y C178S en la *ISI*.

Además, sólo con el propósito de confirmar la ausencia del extremo 3' del gen *lacY*, se analizaron *in silico* los genomas de las cepas de *S. sonnei* 046 y 53G, no encontrándose ninguna región homóloga al extremo 3' del gen.

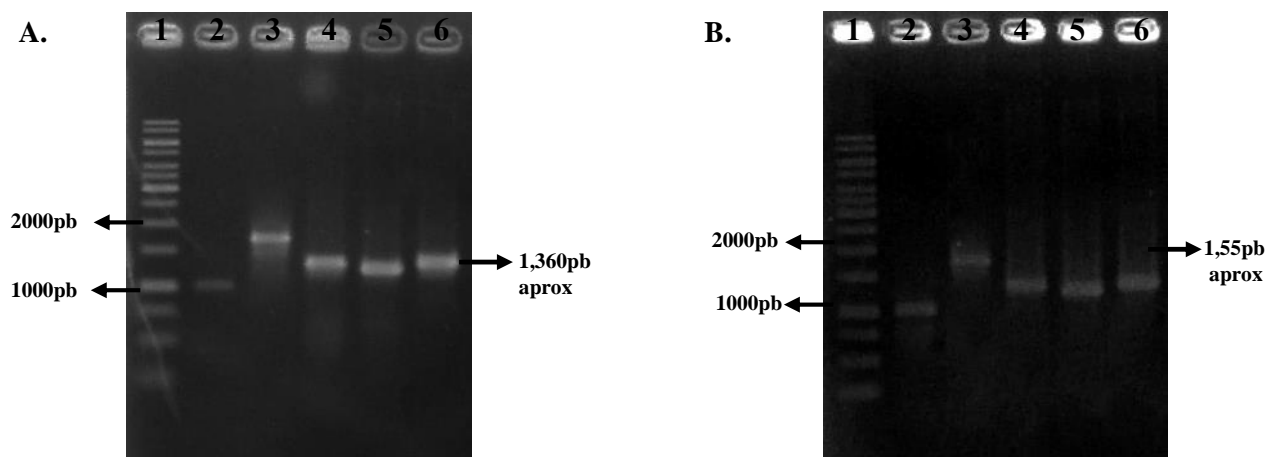
#### **7.4 Determinación de la participación de los sistemas transportadores de maltosa y arabinosa en la incorporación de lactosa**

##### **7.4.1 Análisis de secuencia de los genes del sistema transportador de maltosa y arabinosa de las cepas 37A y 8273RM**

Se analizaron las secuencias de los genes del sistema transportador de maltosa y arabinosa con el objetivo de identificar mutaciones que amplíen el rango de sustrato y permitan la incorporación de lactosa.

###### **7.4.1.1 Sistema transportador de maltosa**

La amplificación por PCR de los genes del sistema transportador de maltosa *malG*, *malF*, *malE*, *malK* y *lamB*, en las cepas fermentadoras rápidas de lactosa 37A y 8273RM, reveló fragmentos de 1.017, 1.760, 1.331, 1.244 y 1360 pb, respectivamente, que coinciden con los tamaños esperados para estos genes, **Figura 5**. Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas, se realizó el alineamiento de cada una de las secuencias con la base de datos del NCBI, utilizando el programa BLAST, se confirmó la identidad de los genes del sistema transportador de maltosa en las cepas fermentadoras rápidas.



**Figura 5:** Productos de PCR para la detección de los genes del sistema transportador de maltosa (A) Ceba A37 (B) Ceba RM8273. Carril 1: marcador de tamaño molecular 1 kb (Fermentas®), carril 2: *malG*, carril 3: *malF*, carril 4: *malE*, carril 5: *malK*, carril 6: *lamB*.

Al comparar las secuencias de aminoácidos deducida de los genes *lamB*, *malE* y *malG*, de las cepas fermentadoras rápidas en estudio con las secuencias de las cepas Ss046 y *S. sonnei* ATCC 25931, se observó un 100% de identidad. En tanto, el grado de identidad de las secuencias aminoacídicas de *malF*<sup>37A</sup> y *malF*<sup>8273RM</sup> fue del 100% con la cepa Ss046 y del 99,8% con la cepa *S. sonnei* ATCC 25931 por la sustitución G409D, **Tabla 5**.

Por otra parte, el análisis de la secuencia aminoacídica deducida de *malK* de la cepa aislada del brote de Antofagasta (37A), reveló un 99,7% de identidad con la cepa *S. sonnei* ATCC 25931 y un 99,5% con la cepa Ss046 por las sustituciones Q32P y Q82P, y P231A, respectivamente. La cepa aislada de la RM (8273RM) presentó un porcentaje de identidad del 100% con la cepa Ss046 y del 99,7% con la cepa *S. sonnei* ATCC 25931 por la sustitución aminoacídica P231A, **Tabla 5**.

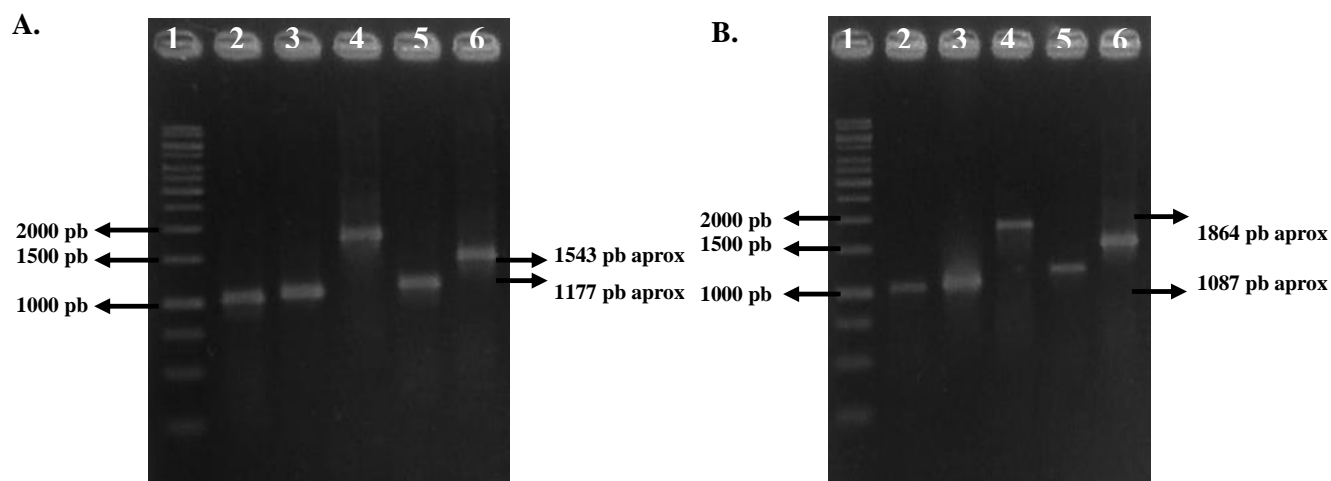
**Tabla 5.** Cambios aminoacídicos de las proteínas codificadas por los genes *malG*, *malF*, *malE*, *malK* y *lamB* del sistema transportador de maltosa de las cepas 37A y 8273RM respecto de las cepas Ss046 y *S. sonnei* ATCC 25931.

	Ss046					<i>S. sonnei</i> ATCC 25931				
	<i>lamB</i>	<i>malE</i>	<i>malF</i>	<i>malG</i>	<i>malK</i>	<i>lamB</i>	<i>malE</i>	<i>malF</i>	<i>malG</i>	<i>malK</i>
<b>37A</b>	-	-	-	-	Q82P	-	-	G409D	-	Q82P P231A
<b>8273RM</b>	-	-	-	-	-	-	-	G409D	-	P231A

- = indica que no existen diferencias aminoacídicas.

### 7.4.1.2 Sistema transportador de arabinosa

Se amplificaron por PCR los genes *araC*, *araH*, *araG*, *araF* y *araE* de la cepa 37A, **Figura 6A**, y de la cepa 8273RM, **Figura 6B**, cuyos tamaños de amplicones fueron compatibles con los esperados: 1040, 1087, 1864, 1177 y 1543 pb, respectivamente. Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas, se realizó el alineamiento de todas las secuencias con la base de datos del NCBI, utilizando el programa BLAST, confirmó que las cepas analizadas presentan los genes del sistema transportador de arabinosa.



