

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***BÚSQUEDA DE POTENCIALES NUEVOS BLANCOS DE
SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS MEDIANTE SCREENING
FENOTÍPICO DE MUTANTES *Salmonella Typhi* zxx::EZ-Tn5:
INACTIVACIÓN DEL GEN *glnA* Y SU RELACIÓN CON EL AUMENTO
DE LA SUSCEPTIBILIDAD A CIPROFLOXACINO***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Doctor en Ciencias Farmacéuticas:**

ANA RITA MILLANAO BALBOA

**Directores de Tesis: Dr. Alejandro Hidalgo Cea
Dr. Guido Mora Longa
Dr. Carlos Santiviago Cid**

Santiago-CHILE

Marzo 2020

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

ANA RITA MILLANAO BALBOA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias Farmacéuticas, en el examen público rendido el día _____

Directores de Tesis:

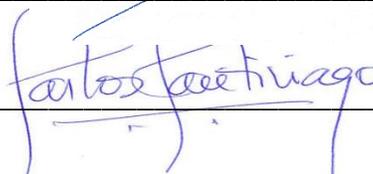
Dr. Alejandro Hidalgo Cea



Dr. Guido Mora Longa



Dr. Carlos Santiviago Cid



Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Sergio Álvarez

Dra. Marcela Jirón

Dra. Cecilia Toro

Dr. Claudio Vásquez

FINANCIAMIENTO

Esta Tesis de Doctorado fue realizada en el laboratorio de “Patogénesis Molecular y Antimicrobianos”, Facultad de Medicina, Universidad Andrés Bello, bajo la Dirección de los Doctores Alejandro Hidalgo Cea, Guido Mora Longa y Carlos Santiviago Cid.

Contó con el financiamiento de:

- 1) Beca para la realización de doctorado en Chile CONICYT 21120035 (AM)
- 2) Beca de apoyo para la realización de tesis doctoral CONICYT 2015 (AM)
- 3) Beca CONICYT para asistencia a congreso nacional 2016 (AM)
- 4) Proyecto FONDECYT 1151393 (GM)
- 5) Proyecto FONDECYT iniciación 11150588 (AH)
- 6) Proyecto ECOS-CONICYT C16B04 (AH)
- 7) Proyecto UNAB Regular DI-15-19/RG (AH)

Durante el desarrollo de esta tesis de doctorado se realizaron las siguientes actividades

Publicaciones en revistas ISI

- **Millanao, A;** Mora, A; Saavedra, C; Villagra, N; Mora,G and Hidalgo, A. **2020**. Inactivation of glutamine synthetase-coding gene *glnA* increases susceptibility to quinolones through increasing Outer Membrane Protein F in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Frontiers in Microbiology* 11: 428. doi: 10.3389/fmicb.2020.00428.
- Villagra, N; Valenzuela, L; Mora, A; **Millanao, A;** Saavedra C; Mora, G and Hidalgo, A. **2019**. Cysteine auxotrophy drives reduced susceptibility to quinolones and paraquat by inducing the expression of efflux-pump systems and detoxifying enzymes in *S. Typhimurium*. *Biochem Biophys Res Commun*, 515 (2): 339-344. 10.1016/j.bbrc.2019.05.122.

Presentaciones en congresos nacionales

- **Millanao, A.,** Hidalgo, A., Villagra, N., Canales, V y Mora, G. La inactivación del gen *glnA* incrementa la susceptibilidad de *Salmonella enterica* serovar Typhi a quinolonas. **Presentación Oral.** XXXVIII Congreso Chileno de Microbiología. 22 -25 de noviembre de 2016. Valdivia, Chile.

ÍNDICE

	pág
1. Resumen	1
2. Summary	5
3. Introducción	9
3.1 Género <i>Salmonella</i>	9
3.2 Epidemiología	11
3.3 Resistencia de <i>S. Typhi</i> a los antimicrobianos	13
3.4 La crisis de la resistencia y la necesidad de encontrar nuevos blancos de susceptibilidad	16
3.5 Búsqueda o <i>screening</i> fenotípico para el encuentro de nuevos blancos de susceptibilidad	18
3.6 Uso de transposones para mutagénesis aleatoria	19
4. Hipótesis	23
5. Objetivos	24
6. Materiales y Métodos	25
6.1 Materiales	25
6.1.1 Reactivos	25
6.1.2 Medios de cultivo	27
6.1.3 Antibacterianos	29
6.1.4 Material biológico	30
6.1.4.1 Cepas	30
6.1.4.2 Plasmidios	31
6.1.4.3 Partidores	33
6.2 Métodos	36
6.2.1 Técnicas microbiológicas	36
6.2.1.1 Mantenimiento de microorganismos	36
6.2.1.2 Condiciones de cultivo bacteriano	36
6.2.1.3 Ensayo de susceptibilidad por el método de difusión en agar	37
6.2.1.4 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)	37
6.2.1.4.1 Estándar de turbidez para preparación del inóculo	38

6.2.1.5	Curvas de crecimiento	39
6.2.1.6	Ensayo de aglutinación	40
6.2.2	Técnicas genéticas para la construcción de cepas mutantes de <i>S. Typhi</i>	40
6.2.2.1	Mutagénesis aleatoria de <i>S. Typhi</i> con el transposoma EZ-Tn5 TM <R6K γ ori/KAN-2> TM	40
6.2.2.2	Clonamiento y secuenciación de mutantes de <i>S. Typhi</i> STH2370 <i>zxx::EZ-Tn5</i> seleccionadas	42
6.2.2.3	Reemplazo alélico por transformación directa con productos de PCR (“ <i>Red-Swap</i> ”)	43
6.2.2.3.1	Construcción de la cepa receptora	43
6.2.2.3.2	Obtención del producto de PCR para mutagénesis	44
6.2.2.3.3	Preparación de células electrocompetentes de la cepa receptora y transformación por electroporación	44
6.2.2.3.4	Remoción de marcadores de selección flanqueados por sitios FRT	45
6.2.2.4	Construcción de mutantes <i>S. Typhi</i> STH2370 dependientes de tetraciclina, por reemplazo alélico y transformación directa con productos de PCR	46
6.2.2.5	Cultivos de Bacteriófagos	47
6.2.2.6	Secuenciación	48
6.2.3	Técnicas de biología molecular y bioquímicas	48
6.2.3.1	Técnicas experimentales con DNA	48
6.2.3.1.1	Electroforesis en gel de agarosa	48
6.2.3.1.2	Aislamiento de fragmentos de DNA	48
6.2.3.1.3	Extracción de DNA cromosomal	49
6.2.3.1.4	Extracción de DNA plasmidial	50
6.2.3.1.5	Reacciones de amplificación por PCR	50
6.2.3.1.6	Clonamiento de productos de PCR en vectores	51
6.2.3.2	Técnicas experimentales con proteínas	52
6.2.3.2.1	Obtención de proteínas de membrana externa (PME)	52
6.2.3.2.2	Electroforesis en geles desnaturantes de poliacrilamida-SDS	52
6.2.3.2.3	Análisis de las imágenes de geles desnaturantes de poliacrilamida-SDS	53
6.2.3.3	Técnicas experimentales con RNA	53
6.2.3.3.1	Extracción de RNA total	53

6.2.3.3.1.1	Extracción de RNA total usando tioisocianato de guanidina (<i>Trizol</i> [®] , Invitrogen)	53
6.2.3.3.1.2	Extracción de RNA total con fenol ácido caliente	54
6.2.3.3.1.3	Digestión con DNAsa I	55
6.2.3.3.2	Transcripción reversa (RT)	56
6.2.3.3.3	PCR en tiempo real (RT-qPCR)	57
6.2.4	Técnicas informáticas	58
6.2.5	Expresión de resultados y Pruebas estadísticas	58
7.	Resultados	60
7.1	Selección de una mutante <i>S. Typhi</i> STH2370 <i>zxx::EZ-Tn5</i> , con aumento en la susceptibilidad tras un <i>screening</i> fenotípico bajo condiciones selectivas	60
7.1.1	Mutagénesis aleatoria en <i>S. Typhi</i> STH2370 con el transposón EZ-Tn5 TM por electroporación	60
7.1.2	Construcción de cepario de mutantes <i>S. Typhi</i> STH2370 <i>zxx::EZ-Tn5</i>	60
7.1.3	<i>Screening</i> fenotípico de mutantes <i>S. Typhi</i> STH2370 <i>zxx::EZ-Tn5</i> con concentraciones subletales de antimicrobianos	61
7.1.3.1	Selección de los antimicrobianos para la realización del <i>screening</i> fenotípico a las mutantes <i>S. Typhi</i> STH2370 <i>zxx::EZ-Tn5</i>	61
7.1.3.2	Selección de la concentración del antimicrobiano para la realización del <i>screening</i> fenotípico a las mutantes <i>S. Typhi</i> STH2370 <i>zxx::EZ-Tn5</i>	62
7.1.3.3	Selección de mutantes <i>S. Typhi</i> STH2370 <i>zxx::EZ-Tn5</i> con cambios fenotípicos bajo condiciones selectivas	63
7.1.3.4	Confirmación del cambio fenotípico en mutantes <i>S. Typhi</i> STH2370 <i>zxx::EZ-Tn5</i> bajo condiciones selectivas, mediante el ensayo de susceptibilidad por el método de difusión en agar	64
7.1.4	Determinación de la CIM en mutantes <i>S. Typhi</i> STH2370 <i>zxx::EZ-Tn5</i> seleccionadas, mediante la técnica de microdilución en caldo	65
7.1.4.1	Resultados de la búsqueda de mutantes susceptibles a ciprofloxacino	65
7.1.4.2	Resultados de la búsqueda de mutantes susceptibles a cloruro de benzalconio	65
7.1.4.3	Resultados de la búsqueda de mutantes susceptibles a cobre (II)	67
7.1.5	Clonamiento y secuenciación de las mutantes <i>S. Typhi</i> STH2370 <i>zxx::EZ-Tn5</i> preseleccionadas para caracterización	67
7.2	Caracterización de los mecanismos que contribuyen a la susceptibilidad a quinolonas tras la inactivación de <i>glnA</i> en <i>S. Typhi</i>	76
7.2.1	La mutante <i>glnA</i> presenta un deterioro en el crecimiento	76