**Figura 6:** Productos de PCR para la detección de los genes del sistema transportador de arabinosa (A) Cepa A37 (B) Cepa RM8273. Carril 1: marcador de tamaño molecular 1 kb (Fermentas®), carril 2: *araC*, carril 3: *araH*, carril 4: *araG*, carril 5: *araF*, carril 6: *araE*.

Al comparar las secuencias de aminoácidos deducida de los genes *araC*, *E*, *F*, *G* y *H* de la cepa 37A con la cepa Ss046 y *S. sonnei* ATCC 25931 se observó un porcentaje de identidad del 100%, excepto en la secuencia *araH* con la cepa *S. sonnei* ATCC 25931, cuyo porcentaje de identidad es del 99,8% por el cambio aminoacídico T328I. Por su parte, el análisis de las secuencias de aminoácidos deducidas de los mismos genes de la cepa 8273RM, reveló un 100% de identidad sólo con del gen *araG*; la identidad con los otros genes varió entre un 99,0 y un 99,6% por la presencia de 1 a 3 cambios aminoacídicos, **Tabla 6**.

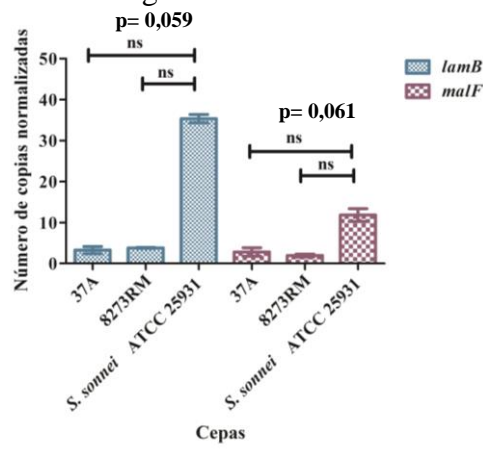
**Tabla 6.** Cambios aminoacídicos de las proteínas codificadas por los genes *araC*, *araE*, *araF*, *araG* y *araH* del sistema transportador de arabinosa de las cepas 37A y 8273RM respecto de las cepas Ss046 y *S. sonnei* ATCC 25931.

	Ss046					<i>S. sonnei</i> ATCC 25931				
	<i>araC</i>	<i>araE</i>	<i>araF</i>	<i>araG</i>	<i>araH</i>	<i>araC</i>	<i>araE</i>	<i>araF</i>	<i>araG</i>	<i>araH</i>
<b>37A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T328I
<b>8273RM</b>	E3G A4S D7Y	V189D V315E	V310G G328A	-	V316M	E3G A4S D7Y	V189D V315E	V310G G328A	-	V316M

- = indica que no existen diferencias aminoacídicas.

#### 7.4.2 Análisis de los niveles de expresión de *lamB* y *malF* en una cepa de *S. sonnei* fermentadora rápida de lactosa representativa de cada brote mediante qPCR

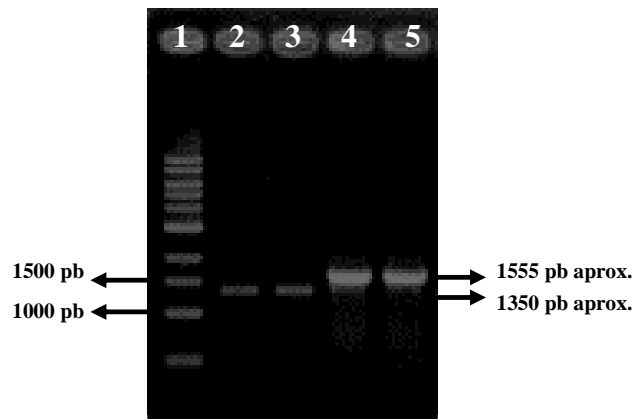
Se compararon los niveles de expresión de los genes *lamB* y *malF* silvestres de dos cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas de lactosa respecto a los niveles de expresión de una cepa control de fermentación tardía. Los niveles de expresión de ambos genes en las cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas de lactosa analizadas, 37A y 8273RM, fueron menores a la cepa control de *S. sonnei* ATCC 25931; sin embargo, no hubo significancia estadística al someter los datos a la prueba de Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ ), **Figura 7**. Sin embargo, los valores de p obtenidos tanto para *lamB* como para *malF* (0,059 y 0,06, respectivamente) son cercanos al valor de significancia estadística ( $p \leq 0,05$ ), sugiriendo que en un mayor número de ensayos se podrían observar diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de ambos genes.



**Figura 7:** Análisis de los niveles de expresión de los genes *lamB* y *malF* de dos cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas de lactosa (37A y 8273RM) y una cepa control fermentadora tardía (*S. sonnei* ATCC 25931). ns= no significativo.

### 7.4.3 Expresión heteróloga de los genes *lamB*<sup>37A</sup>, *lamB*<sup>8273RM</sup>, *malF*<sup>37A</sup> y *malF*<sup>8273RM</sup> en la cepa control de *S. sonnei* ATCC 25931

Se evaluó el papel funcional de los genes *lamB* y *malF* del sistema transportador de maltosa en la incorporación de lactosa, y su correlación con la fermentación en cepas de *S. sonnei* aisladas de los brotes mediante expresión heteróloga. Para ello, se amplificó un fragmento de 1350 pb y 1555 pb correspondientes a la región codificante de los genes *lamB* y *malF*, respectivamente de las cepas 37A y 8273RM, **Figura 8**. Los amplicones fueron clonados directamente en el vector pBAD24. Los vectores recombinantes (*plamB*<sup>37A</sup>, *plamB*<sup>8273RM</sup>, *pmalF*<sup>37A</sup> y *pmalF*<sup>8273RM</sup>) fueron utilizados para transformar las cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$ , y posteriormente, la cepa de *S. sonnei* ATCC 25931 fermentadora tardía de la lactosa.

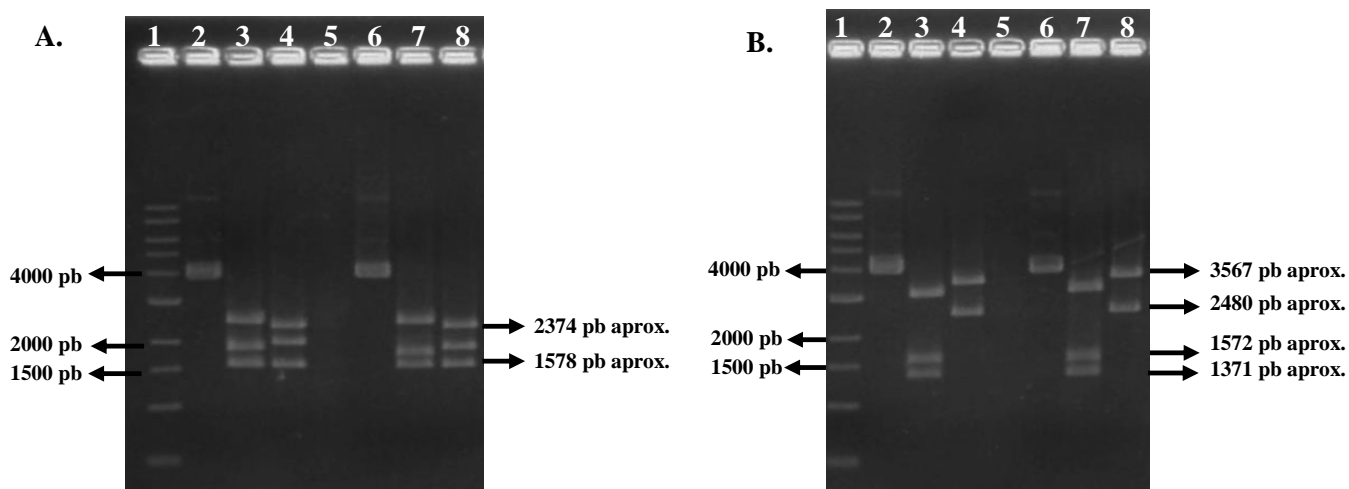


**Figura 8.** PCR de los fragmentos de DNA utilizados en el constructo *lamB*<sup>37A</sup> y *lamB*<sup>8273RM</sup> y *malF*<sup>37A</sup> y *malF*<sup>8273RM</sup> en pBAD24. Carril 1: marcador de tamaño 1Kb (New England Biolabs®), carril 2: *lamB*<sup>37A</sup>, carril 3: *lamB*<sup>8273RM</sup>, carril 4: *malF*<sup>37A</sup>, carril 5: *malF*<sup>8273RM</sup>.