7.2.2	El fenotipo WT no pudo ser complementado en la mutante <i>glnA</i>	77
7.2.3	La delección de <i>glnA</i> provoca cambios en el perfil de PME de <i>S. Typhi</i>	79
7.2.4	La delección del gen <i>glnA</i> aumenta la expresión del gen <i>ompF</i>	82
7.3	Estudio de cambios en la expresión de <i>ompF</i> vía un sistema inducible	83
7.3.1	Construcción de mutantes con el elemento <i>tetRA</i> en el promotor de los genes <i>glnA</i> , <i>ompF</i> y <i>4173</i>	83
7.3.2	La inducción de <i>glnA</i> en la mutante tetraciclina dependiente disminuye la susceptibilidad a ciprofloxacino	87
7.3.3	La mutante <i>glnA</i> ^{TD} crece en presencia de anhidrotetraciclina en medio mínimo	89
7.3.4	La inducción de <i>glnA</i> disminuye la expresión de <i>ompF</i>	91
7.3.5	La inactivación de <i>glnA</i> disminuye la expresión de MicF	94
7.4	La mutación del gen <i>glnA</i> no afecta la expresión de <i>ompC</i>	96
7.5	La delección de <i>glnA</i> no afecta la expresión de los genes del sistema de dos componentes <i>envZ-ompR</i>	98
7.6	La delección de <i>glnA</i> no cambia la expresión de los reguladores <i>marA</i> , <i>marR</i> , <i>ramA</i> y genes que codifican para la bomba de expulsión AcrB-TolC	99
7.7	La delección de <i>glnA</i> de <i>S. Typhi</i> provoca cambios pleiotrópicos en la expresión de genes	102
7.8	La delección de <i>glnA</i> activa el sistema de dos componentes NtrBC	104
8.	Discusión	107
8.1	<i>Screening</i> bajo condiciones selectivas a partir de una colección de mutantes obtenida por mutagénesis aleatoria y selección de una mutante para su caracterización	107
8.2	Selección de la mutante <i>glnA</i>	110
8.3	Mecanismo(s) que aumenta(n) la susceptibilidad a ciprofloxacino en <i>S. Typhi glnA</i>	114
8.4	Glutamina sintetasa como potencial blanco para aumentar la susceptibilidad a quinolonas en <i>S. Typhi</i>	127
9.	Conclusiones	131
10.	Bibliografía	132
11.	Anexos	143

ÍNDICE DE TABLAS

		pág
Tabla 1	Cepas utilizadas en el presente estudio	30
Tabla 2	Partidores usados en este estudio	33
Tabla 3	Concentración de los antimicrobianos utilizados, para la selección de mutantes <i>S. Typhi</i> STH2370 <i>zxx::EZ-Tn5</i> en el <i>screening</i> bajo condiciones selectivas	63
Tabla 4	CIM de ciprofloxacino en mutantes <i>S. Typhi</i> STH2370 <i>zxx::EZ-Tn5</i> candidatas que presentaron un halo mayor que la cepa silvestre	66
Tabla 5	CIM de cloruro de benzalconio en mutantes <i>S. Typhi</i> STH2370 <i>zxx::EZ-Tn5</i> candidatas que presentaron un halo mayor que la cepa silvestre	66
Tabla 6	Genotipos de 15 mutantes <i>S. Typhi</i> STH2370 <i>zxx::EZ-Tn5</i> secuenciadas	71
Tabla 7	Halos de inhibición de la prueba de <i>screening</i> de mutantes <i>S. Typhi</i> STH2370 <i>zxx::EZ-Tn5</i> con genotipo identificado, expuestas a distintos antimicrobianos	74
Tabla 8	Las mutantes en <i>glnA</i> son 2 veces más susceptibles que <i>S. Typhi</i> STH2370 (WT). Halos de inhibición y CIM de ciprofloxacino determinados en WT, <i>glnA::EZ-Tn5</i> , <i>glnA::kan</i> y <i>glnA::FRT</i>	76
Tabla 9	Halos de inhibición y CIM en <i>S. Typhi</i> STH2370 (WT), <i>glnA::FRT</i> y <i>ompF::kan</i> frente a ciprofloxacino	81

Tabla 10	Halos de inhibición de las mutantes STH2370 $\Delta P^{glnA}::tetRA$, STH2370 $\Delta P^{ompF}::tetRA$ y $\Delta P^{4173}::tetRA$ frente a ciprofloxacino	87
Tabla 11	Halos de inhibición de las mutantes tetraciclina dependiente frente a ciprofloxacino	89
Tabla 12	Susceptibilidad a ciprofloxacino de <i>S. Typhi</i> STH2370 (WT) y mutantes nulas en <i>micF</i> y <i>ompF</i>	96
Tabla 13	Susceptibilidad a ciprofloxacino de <i>S. Typhi</i> STH2370 (WT) y mutantes nulas en genes <i>glnL</i> , <i>glnG</i> , y <i>ompF</i>	106

ÍNDICE DE FIGURAS

		pág
Figura 1	Colección de 48 mutantes <i>S. Typhi</i> STH2370 <i>zxx::EZ-Tn5</i>	61
Figura 2	<i>Screening</i> a mutantes <i>S. Typhi</i> <i>zxx::EZ-Tn5</i> con susceptibilidad aumentada a un antimicrobiano	64
Figura 3	Ejemplo representativo de los análisis electroforéticos de clones obtenidos a partir de la digestión con EcoRV, ligación con T4 ligasa y electrotransformación de los plasmidios resultantes en <i>E. coli</i> DH5 α pir	68
Figura 4	Flujo de trabajo en la realización del <i>screening</i> con tres antimicrobianos a 3.216 mutantes <i>S. Typhi</i> STH2370 <i>zxx::EZ-Tn5</i> para la búsqueda de mutantes con susceptibilidad aumentada	69
Figura 5	Operón <i>glnA</i> de <i>S. Typhi</i> y las mutantes nulas en <i>glnA</i> utilizadas en este trabajo	75
Figura 6	Las mutantes <i>S. Typhi</i> STH2370 <i>glnA::EZ-Tn5</i> , <i>S. Typhi</i> STH2370 <i>glnA::kan</i> y <i>S. Typhi</i> STH2370 <i>glnA::FRT</i> tienen susceptibilidad aumentada a ciprofloxacino	75
Figura 7	La mutante <i>S. Typhi</i> <i>glnA::FRT</i> presenta un deterioro en el crecimiento respecto <i>S. Typhi</i> STH2370 (WT)	77
Figura 8	La mutante <i>S. Typhi</i> <i>glnA</i> tiene aumentada la porina OmpF	79
Figura 9	Perfil de PME de <i>S. Typhi</i> STH2370 y la mutante <i>S. Typhi</i> STH2370 <i>glnA::FRT</i>	81
Figura 10	La expresión del gen <i>ompF</i> en <i>S. Typhi</i> <i>glnA</i> es 4,4 veces mayor que en <i>S. Typhi</i> STH2370	83
Figura 11	Estrategia para la construcción de la mutante dependiente de tetraciclina <i>S. Typhi</i> STH2370 <i>glnA</i> ^{TD}	88
Figura 12	La mutante <i>glnA</i> ^{TD} crece en presencia de anhidrotetraciclina (AHTET)	90