Dado que las células de *S. sonnei* ATCC 25931 presentan otros plasmidios con sitios de restricción para diferentes enzimas, inicialmente los vectores *plamB*<sup>37A</sup>, *plamB*<sup>8273RM</sup>, *pmalF*<sup>37A</sup> y *pmalF*<sup>8273RM</sup> fueron recuperados de cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  y verificados mediante RFLP.

El análisis por RFLP de los clones positivos de *E. coli* DH5 $\alpha$  reveló que el tamaño del DNA plasmidial fue cercano a los 5,8 kb, lo cual es compatible con el valor esperado para los vectores recombinantes *plamB*<sup>37A</sup> y *plamB*<sup>8273RM</sup>. La integración de los genes, se verificó por el cambio del tamaño plasmidial y los patrones de restricción esperados, una vez digerido con la enzima *Ava*I presentando tres fragmentos de 2484, 1786 y 1572 pb, y con las enzimas *Bgl*II y *Eco*RV, con tres fragmentos de 2374, 1890 y 1578 pb, **Figura 9A**.

En el caso de los constructos  $\text{pmalF}^{37A}$  y  $\text{pmalF}^{8273RM}$ , el análisis reveló que el tamaño del DNA plasmidial fue cercano a los 6,0 kb, valor compatible con el esperado, para los vectores recombinantes  $\text{malF} + \text{pBAD24}$ . La integración de los genes se comprobó por un cambio en el tamaño plasmidial y los patrones de restricción esperados, una vez digerido con la enzima *AvaI*, presentando tres fragmentos de 3104, 1572 y 1371 pb, y fragmentos de 3567 y 2480 pb con las enzimas *EcoRV* y *HindIII*, **Figura 9B**.

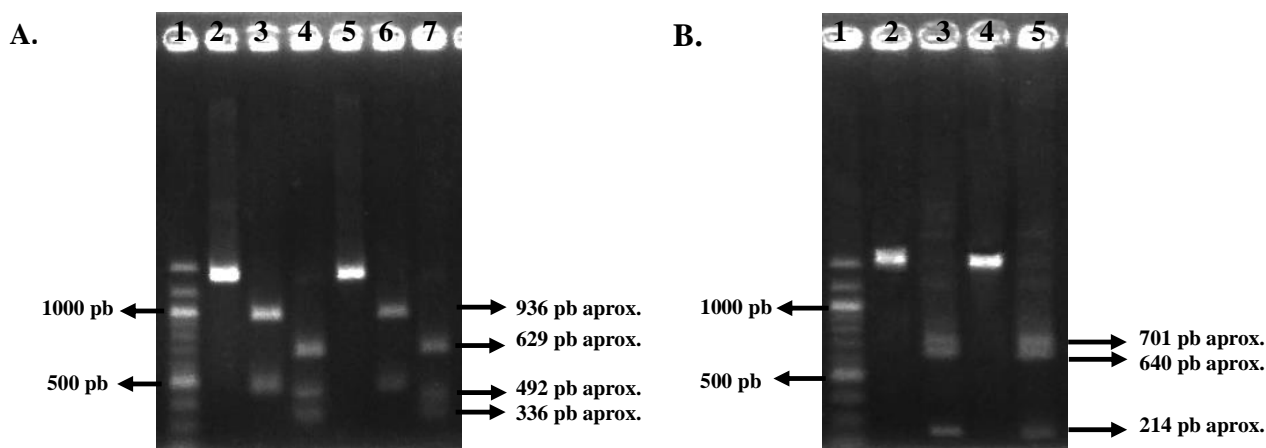


**Figura 9:** Análisis de restricción del DNA de las colonias transformantes de DH5 $\alpha$  con los vectores recombinantes  $\text{plamB}^{37A}$ ,  $\text{plamB}^{8273RM}$ ,  $\text{pmalF}^{37A}$  y  $\text{pmalF}^{8273RM}$ . (A) Constructo  $\text{SAlamB}^{37A}$  y  $\text{SAlamB}^{8273RM}$ . Carril 1: marcador de tamaño molecular 1 kb (New England Biolabs®), carril 2: *lamB* sin digerir cepa A37, carril 3: Digestión *AvaI*, carril 4: digestión *BglI* y *EcoRV*, carril:5 vacío, carril 6: *lamB* cepa Ss8273 sin digerir, carril 7: Digestión *AvaI*, carril 8: digestión *BglI* y *EcoRV*. (B) Constructo  $\text{pBAD24-malF}$ . Carril 1: marcador de tamaño molecular 1 kb (New England Biolabs®), carril 2: *malF* sin digerir cepa A37, carril 3: Digestión *AvaI*, carril 4: digestión *EcoRV* y *HindIII*, carril 5 vacío, carril 6: *malF* sin digerir cepa A37, carril 7: Digestión *AvaI*, carril 8: digestión *EcoRV* y *HindIII*.

Una vez confirmados los constructos, el DNA plasmidial aislado de las células de *E. coli* DH5 $\alpha$  fue incorporado a las cepas de *S. sonnei* ATCC 25931 por transformación. Los transformantes fueron verificados mediante RFLP de productos de PCR, los cuales fueron obtenidos empleando partidores específicos del vector.

Se seleccionaron dos clones para cada cepa y gen ( $\text{SAlamB}^{37A}$  y  $\text{SAlamB}^{8273RM}$  y  $\text{SAmalF}^{37A}$  y  $\text{SAmalF}^{8273RM}$ ) que presentaran un producto de PCR cercano a 1,4 kb para el gen *lamB* y a 1,6 kb para *malF*. El análisis de restricción de los productos de  $\text{SAlamB}^{37A}$  y  $\text{SAlamB}^{8273RM}$  digeridos con la enzima *NdeI* reveló fragmentos de 936 y 498 pb aproximadamente y fragmentos de 632, 492 y 336 pb aproximadamente con *AvaI* y *EcoRV*, **Figura 10A**. Por su

parte, el análisis para SAmalF37A y 8273RM reveló fragmentos de 701, 640 y 214 pb aproximadamente con las enzimas *AvaI* y *AvaII*, **Figura 10B**.



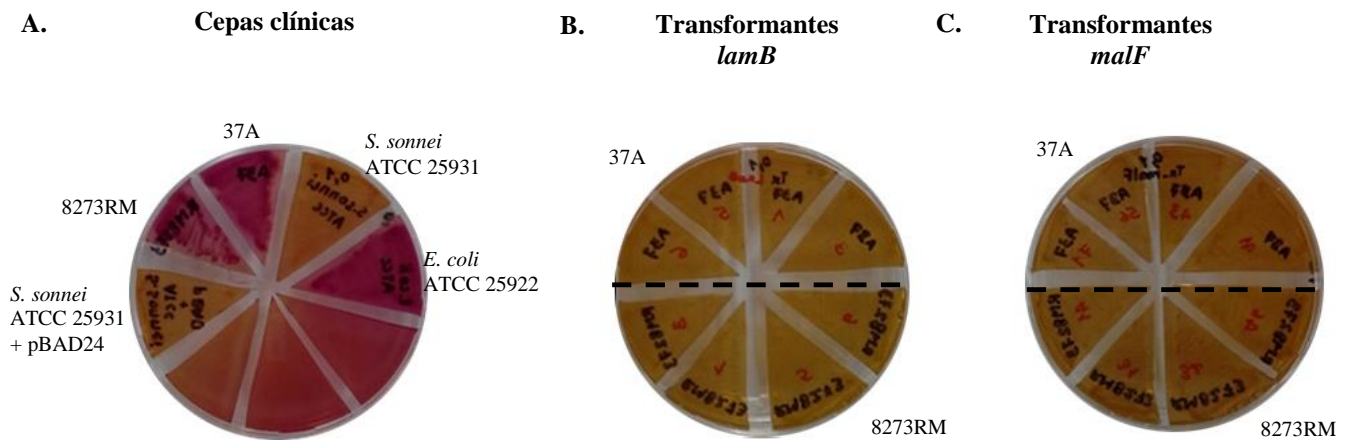
**Figura 10:** Análisis de restricción del DNA de las colonias transformantes de *S. sonnei* ATCC 25931 con los vectores recombinantes plamB<sup>37A</sup>, plamB<sup>8273RM</sup>, pmalF<sup>37A</sup> y pmalF<sup>8273RM</sup>. (A) Constructo pBAD24-*lamB* Carril 1: marcador de tamaño molecular 100bp (New England Biolabs®), carril 2: *lamB* sin digerir cepa A37, carril 3: Digestión *NdeI*, carril 4: digestión *AvaI* y *EcoRV*, carril 5: *lamB* sin digerir cepa RM8273, carril 6: Digestión *NdeI*, carril 7: digestión *AvaI* y *EcoRV* (B) Constructo pBAD24-*malF*. Carril 1: marcador de tamaño molecular 100bp (New England Biolabs®), carril 2: *malF* sin digerir cepa A37, carril 3: Digestión *AvaI* y *AvaII*, carril 4: *malF* sin digerir cepa RM8273, carril 5: digestión *AvaI* y *AvaII*.