Figura 13	La expresión de <i>glnA</i> aumenta en la mutante <i>glnA</i> ^{TD} cuando se induce el promotor con clortetraciclina	91
Figura 14	La inducción de <i>glnA</i> disminuye la expresión de <i>ompF</i>	93
Figura 15	Expresión de <i>ompF</i> en la mutante <i>ompF</i> ^{TD} y <i>4173</i> ^{TD}	94
Figura 16	La inactivación de <i>glnA</i> disminuye la expresión de MicF, su inducción aumenta la expresión de MicF	95
Figura 17	La delección de <i>glnA</i> no cambia significativamente la expresión de <i>ompC</i>	97
Figura 18	La inducción de <i>glnA</i> no cambia significativamente la expresión de <i>ompC</i>	97
Figura 19	La delección de <i>glnA</i> no provoca cambios significativos en la expresión de <i>envZ</i> y <i>ompR</i>	99
Figura 20	La expresión de <i>marA</i> , <i>marR</i> , <i>ramA</i> , <i>acrB</i> y <i>tolC</i> no cambia significativamente en la mutante <i>glnA</i>	101
Figura 21	Los genes <i>glnL</i> y <i>glnG</i> se sobreexpresan en la mutante <i>glnA</i>	105

1. RESUMEN

Fundamentación: el tratamiento de muchas infecciones, incluidas las causadas por *Salmonella enterica* serovar Typhi, está comprometido por el aumento de la resistencia de los patógenos a los antimicrobianos, donde la necesidad de nuevos tratamientos es urgente. Una estrategia para combatir la crisis de la resistencia es la búsqueda de nuevos blancos para aumentar la susceptibilidad a antimicrobianos. Para esto, se puede utilizar el *screening* fenotípico sobre una colección de mutantes al azar de la bacteria en estudio. Desde el comienzo de la era antimicrobiana, esta metodología ha sido relevante para la búsqueda y descubrimiento de nuevas moléculas y blancos de susceptibilidad. Este estudio presenta un potencial blanco de inhibición, encontrado mediante *screening* fenotípico, no descrito en bacterias Gram negativo, cuya inactivación aumenta la susceptibilidad de *S. Typhi* a ciprofloxacino, y se describe parte del mecanismo que explica el cambio en la susceptibilidad observada.

Objetivo: identificar mutantes de *S. Typhi* con susceptibilidad aumentada a antimicrobianos seleccionados y caracterizar cómo los genes mutados contribuyen al cambio de susceptibilidad encontrado.

Métodos: se generaron mutantes de *S. Typhi* con el transposón EZ-Tn5. El *screening* a las mutantes *S. Typhi* STH2370 EZ-Tn5 se realizó con concentraciones subinhibitorias de los antimicrobianos seleccionados. Los cambios en la susceptibilidad se confirmaron por pruebas de difusión en agar y CIM. Los genes de las mutantes seleccionadas se

secuenciaron y comprobaron usando mutagénesis sitio dirigida. Para evaluar la cantidad de proteínas y la expresión de genes se utilizó SDS-PAGE y RT-qPCR, respectivamente.

Resultados: para encontrar nuevos blancos de susceptibilidad se transformó *S. Typhi* STH2370 con el transposón EZ-Tn5, se obtuvo una colección de 3.216 mutantes y se realizó un *screening* fenotípico con concentraciones subletales de ciprofloxacino, cloruro de benzalconio y cobre. Se encontró 6 genes nuevos, todos con susceptibilidad incrementada a ciprofloxacino, comparada con la cepa silvestre. Se preseleccionaron 5 mutantes para evaluar el perfil de susceptibilidad en un *screening* secundario con una batería de antimicrobianos de distintas familias, que arrojó tres mutantes candidatas a confirmación.

La primera mutante confirmada fue la mutante *glnA*, cuyo gen codifica para glutamina sintetasa (GS). GS es esencial para la síntesis de glutamina en enterobacterias. La inactivación de *glnA* aumenta la susceptibilidad a ciprofloxacino al doble, comparado con la cepa silvestre.

El perfil de proteínas de membrana externa por SDS-PAGE reveló un aumento de OmpF de 3,5 veces en la mutante nula en *glnA*, porina involucrada en la entrada de ciprofloxacino y ácido nalidíxico. La expresión de *ompF* incrementó 4,4 veces en la mutante *glnA*, comparada con la cepa silvestre. Para conocer la relación entre la expresión de *glnA* y *ompF*, se construyeron cepas bajo el control del promotor P^{tet}, inducible por tetraciclinas. La inducción de *glnA* disminuye la expresión de *ompF*, al mismo tiempo que disminuye

la susceptibilidad a ciprofloxacino. A su vez, la inducción de *ompF* incrementa el halo de inhibición a ciprofloxacino.