#### 7.4.3.1 Inducción de la expresión de los genes *lamB* y *malF* de una cepa de *S. sonnei* fermentadora rápida de lactosa representativa de cada brote en cepas de *S. sonnei* ATCC 25931

Con el objetivo de evaluar la participación de los genes *lamB* y *malF* de dos cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas, en la incorporación de lactosa y su correlación con el fenotipo de fermentación rápida, se indujo su expresión en cepas de *S. sonnei* fermentadora tardía control.

La inducción de la expresión de los vectores recombinantes plamB<sup>37A</sup>, plamB<sup>8273RM</sup>, pmalF<sup>37A</sup> y pmalF<sup>8273RM</sup>, se realizó en placas de agar Mac Conkey suplementadas con arabinosa al 0,1%. Se analizaron 4 transformantes para cada uno de los genes (SAmalF37A, SAmalF8273RM, SAlamB37A y SAlamB8273RM), no observándose un cambio en el fenotipo de fermentación de la lactosa en la cepa *S. sonnei* ATCC 25931, **Figura 11**.

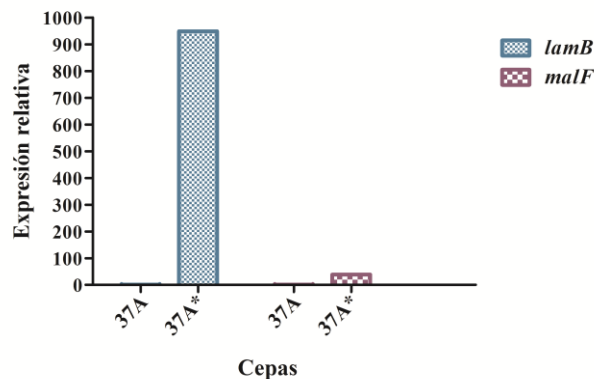




**Figura 11.** Inducción de la expresión de los genes *lamB* y *malF* de cepas fermentadoras rápidas de lactosa en *S. sonnei* ATCC 25931 en placas de agar Mac Conkey con arabinosa al 0,1%. (A) Cepas clínicas 37A, 8273RM, cepa *S. sonnei* ATCC 25931 y *E. coli* ATCC 25922 y cepa *S. sonnei* ATCC 25931 con pBAD24 solo (B) Transformantes de SAMalF37A y SAMalF8273RM. (C) Transformantes de SALamB37A y SALamB8273RM.

#### 7.4.3.2 Determinación de la expresión de los genes *lamB*<sup>37A</sup> y *malF*<sup>37A</sup> de una cepa de *S. sonnei* fermentadora rápida de lactosa representativa de cada brote en cepas de *S. sonnei* ATCC 25931 mediante qPCR

Considerando el resultado negativo en la inducción de la expresión de los genes *lamB* y *malF* en células de *S. sonnei* ATCC 25931, se confirmó la expresión a nivel transcripcional de los genes *lamB*<sup>37A</sup> y *malF*<sup>37A</sup> clonados. Se observó un aumento promedio de 948,8 veces de la expresión relativa del gen *lamB*<sup>37A</sup> y 38,6 veces del gen *malF*<sup>37A</sup> en las cepas inducidas, respecto de las cepas no inducidas, **Figura 12**.



**Figura 12.** Expresión relativa de los genes *lamB* y *malF* de una cepa fermentadora rápida de lactosa, clonados en el vector pBAD24 y transformado en la cepa *S. sonnei* ATCC 25931. \*Inducción con arabinosa.

## 8. DISCUSIÓN

Las cepas de *S. sonnei* aisladas de gastroenteritis normalmente son lactosa negativo entre las 18-24 h de incubación<sup>3</sup>; sin embargo, en dos brotes de diarrea: Antofagasta y la Región Metropolitana, verano 2008-2009, el 51,8% de 108 cepas estudiadas presentaron fermentación rápida de lactosa (<24h).

Este hallazgo podría generar un problema diagnóstico de consideración, debido a que la fermentación de la lactosa, no solo es una propiedad bioquímica ampliamente utilizada en laboratorio, sino que además representa la primera prueba diagnóstica para diferenciar las cepas de *Shigella* spp. de las cepas de *E. coli*, dado que las cepas de *Shigella* no fermentan la lactosa, con excepción de *S. dysenteriae* tipo 1 y *S. sonnei* que son fermentadores tardíos<sup>2-4</sup>. Una identificación inadecuada podría derivar en la administración incorrecta de antibióticos, una situación preocupante, teniendo en cuenta que tanto *Shigella* spp. como ECEI (*E. coli* enteroinvasiva) constituyen dos de las principales causas de diarrea en el mundo. Adicionalmente, el rápido desarrollo de resistencia a los antimicrobianos es uno de los mayores obstáculos para el control de la shigellosis<sup>6,12,13</sup>.

La fermentación rápida de lactosa en *S. sonnei* ha sido reportada previamente por Cook *et al.* en 1951<sup>15</sup>; sin embargo, los autores no caracterizaron las cepas que presentaron este fenotipo. En este contexto, nuestro estudio incluyó la caracterización de las cepas y el análisis de la estabilidad del fenotipo de fermentación rápida de la lactosa.

Las colonias típicas de *S. sonnei* en agar Mac Conkey, después de 18-24 h de incubación, son pequeñas a menudo de 2-3 mm de diámetro, circulares, convexas, con superficie lisa y brillante, bordes definidos y transparentes (lactosa negativa)<sup>1</sup>. Por el contrario, las colonias fermentadoras rápidas, observadas en este estudio, son en general, de mayor tamaño (diámetro 8-10 mm), planas, con superficie mate, bordes irregulares y de color rosado (lactosa positiva).

Al respecto, Prats *et al.* (1998) afirman que cuando se trabaja con medios con lactosa como sustrato diferencial (Mac Conkey, Hektoen y SS), las colonias de *S. sonnei* a las 24-48 h de

incubación pueden aparecer como discretamente lactosa positiva, las cuales pueden presentar dos tipos morfológicos (medianas, prominentes, lisas, de borde regular o grandes aplanadas, estriadas, con bordes irregulares) debido a la segregación espontánea del plásmido pINV <sup>46</sup>.

En nuestra investigación, se realizaron cultivos en medios selectivos y diferenciales para el aislamiento de patógenos entéricos Gram negativo (XLD, Hektoen, SS y EMB) en los cuales se observó que las características de las colonias de las cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas son similares a las descritas en agar Mac Conkey y distintas de la cepa fermentadora tardía (datos no mostrados). En esta Tesis no se realizaron estudios orientados a determinar la presencia del plásmido pINV en las cepas fermentadoras rápidas de la lactosa.

Por otro lado, mediante experimentos de cultivos seriados, el fenotipo de fermentación rápida se conservó a través de los trasposos consecutivos, para cada una de las cepas analizadas. Estos resultados indican que el fenotipo de fermentación es estable, lo cual sugiere una base genética.

Dado que en las bacterias entéricas, los productos finales característicos del metabolismo de azúcares son ácidos (ejemplo, ácido acético, succínico y láctico), es posible estudiar la fermentación de la lactosa midiendo la caída del pH <sup>47</sup>. En nuestro estudio, no se observaron diferencias entre las curvas de pH de las cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas de lactosa y la cepa fermentadora tardía control (*S. sonnei* ATCC 25931), tanto en caldo Mac Conkey, como en medio mínimo M9. La cepa control de fermentación rápida (*E. coli* ATCC 25922) presentó una disminución drástica del pH como se esperaba.