La expresión del sRNA MicF, un RNA antisentido que regula negativamente OmpF, fue de 0,25 veces en la mutante nula en *glnA*, comparada con la cepa silvestre. En la mutante *glnA* inducible existe una correlación directa entre la expresión de *glnA* y MicF. La delección de *micF* incrementa la susceptibilidad a ciprofloxacino.

Se midió la expresión de la porina OmpC, involucrada en el ingreso de antimicrobianos en *S. Typhi*, sin encontrarse diferencias. Con el propósito de evaluar cambios en la expresión del sistema de dos componentes que regula *ompF*, se evaluó la expresión de *envZ* y *ompR*, sin encontrarse diferencias. Luego, se determinó la expresión de genes que codifican para la bomba de expulsión AcrB-TolC y de los reguladores involucrados en resistencia *marA*, *marR*, *ramA*, sin encontrarse cambios en la mutante *glnA* comparada con la cepa silvestre. Estas observaciones sugieren que el eflujo de antimicrobianos no está afectado, soportando la idea de que la susceptibilidad aumentada es consecuencia de un aumento de la entrada de ciprofloxacino en la mutante *glnA*.

Para entender los mecanismos involucrados en el cambio de OmpF se analizó el transcriptoma de la mutante *glnA*, encontrándose 267 genes diferencialmente expresados; entre ellos, genes del sistema de dos componentes NtrBC, codificados por los genes *glnL* y *glnG*, respectivamente. Estos genes se sobreexpresan en la mutante *glnA* y regularían positivamente la expresión de *ompF*. La delección del gen *glnG* disminuye la susceptibilidad a ciprofloxacino.

Conclusión: la inactivación de *glnA* en *S. Typhi* promueve la expresión de *ompF* que se traduce en un aumento de OmpF, facilitando la entrada de ciprofloxacino, incrementado la susceptibilidad a este antimicrobiano a través de dos posibles mecanismos.

2. SUMMARY

Background: the treatment of many infections, including infections caused by *Salmonella enterica* serovar Typhi, is compromised by the increasing resistance of pathogens to antimicrobials, where the need for new treatments is urgent. One strategy to combat the resistance crisis is the search for new targets to increase the susceptibility to antimicrobials through phenotypic screening. This methodology has been used to search and discover molecules and bacterial targets of susceptibility since the beginning of the antimicrobial's era.

This study presents a potential inhibition target, found by phenotypic screening, not described in Gram-negative bacteria, whose inactivation increases the susceptibility of *S. Typhi* to ciprofloxacin, and describes part of the mechanism that explains the change in susceptibility.

Objective: to identify *S. Typhi* mutants with increased susceptibility to selected antimicrobials and characterize how mutated genes contribute to the change in susceptibility.

Methods: *S. Typhi* mutants were generated with the EZ-Tn5 transposon and screened for susceptibility to ciprofloxacin, benzalkonium and cooper. Susceptible mutants were confirmed by agar diffusion and MIC assays. The genes carrying EZ-Tn5 transposon insertions were sequenced. Null mutants of interrupted genes, as well as inducible genetic constructs, were produced using site-directed mutagenesis, to corroborate phenotypes.

SDS-PAGE and Real-time PCR were used to evaluate expression of proteins and genes, respectively.

Results: to find new targets of susceptibility *S. Typhi* STH2370 was transformed with the EZ-Tn5 transposon, a collection of 3,216 mutants was obtained and phenotypic screening was performed with sublethal concentrations of ciprofloxacin, benzalkonium chloride and copper. 6 new genes were found, all with increased susceptibility to ciprofloxacin, compared to the wild-type strain. 5 mutants were preselected to evaluate the susceptibility profile on a secondary screening with a battery of antimicrobials from different families, which yielded three candidate mutants for confirmation.

The first mutant confirmed was the *glnA* mutant. The *glnA* gene encodes for Glutamine Synthetase (GS). GS is essential for synthesis of glutamine in enterobacteria. Disk diffusion assays and minimal inhibitory concentration test indicated that inactivation of *glnA* increased twice the susceptibility to ciprofloxacin, compared to wild type strain.

The analysis of outer membrane proteins profile by SDS-PAGE showed 3.5 times increase in OmpF in the *glnA* mutant, this porin is involved in the entry of ciprofloxacin and nalidixic acid. RT-qPCR analysis unveiled that expression of *ompF* increased 4.4 times in the *glnA* null mutant, compared to wild type strain. To understand the relation between expression of *glnA* and *ompF*, we constructed a strain with the *glnA* gene under control of the *tetA* promoter; which is induced in the presence of tetracyclines. The induction of *glnA* expression by adding chlortetracycline reduced the expression of *ompF*, at the same time that decreased susceptibility to ciprofloxacin. The opposite was observed in a mutant

where *ompF* is under control of *tetA* promoter. In this case, chlortetracycline directly increased *ompF* expression, increasing susceptibility to ciprofloxacin.