El comportamiento esperado de las cepas fermentadoras rápidas, respecto del cambio de pH, era la disminución del pH de forma intermedia a las cepas control *S. sonnei* ATCC 25931 y *E. coli* ATCC 25922 o bien similar a *E. coli* ATCC 25922. Estos resultados, no concuerdan con el comportamiento de las cepas fermentadoras rápidas de lactosa en medio sólido Mac Conkey, donde las colonias se tornan rosadas por acidificación del medio en 24 h. La diferencia de comportamiento en medio sólido Mac Conkey y medios líquidos Mac Conkey y M9 de las cepas analizadas, podría estar relacionado con el hecho que, en un medio sólido, una colonia

representa una alta cantidad de células (entre  $1 \times 10^{11}$  y  $1 \times 10^{12}$  bacilos Gram negativo) dentro de un espacio reducido, lo cual determina la acumulación de productos ácidos de forma localizada, mientras que en un cultivo en medio líquido, por un lado no se alcanza una densidad celular equivalente y los productos ácidos eventualmente no alcanzan una alta concentración.

Desde el punto de vista molecular, en *E. coli* se ha descrito que la lactosa ingresa a la célula a través de la proteína de membrana lactosa permeasa, la cual está codificada por el gen *lacY*. Una vez en el interior de la célula, el disacárido es hidrolizado por la enzima  $\beta$ -galactosidasa, codificada por el gen *lacZ*<sup>16,17</sup>. Considerando que en *S. sonnei* el gen *lacY* se encuentra interrumpido por una secuencia de inserción<sup>2</sup>, la fermentación rápida de la lactosa en las cepas de *S. sonnei* de ambos brotes podría ser explicada por: la sobreexpresión y/o mayor actividad  $\beta$ -galactosidasa, lo que podría compensar un reducido ingreso de moléculas de lactosa aún por un ineficiente mecanismo de incorporación del azúcar; alternatively, por la presencia y expresión de un *lacY* intacto y funcional; o por la existencia de un sistema transportador alternativo con afinidad a la lactosa en las cepas fermentadoras rápidas de este azúcar.

Respecto a la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa, se realizó un análisis cualitativo mediante la galería API ZYM®, el cual reveló la actividad de dicha enzima en todas las cepas fermentadoras rápidas de lactosa, un resultado esperado teniendo en cuenta los antecedentes en otras cepas de *S. sonnei*<sup>2,21</sup> y que la técnica emplea como sustrato el ONPG, un compuesto que ingresa al interior de la célula bacteriana sin requerir la acción de la lactosa permeasa<sup>41</sup>.

Por otra parte, el análisis cuantitativo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa reveló dos grupos entre las cepas analizadas, un grupo que presenta actividad enzimática basal (sin inducir) alta, respecto de las cepas control (*E. coli* ATCC 25922 y *S. sonnei* ATCC 25931), pero que alcanzan un nivel de inducción bajo en comparación a *E. coli* ATCC 25922, **Tabla 4**; mientras que el otro grupo, muestra un nivel enzimático basal bajo, pero con niveles de inducción superior al control. Estos resultados son similares a los descritos por Ito *et al.* (1991) quienes también observaron heterogeneidad en la actividad  $\beta$ -galactosidasa en las cepas de *S. sonnei* analizadas, presentando algunas de ellas un actividad comparable con las cepas de *E. coli* control<sup>21</sup>.

Si la actividad  $\beta$ -galactosidasa basal alta y/o el nivel de inducción superior de algunas cepas está relacionada con el fenotipo de fermentación rápida de la lactosa, es una posibilidad que debería demostrarse experimentalmente. Sin embargo, se debe destacar que no todas las cepas cumplen con estas dos características, por ejemplo la cepa fermentadora rápida 120A, exhibe un nivel de actividad enzimática basal y capacidad de inducción inferior a la cepa control de *E. coli*, lo que nuevamente da cuenta de la heterogeneidad descrita por Ito *et al.* (1991) <sup>21</sup>.

En cuanto a la presencia de un gen *lacY* intacto y funcional en las cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas de lactosa, nuestros resultados mostraron la ausencia del amplicón de 1002 pb compatible con la presencia de un *lacY* intacto. Por el contrario, en su lugar se generó un fragmento de 745 pb, el cual corresponde al extremo 5' de *lacY* interrumpido por una *IS1*, como se ha descrito en las cepas de *S. sonnei* secuenciadas (Ss046 y 53G) <sup>2</sup>. Lo anterior sugiere la presencia de una lactosa permeasa incompleta, aunque no se puede descartar la posibilidad de que la proteína parcial (región amino-terminal de la permeasa) mantenga parte de su funcionalidad. Alternativamente, también existe la posibilidad que la región del gen que codifica para el extremo carboxi-terminal de la permeasa se encuentre en otro locus génico en estas cepas, de tal forma que ambas regiones proteicas se combinen, restituyéndose la actividad permeasa <sup>50</sup>.

Con relación al primer supuesto, se ha descrito ampliamente que de los 417 aminoácidos que conforman la lactosa permeasa en *E. coli*, sólo seis residuos ubicados en las hélices IV, V, VIII, IX y X son absolutamente indispensables para el transporte de la lactosa, Glu126, Arg144, Glu269, Arg302 y His322, y Glu325, respectivamente <sup>48,49</sup>. Sin embargo, en esta Tesis, el análisis de la secuencia aminoacídica deducida codificada por el gen *lacY* de las cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas representativas de ambos brotes, reveló la presencia de sólo los primeros 99 aminoácidos del extremo amino terminal de la proteína.

Dado que no hay antecedentes de un gen *lacY* en *Shigella* spp. (en *S. sonnei* y *S. dysenteriae* es un pseudogen, mientras que en *S. flexneri* y *S. boyddi* el gen está ausente), se realizó un modelamiento comparativo de la estructura tridimensional del LacY interrumpido de las cepas fermentadoras rápidas de lactosa, con la secuencia de LacY de *E. coli*, empleando programa

Modeller 9.14. Este modelamiento reveló que la región de 99 aminoácidos que conforman la porción del LacY de las cepas de *S. sonnei* en estudio, no podría tener función parcial como transportador galactosídico.

La segunda posibilidad, plantea que la secuencia del extremo 3' de *lacY* podría encontrarse en otra posición dentro del genoma de *S. sonnei* y que la proteína se ensamble en la membrana y pueda transportar la lactosa al interior de la célula, tal como lo describió Wrubel *et al.* (1990). Éstos investigadores demostraron que la expresión simultánea de dos secuencias incompletas del gen *lacY* permite la reconstitución del transportador en la membrana citoplasmática exhibiendo características similares a la lactosa permeasa intacta en células de *E. coli* que no transportan lactosa<sup>50</sup>. Lamentablemente, hasta ahora no contamos con un genoma secuenciado de algunas de las cepas fermentadoras rápidas de lactosa, por lo que el análisis *in silico* permanece pendiente. Sin embargo, aun cuando las cepas de *S. sonnei* 046 y 53G son fermentadoras lentas de lactosa, se realizó en ellas la búsqueda *in silico* de dicha región de DNA en ambos genomas, no encontrándose secuencias homólogas. Este resultado, aunque no lo descarta definitivamente, hace menos probable la existencia de la región 3' de *lacY* en otro locus génico, particularmente si se considera la baja variabilidad genética que han demostrado tener diferentes cepas de *S. sonnei*<sup>21</sup>.

En conjunto, estos resultados evidencian la ausencia de una lactosa permeasa funcional en las cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas de lactosa aisladas de los brotes de Antofagasta y la Región Metropolitana. El hecho que las cepas en estudio presenten actividad  $\beta$ -galactosidasa, enzima necesaria para la hidrólisis de la lactosa y carezcan de la permeasa que permita su ingreso, sugiere la participación de otro u otros sistemas transportadores alternativos que expliquen la fermentación rápida de la lactosa.

Por lo tanto, una tercera alternativa para explicar la fermentación rápida de la lactosa, sería la presencia de mutaciones en uno o varios componentes de uno o varios transportadores galactosídicos, que modifiquen el rango de sustratos transportados y con ello permitan el ingreso de la lactosa, tal como se ha reportado previamente en *E. coli*<sup>25-27,37-39</sup>, en transportadores como la lactosa y melibiosa permeasa y los sistemas transportadores de maltosa y arabinosa.