The expression of the MicF sRNA, an anti-sense RNA that negatively regulates OmpF, was 0.25 times in the mutant *glnA*, compared to the wild-type strain. In the inducible *glnA* mutant there is a direct correlation between the *glnA* expression and MicF. MicF deletion increases susceptibility to ciprofloxacin.

Expression of porin *ompC* was also measured but no changes were observed. With the purpose of evaluating changes in the expression of two-component systems that may regulate OmpF, expression of *envZ* and *ompR* were analyzed in the *glnA* mutant. The results obtained showed no differences in the expression of these genes, in the *glnA* mutant. Next, expression of genes encoding for efflux pump systems AcrB-TolC and the regulators involved in resistance *marR*, *marA* and *ramA*, was evaluated showing no changes in the *glnA* mutant, compared to the wild type strain. These observations suggest that efflux of antibiotics is not affected; supporting the idea that increased susceptibility is consequence of increased entry of ciprofloxacin.

To understand the mechanisms involved in the change of OmpF the transcriptome of *glnA* mutant was analyzed, finding 267 genes differentially expressed; among them genes of the NtrBC two-component system, encoded by the *glnL* and *glnG* genes, respectively. These genes are overexpressed in the *glnA* mutant and would positively regulate *ompF*. *glnG* deletion decreases susceptibility to ciprofloxacin.

Conclusion: In line with our data we can conclude that inactivation of *glnA* gene increases expression of *ompF* at the transcriptional level, translating in increased in OmpF protein which in turns facilitate the entry of ciprofloxacin, thus increasing susceptibility to ciprofloxacin through two possible mechanisms.

3. INTRODUCCIÓN

Salmonella enterica serovar Typhi (*S. Typhi*), patógeno entérico específico del ser humano es el agente etiológico causante de la fiebre tifoidea, una enfermedad que potencialmente amenaza la vida ^{1,2}. Sin tratamiento la fiebre tifoidea es una infección que exhibe una tasa de fatalidad que varía entre el 10-30% y la administración temprana de tratamiento antibacteriano ha probado ser altamente efectiva para eliminar la infección ³. La resistencia de *S. Typhi* a distintos antimicrobianos ha llegado a ser un problema serio de salud. Cepas resistentes a cloranfenicol y otros antimicrobianos recomendados han sido identificadas en distintas partes de América Latina, Asia y África ⁴. El informe “Amenaza de la resistencia a los antimicrobianos en los Estados Unidos”, elaborado por el *Center for Diseases Control and Prevention* (CDC) del año 2013 y actualizado el 2019, consideró a esta bacteria como una amenaza seria a la salud pública ^{5,6}.

3.1 Género *Salmonella*

Salmonella, género de la familia *Enterobacteriaceae*, comprende un gran número de patógenos médicamente importantes, estrechamente relacionados genéticamente. Este género formado por bacilos Gram negativo, ha sido asociado con un amplio espectro de enfermedades infecciosas, incluyendo fiebre tifoidea y salmonelosis no tífica, los que causan problemas de salud pública principalmente en países en vías de desarrollo. El sistema de nomenclatura de *Salmonella* ha sido objeto de larga discusión, finalmente, en

2005 “*Salmonella enterica*” ganó la aprobación oficial como la especie tipo del género *Salmonella*. A diferencia de otros géneros bacterianos, los organismos de *Salmonella* son diferenciados por análisis de serotipificación basada en el esquema de Kauffmann-White. Hoy en día, nuevos serovares están aún siendo descubiertos cada año, agregando complejidad a este género ^{7,8}. Para referirse al serovar que causa fiebre tifoidea, la actual designación taxonómica oficial es *Salmonella enterica, sub-especie enterica*, serovar Typhi. Serológicamente *S. Typhi* cae en el grupo D, basado en la expresión del antígeno O9, el epítipo inmunodominante de este grupo y produce el polisacárido capsular Vi. Este bacilo anaerobio facultativo, es un microorganismo móvil que forma cápsula y no forma esporas ⁹⁻¹¹.