En este sentido, Brooker *et al.* (1985) identificaron en *E. coli* 18 mutantes independientes, capaces de incorporar maltosa a través del transportador lactosa permeasa. La secuenciación del gen que codifica para este transportador en estas cepas, reveló que las alteraciones en la especificidad del sustrato son el resultado de sustituciones aminoacídicas simples dentro de la proteína, en la posición 177 o bien en la posición 236 <sup>25</sup>. Por otra parte, King *et al.* (1990) demostraron que la sustitución A177V en el gen *lacY*, amplía la especificidad del sustrato, permitiendo a la permeasa transportar no sólo maltosa sino que además sacarosa <sup>51</sup>. En tanto, Van Gelder *et al.* (2001) generaron dobles mutantes en las posiciones 109 y 118 del gen *lamB* del transportador de maltosa en células de *E. coli*, en las cuales se observó un transporte de sacarosa con una eficiencia cercana a la de maltosa, a través de la maltoporina <sup>26</sup>. Otro antecedente de cambios en la especificidad del sustrato, por mutaciones específicas en un transportador de azúcar, son las mutaciones independientes en los residuos 88, 91 y 182 de la melibiosa permeasa de *Enterobacter cloacae*, alteraciones que permiten un ingreso eficiente de maltosa en esta especie <sup>27</sup>.

Respecto a la participación del sistema transportador de maltosa en la incorporación de lactosa, Merino *et al.* (1997, 1998) identificaron dos mutaciones independientes en el gen *malF* que permiten un transporte eficiente de lactosa en células de *E. coli*. La primera de estas mutaciones se encuentra en la posición 99, en la tercera hélice transmembrana, no requiere la participación de la proteína MBP y exhibe actividad ATPasa constitutiva, mientras que la segunda mutación, se encuentra en la posición 334, requiere la presencia de la proteína MBP y de la actividad ATPasa. El hecho de que estos mutantes puedan transportar lactosa de forma específica indica que existen varias posibilidades de alterar la especificidad del sustrato modificando la estructura de los segmentos transmembrana <sup>37,38</sup>.

En cuanto a la posibilidad de que carbohidratos diferentes a la maltosa puedan difundir a través de LamB, Klebba *et al.* (1994), mediante mutagénesis sitio dirigida, demostraron que una delección de 26 nucleótidos ( $\Delta$ 379-405), elimina la especificidad de la proteína y la convierte en un canal no específico <sup>52</sup>. Por otra parte, se ha descrito que la maltoporina permite una entrada significativa de otros azúcares en ausencia de porinas y bajo condiciones limitadas de

carbohidratos, y que además el sitio de unión al azúcar tiene una débil, pero cuantificable afinidad por la glucosa y otros monosacáridos y disacáridos <sup>53</sup>.

En este contexto, se analizó la participación de los genes *lamB* y *malF* del sistema transportador de maltosa, en la incorporación de lactosa y su correlación con la fermentación rápida en cepas de *S. sonnei*. Para ello, se realizó un análisis de secuencia del gen *malF* de una cepa de *S. sonnei* fermentadora rápida de lactosa, representativa de cada brote. Los resultados no revelaron la presencia de las mutaciones previamente descritas por Merino *et al.* (1997, 1998), en las posiciones 99 y 334, las cuales correlacionan con un ingreso eficiente de lactosa en células de *E. coli*. Así mismo, no se observaron diferencias entre las secuencias aminoacídicas deducidas del gen *lamB* de las cepas 37A y 8273RM y la secuencia aminoacídica de las cepas control fermentadoras tardías de lactosa, *S. sonnei* Ss046 y *S. sonnei* ATCC 25931.

En el caso de la cepa aislada del brote de la Región Metropolitana, se encontró un 100% de homología entre las secuencias aminoacídicas deducidas de los genes *malE*, *malG* y *malK* y las secuencias aminoacídicas de las cepas control fermentadoras tardías de la lactosa, **Tabla 5**. En la cepa de *S. sonnei* aislada del brote de Antofagasta, sólo se observó el cambio Q82P en la proteína MalK, **Tabla 5**, la cual no ha sido reportada previamente y se desconoce su rol en el reconocimiento del sustrato del sistema transportador de maltosa; sin embargo, el hecho de que este gen pueda ser intercambiado con el gen *ugpC* (del sistema transportador Ugp), sin pérdida de la especificidad de los sustratos, sugiere que este componente no participaría en dicha función <sup>54</sup>.

Adicionalmente, dado que Messer *et al.* (1974) describieron mutaciones en el gen *araC* que permitían un transporte eficiente de lactosa vía sistema transportador de arabinosa en cepas de *E. coli*, se analizaron las secuencias de los genes que conforman este sistema *araC*, *araH*, *araG*, *araF* y *araE* en una cepa fermentadora rápida de lactosa representativa de cada brote. La cepa de *S. sonnei* aislada del brote de Antofagasta (37A) no presentó diferencias en la secuencia aminoacídica deducida de los genes analizados respecto a las cepas de referencia fermentadoras tardías de la lactosa.



Por el contrario, en la cepa 8273RM aislada del brote de la RM, se observaron varias mutaciones en los genes *araC*, *araE*, *araF* y *araH* respecto a las cepas de referencia de *S. sonnei* Ss046 y ATCC 25931, **Tabla 6**. Estos cambios no han sido descritos previamente y se desconoce su papel en el reconocimiento de sustratos, por lo que reviste de importancia un análisis desde el punto de vista funcional su posible participación en la internalización de la lactosa en las cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas de lactosa.

Si bien, las simulaciones por computadora no sustituyen a las pruebas funcionales, permiten plantear una aproximación complementaria de la participación del sistema transportador de arabinosa en la incorporación de lactosa en las cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas de lactosa, ya que proporcionan el detalle de la unión proteína-ligando a escala molecular y atómica. Se decidió entonces efectuar simulaciones teórico-computacionales a fin de estudiar los efectos de las mutaciones de interés <sup>55,56</sup>.

Como primer paso se buscaron en la base de datos Protein Data Bank®, las estructuras de las proteínas de interés <sup>56</sup>. Se reclutaron los códigos PDB 2ARC (perteneciente a AraC complejada con arabinosa) y 1ABE (perteneciente a AraF).

Las mutaciones registradas en AraC se sitúan en las posiciones 3, 4 y 7; sin embargo, la estructura 2ARC no presenta resueltas las posiciones de los residuos 1 a 6 (esto se debe a que los extremos proteicos, suelen presentar una gran movilidad lo que representa un impedimento técnico para la resolución de su estructura) por lo cual se modelará, por medio del programa Modeller 9.14, la disposición espacial de estos aminoácidos. Aun así, es importante notar que la cercanía de estas mutaciones al extremo amino terminal de la proteína sugiere que no tendrían efecto significativo en la conformación que la lactosa adopta en el centro activo de la proteína, dado que no afectan directamente el *core* estructural de la proteína.

No obstante, mediante el software AutoDock Vina se efectuará un *docking* o acoplamiento molecular entre AraC y la lactosa con el objetivo de estimar la energía de unión entre ambos y la orientación y conformación que la lactosa adopta en el centro activo de AraC <sup>56</sup>. Posteriormente, mediante software FoldX, se generarán las mutaciones E3G, A4S y D7Y

(encontradas en la cepa 8273RM) en la proteína AraC para realizar un *docking* de la proteína mutada y la lactosa, con el objetivo de estimar su efecto en la estructura y en la energía de unión entre ambos <sup>57</sup>. Posteriormente se compararán los resultados obtenidos entre la cepa silvestre y la mutante para establecer, si las mutaciones tienen efectos en la unión de la lactosa al regulador del sistema transportador de arabinosa.

Las mutaciones registradas en AraF se encuentran en las posiciones 310 y 315. La estructura PDB 1ABE no registra estos residuos resueltos, por lo que se procederá a modelar también esa fracción para luego realizar la técnica de *docking* con la lactosa y efectuar comparaciones entre los resultados de AraF silvestre y AraF mutante (V310G y V315E).

No se han encontrado estructuras cristalinas de las proteínas AraE y AraH de la especie de interés, por lo que no se puede conocer si las mutaciones encontradas facilitan la unión de la lactosa en la cepa aislada del brote de la Región Metropolitana. Un trabajo a futuro consiste en modelar sus estructuras mediante la técnica de modelado por homología y efectuar las estimaciones de *docking*, comparando los resultados entre la silvestre y la mutante <sup>55-57</sup>.

Por otra parte, en el análisis de los niveles de expresión de los genes *lamB* y *malF* de dos cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas de lactosa (una cepa representativa de cada brote), no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la cepa control fermentadora tardía de la lactosa, *S. sonnei* ATCC 25931 ( $p < 0,05$ ). Estos resultados, en conjunto con los datos obtenidos mediante el análisis de las secuencias aminoacídicas de dichos genes, sugieren que tanto la proteína LamB como la proteína MalF no estarían involucradas en el transporte de lactosa en las cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas de lactosa aisladas de ambos los brotes.

Considerando la importancia de las pruebas funcionales para investigar la estructura y/o función de una proteína determinada en un organismo, se analizó la participación de las proteínas LamB y MalF, de una cepa fermentadora rápida de lactosa representativa de cada brote, en la incorporación de lactosa y su correlación con la fermentación rápida, mediante expresión heteróloga en la cepa control de fermentación tardía *S. sonnei* ATCC 25931. Esta

metodología ofrece ventajas debido a que se trata de un receptor de la misma especie. Adicionalmente, los genes clonados bajo el control del promotor *araC*-P<sub>BAD</sub> son eficientemente reprimidos y permiten altos niveles de expresión del gen a bajas concentraciones de arabinosa, tan bajas como 0,001% <sup>58</sup>.

Los resultados de los experimentos de expresión heteróloga fueron negativos, no observándose cambios en el fenotipo de fermentación de las cepas de *S. sonnei* ATCC 25931, cuando se expresaron los genes *lamB*<sup>37A</sup>, *lamB*<sup>8273RM</sup>, *malF*<sup>37A</sup> y *malF*<sup>8273RM</sup>. Algunas razones para explicar este resultado son: baja o nula expresión de los genes clonados en el vector, ya sea por toxicidad de la proteína pre o post inducción; ausencia de la proteína nativa debido a desplazamientos en el marco de lectura, mala incorporación de aminoácidos, ausencia de plegamiento o plegamiento inadecuado; inactividad de la proteína por baja solubilidad o por problemas en su exportación; y/o ausencia de otros determinantes necesarios dentro del genoma de las cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas de lactosa, entre otros <sup>58-60</sup>.

Para confirmar que el resultado obtenido en la evaluación fenotípica de las transformantes SAlamB37A y SAmalF37A se debió a que los genes analizados no están involucrados en la internalización de la lactosa en las cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas y no a la ausencia de su expresión a nivel transcripcional, se realizó una qPCR para determinar los niveles de expresión relativos de los genes *lamB*<sup>37A</sup> y *malF*<sup>37A</sup> en la cepa de *S. sonnei* ATCC 25931. Los resultados obtenidos permitieron establecer que los niveles de expresión *lamB*<sup>37A</sup> y *malF*<sup>37A</sup> fueron, 949 y 39 veces mayor respectivamente, en las cepas transformadas e inducidas con arabinosa, que en las cepas transformadas no inducidas, evidenciando que el resultado obtenido no se debe a la ausencia de expresión de los genes *lamB* y *malF* en la cepa fermentadora tardía.

Entre las limitaciones de este estudio se puede mencionar la falta de detección específica de las proteínas LamB y MalF, así como el estudio de su ensamblaje en la membrana. Aunque la expresión de proteínas recombinantes supone una carga metabólica para la célula hospedera, el hecho de utilizar como hospedero una bacteria de la misma especie, permite

suponer que tanto la transcripción, traducción y funcionalidad de la proteína no deberían verse afectadas.

Una alternativa para estudiar la posible participación de las proteínas LamB y MalF del sistema transportador de maltosa, en la incorporación de lactosa en las cepas de *S. sonnei* aisladas de ambos brotes, es la inactivación génica. Ésta metodología ha demostrado ser efectiva para estudiar la relación entre la estructura y la función proteica, y además permite analizar la interacción con otros determinantes bacterianos.

No obstante, en nuestro estudio, las limitantes para aplicar esta metodología fueron la multiresistencia antibiótica de las cepas en estudio y la falta de marcadores de resistencia alternativos, lo cual no permitió el uso de los vectores disponibles, ni su modificación adecuada.

Las librerías genómicas y los microarreglos constituyen otras alternativas metodológicas, ambas tienen la ventaja de permitir analizar cientos de genes de forma simultánea. A pesar de ello, las librerías genómicas presentan dificultad en la selección e identificación de el o los clones que contengan el gen de interés; en tanto los microarreglos suponen un desafío desde el punto de vista estadístico por la gran cantidad de información que se obtiene, así como también, la gran variabilidad observada en los resultados experimentales, sumándose a esto su elevado costo<sup>61,62</sup>. Además, la identificación, ya sea del gen de interés en la librería o de las señales interesantes en el “chip” igualmente deben ser verificadas con otras técnicas tales como mutagénesis dirigida, expresión heteróloga o qPCR.

Finalmente, los resultados de este estudio evidencian que los genes *lamB* y *malF* del sistema transportador de maltosa, por sí solos, no participan en la incorporación de lactosa y no se correlacionan con la fermentación rápida en cepas de *S. sonnei* aisladas en estos brotes.

## 9. CONCLUSIONES

Se describen por primera vez en Chile, cepas de *S. sonnei* aisladas de dos brotes: Antofagasta y Región Metropolitana, fermentadoras rápida de lactosa (<24 horas) y fenotipo estable.

Todas las cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas de lactosa, revelaron actividad  $\beta$ -galactosidasa; sin embargo, esta actividad no fue homogénea, destacándose dos grupos, uno de ellos presenta actividad basal baja y niveles de inducción altos, mientras que el otro grupo evidencia una actividad basal alta y niveles de inducción bajos.

Se demuestra en cepas clínicas de *S. sonnei* la pérdida de la integridad del gen *lacY*, debido a una delección de 981 pb y a la presencia de una *ISI* en el extremo 3', similar a lo reportado en los genomas de las cepas de *S. sonnei* Ss046 y 53G. Por lo tanto, la fermentación rápida de la lactosa no se debería a la presencia de la lactosa permeasa.

El gen *malF* del sistema transportador de maltosa, de las cepas 37A y 8273RM no presentó los cambios aminoacídicos descritos previamente en la literatura, sin embargo, en la cepa 37A representativa del brote de Antofagasta, se observó un cambio en el gen *malK* que podría ser investigado, aunque su rol en el reconocimiento del sustrato es cuestionable. El gen *lamB* de las cepas 37A y 8273RM tampoco presentó cambios aminoacídicos respecto de las cepas fermentadoras tardías de lactosa, *S. sonnei* Ss046 y *S. sonnei* ATCC 25931.

Las cepas de *S. sonnei* ATCC 25931, fermentadora tardía de lactosa, transformada con los genes *lamB*<sup>37A</sup>, *lamB*<sup>8273RM</sup>, *malF*<sup>37A</sup> y *malF*<sup>8273RM</sup> no presentaron cambios en su fenotipo de fermentación de lactosa, aun cuando se confirmó la expresión transcripcional de cada gen mediante qPCR.

Estos resultados en su conjunto, evidencian que en las cepas de *S. sonnei* fermentadoras rápidas, aisladas de los brotes de Antofagasta y la Región Metropolitana 2008-2009, los genes *lamB* y *malF* del sistema transportador de maltosa, no participarían en la internalización de la

lactosa, lo cual sugiere que, probablemente el fenotipo en estas cepas involucra otro transportador.

## 10. BIBLIOGRAFIA

1. Germani Y and Sansonetti P. The Genus *Shigella*. En: Dworkin M. The Prokaryotes. New York: Springer; 2006.
2. Yang F, Yang J, Zhang X, Chen L, Jiang Y, Yan Y *et al*. Genome Dynamics and diversity of *Shigella* species, the etiologic agents of bacillary dysentery. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33: 6445-6458.
3. Vila J, Alvarez M, Buesa J and Castillo J. Microbiological diagnosis of gastrointestinal infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009; 27: 406-411.
4. Goodman R and Pickett M. Delayed Lactose Fermentation by Enterobacteriaceae. *J Bacteriol*. 1966; 92: 318-327.
5. Kotloff K, Winickoff J, Ivanoff B, Clemens J, Swerdlow D, Sansonetti P *et al*. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull. World Health Organ*. 1999; 77: 651-666.
6. Torres A. Current aspects of *Shigella* pathogenesis. *Rev Latinoam Microbiol*. 2004; 46: 89-97.
7. Barrantes K y Achí R. Interacciones celulares en el proceso de invasión de *Shigella* sp. *Rev Panam Infectol*. 2009; 11: 56-61.
8. Schroeder G and Hilbi H. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin Microbiol Rev*. 2008; 21:134-156.
9. Reis R and Horn F. Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Samonella*, *Shigella* and *Yersinia*: cellular aspects of host-bacteria interactions in enteric diseases. *Gut Pathog*. 2010; 22: 1-12.
10. Marteyn B, Gazi A and Sansonetti P. *Shigella*: A model of virulence regulation in vivo. *Gut Microbes*. 2012; 3: 104–120.
11. Ministerio de Salud Instituto de Salud Pública de Chile, Gobierno de Chile. Informe de resultados de laboratorio *Shigella* spp. ISP 2010-2012. Santiago: Instituto de Salud Pública; 2012.

12. Deepa P and Lava R. Identification, characterization and antibiotic susceptibility of *Shigella* species isolated from stool samples in children. *Int J Biol Med Res.* 2012; 3: 1640-1643.
13. Marcoleta A, Toro C, Prado V, Serrano M, Fernández P, Benadof D y cols. Patrones de susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Shigella sonnei* aisladas durante tres períodos diferentes en la Región Metropolitana. *Rev. chil. infectol.* 2013; 30: 616-621.
14. Hamilton C, Prado V, Hormazábal J, Lagos R, Benadof D, Mendoza C y cols. Epidemiología clínica y molecular de las infecciones por *Shigella* spp. en niños de la Región Metropolitana durante el verano 2004-2005. *Rev Méd Chile.* 2007; 135: 1388-1396.
15. Cook G, Knox R and Tomlinson A. Production of fermentative variants by *Shigella sonnei* and other "Late Fermenting" organisms. *Br J Exp Pathol.* 1951; 32: 203-211.
16. Santillan M and Mackey M. Quantitative approaches to the study of bistability in the *lac* operon of *Escherichia coli*. *J R Soc Interface.* 2008; 5: S29-39.
17. Griffiths A, Gelbart W, Miller J and Lewontin R. Regulation of the lactose system. En: Modern genetic analysis. New York: W. H. Freeman; 1999.
18. Reznikoff W. Catabolite gene activator protein activation of *lac* transcription. *J Bacteriol.* 1992; 174: 655-658.
19. Reznikoff W. The lactose operon-controlling elements: a complex paradigm. *Mol Microbiol.* 1992; 6: 2419-2422.
20. Görke B and Stülke J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol.* 2008; 6: 613-624.
21. Ito H, Kido N, Arakawa Y, Ohta M, Sugiyama T and Kato N. Possible mechanisms underlying the slow lactose fermentation phenotype in *Shigella* spp. *Appl Environ Microbiol.* 1997; 57: 2912-2917.
22. Rickenberg H. Occurrence of beta-galactosidase in the genus *Shigella*. *J Bacteriol.* 1960; 80: 421-422.
23. Ladino A. Análisis de relación clonal entre cepas de *Shigella sonnei* aisladas de brotes en dos regiones de Chile. Tesis para optar al grado de Magíster en Microbiología, 2013.
24. Dills S, Apperson A, Schmidt M and Saier M. Carbohydrate transport in bacteria. *Microbiol Rev.* 1980; 44: 385-418.



25. Brooker R and Wilson T. Isolation and nucleotide sequencing of lactose carrier mutants that transport maltose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1985; 82: 3959-3963.
26. Van Gelder P, Dutzler R, Dumas F, Koebnik R and Schirmer T. Sucrose transport through maltoporin mutants of *Escherichia coli*. *Protein Eng*. 2001; 14: 943-948.
27. Shinnick S, Perez S and Varela M. Altered substrate selection of the melibiose transporter (MelY) of *Enterobacter cloacae* involving point mutations in Leu-88, Leu-91, and Ala-182 that confer enhanced maltose transport. *J Bacteriol*. 2003; 185: 3672-3677.
28. Pao S, Paulsen I and Saier M Jr. Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998; 62: 1-34.
29. Saier MJr. Families of transmembrane sugar transport proteins. *Mol Microbiol*. 2000; 35: 699-710.
30. Sugihara J, Smirnova I, Kasho V and Kaback H. Sugar recognition by CscB and LacY. *Biochemistry*. 2011; 50: 11009-11014.
31. ter Beek J, Guskov A and Slotboom D. Structural diversity of ABC transporters. *J Gen Physiol*. 2014; 143: 419-435.
32. Rees D, Johnson E and Lewinson O. ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009; 10: 218-227.
33. Hollenstein K, Dawson R and Locher K. Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr Opin Struct Biol*. 2007; 17: 412-418.
34. Moussatova A, Kandt C, O'Mara M and Tieleman D. ATP-binding cassette transporters in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1778: 1757-1771.
35. Bordignon E, Grote M and Schneider E. The maltose ATP-binding cassette transporter in the 21st century--towards a structural dynamic perspective on its mode of action. *Mol Microbiol*. 2010; 77: 1354-1366.
36. Boos W and Shuman H. Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998; 62: 204-229.
37. Merino G and Shuman H. Truncation of MalF results in lactose transport via the maltose transport system of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 1998; 273: 2435-2444.

38. Merino G and Shuman H. Unliganded maltose-binding protein triggers lactose transport in an *Escherichia coli* mutant with an alteration in the maltose transport system. *J Bacteriol.* 1997; 179: 7687-7694.
39. Messer A. Lactose permeation via the arabinose transport system in *Escherichia Coli* K-12. *J Bacteriol.* 1974; 120: 266-272.
40. Nastasi A, Pignato S, Mammina C and Giammanco G. rRNA gene restriction patterns and biotypes of *Shigella sonnei*. *Epidemiol Infect.* 1993; 110: 23-30.
41. Miller J. Experiments in molecular genetics. New York: Cold spring harbor laboratory press; 1972.
42. Guzman L, Belin D, Carson M and Beckwith J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter. *J Bacteriol.* 1995; 177: 4121-30.
43. Inoue H, Nojima H and Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 1990; 96: 23-28.
44. Sambrook J, Fritsch E and Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual, 2<sup>nd</sup> Ed. New York: Cold spring harbor laboratory press; 1989.
45. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25: 402-408.
46. Prats G y Mirelis B. Género *Shigella*: Aspectos prácticos para el laboratorio de microbiología. Sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. 1998.
47. Madigan M, Martinko J, Parker J, Brock T, Rodríguez C y Sánchez M. Brock biología de los microorganismos. 10<sup>a</sup> Ed. Madrid: Pearson Prentice Hall; 2004.
48. Kaback H. Structure and mechanism of the lactose permease. *C R Biol.* 2005; 328: 557-567.
49. Abramson J, Smirnova I, Kasho V, Verner G, Kaback H and Iwata S. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science.* 2003; 301: 610-615.
50. Wrubel W, Stochaj U, Sonnewald U, Theres C and Ehring R. Reconstitution of an active lactose carrier in vivo by simultaneous synthesis of two complementary protein fragments. *J Bacteriol.* 1990; 172: 5374-5381.

51. King S and Wilson T. Identification of valine 177 as a mutation altering specificity for transport of sugars by the *Escherichia coli* lactose carrier enhanced specificity for sucrose and maltose. *J Biol Chem.* 1990; 265: 9638-9644.
52. Klebba P, Hofnung M and Charbit A. A model of maltodextrin transport through the sugar-specific porin, LamB, based on deletion analysis. *EMBO J.* 1994; 13: 4670-4675.
53. Denker K, Orlik F, Schiffler B and Benz R. Site-directed mutagenesis of the greasy slide aromatic residues within the LamB (maltoporin) channel of *Escherichia coli*: effect on ion and maltopentaose transport. *J Mol Biol.* 2005; 352: 534-550.
54. Hekstra D and Tommassen J. Functional exchangeability of the ABC proteins of the periplasmic binding protein-dependent transport systems Ugp and Mal of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1993; 175: 6546-6552.
55. Chen Y. Beware of docking!. *Trends Pharmacol Sci.* 2015; 36:78-95.
56. Khamis MA, Gomaa W and Ahmed WF. Machine learning in computational docking. *Artif Intell Med.* 2015; Epub ahead of print.
57. Schymkowitz J, Borg J, Stricher F, Nys R, Rousseau F and Serrano L. The FoldX web server: an online force field. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33:W382-W388.
58. Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006; 72: 211-222.
59. Rosano G and Ceccarelli E. Recombinant protein expression in microbial systems. *Front Microbiol.* 2014; 5: 1-2.
60. Bernaudat F, Frelet-Barrand A, Pochon N, Dementin S, Hivin P, Boutigny S *et al.* Heterologous expression of membrane proteins: choosing the appropriate host. *PLoS One.* 2011; 6: 1-17.
61. Moreno V y Solé X. Uso de chips de ADN (*microarrays*) en medicina: fundamentos técnicos y procedimientos básicos para el análisis estadístico de resultados. *Med Clin (Barc).* 2004; 122: 73-79.
62. Medina E y Espinosa F. Microarreglos: Tecnología con aplicaciones en el campo de la salud humana. *Alerg Asma Inmunol Pediatr.* 2009; 18: 52-59.