El análisis de los genomas completos de dos cepas de *S. Typhi* muestra un 98% de identidad. La secuencia completa de los aproximadamente 4,8 Mb de la cepa de *S. Typhi* CT18 resistente a múltiples antibióticos y la cepa Ty2 sensible a antibióticos ha sido comunicada ¹². Aproximadamente, 70-80% de los genomas de *S. Typhi* comparten largas secuencias de genes con la misma ordenación a aquellos encontrados en *Escherichia coli* y otros serovares de *Salmonella*. A lo largo de estas secuencias, de manera intermitente, hay grupos de genes específicos de *S. enterica* que sólo se encuentran en *S. Typhi* (es decir genes que no están en *Salmonella* Typhimurium u otros serovares de *S. enterica*), y más de 200 pseudogenes (no todos confirmados) ¹³.

A diferencia de otros serotipos de *Salmonella*, los agentes causales de la fiebre entérica, *S. Typhi* y *Salmonella* Paratyphi, no tienen otro hospedero conocido fuera del ser humano.

Se ha sugerido que la restricción de hospedero que caracteriza a *S. Typhi* pudo haber ocurrido por la adquisición de material genético (a través de plasmidios, profagos e islas genómicas), y también por evolución reduccionista (pseudogenización), o una mezcla de estos eventos. De hecho, *S. Typhi* comparada con el serovar filogenéticamente más relacionado, *S. Typhimurium*, ha adquirido material genético presente sólo en su genoma y posee un alto número de pseudogenes. La pérdida de funciones, conocida tanto como degradación genética o “evolución reduccionista”, es considerado un sello distintivo de patógenos especialistas como *S. Typhi*, que presenta un 5% de pseudogenes comparado con un 1% que tiene *S. Typhimurium*, un serovar generalista ^{13,14}.

3.2 Epidemiología

La mayoría de los pacientes adquieren la infección por consumo de agua o alimentos contaminados. En ocasiones, los profesionales de la salud pueden contraer la fiebre entérica después de atender a pacientes infectados, mientras que el contagio del personal de laboratorio puede deberse a un accidente ¹¹.

Entre enero de 2012 y junio de 2016, el Laboratorio de Referencia de Agentes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) del Instituto de Salud Pública (ISP) confirmó 11.181 casos de salmonelosis en nuestro país, incluyendo la infección por serovares tifoidales de *Salmonella* y los que causan sólo una diarrea inflamatoria. El 60,6% de las cepas confirmadas correspondió a *Salmonella* Enteritidis, el 13,7% a *S. Typhimurium*, el 1,9% a *S. Typhi* y el 1,4% a *S. Paratyphi B*. *S. Typhi* representó, hasta el año 1993, el serotipo identificado con mayor frecuencia por el Laboratorio de

Referencia. Durante el año 1994 fue remplazado por *S. Enteritidis*, cambio que se ha mantenido invariable ¹⁵.

La incidencia verdadera de la fiebre tifoidea en la mayoría de las regiones de países en desarrollo es desconocida. En los intentos por entregar estimaciones globales sobre esta enfermedad, se han realizado extrapolaciones a partir de una limitada información. Una estimación global sugiere una morbilidad de 21,7 millones de casos y aproximadamente 200 mil muertes al año en todo el mundo ¹¹. En Estados Unidos, entre 2008-2015 hubo 350 casos por año de fiebre tifoidea confirmados por cultivo ¹⁶. La fiebre entérica es endémica en la mayor parte de los países en vías de desarrollo, en particular en el subcontinente Indio, Sudamérica, Centroamérica y Asia; y está vinculada a zonas con un índice de crecimiento de población alto, urbanización progresiva, tratamiento deficiente de residuos, suministro de agua limitado y sobrecarga de los sistemas sanitarios ^{17,18}.

Muchas cepas de *S. Typhi* contienen plasmidios que codifican resistencia para cloranfenicol, ampicilina y trimetoprim, antibióticos que durante años se han utilizado para tratar la fiebre entérica. Asimismo, en Asia se ha observado la aparición de resistencia cromosomal a ciprofloxacino, debido a mutaciones en la subunidad A de la DNA girasa. En el año 2014, en la India se comunicó por primera vez en *S. Typhi* la resistencia a quinolonas mediada por plasmidios, donde se identificó la presencia de los genes *qnrB* (la proteína codificada por este gen puede unirse directamente al DNA reduciendo la unión de la girasa a éste o unirse a la enzima evitando así la acción de las quinolonas) y *aac(6')-lb-cr* (variante de una aminoglucósido transferasa que acetila el nitrógeno no sustituido

del anillo piperazina que tiene en su estructura ciprofloxacino y norfloxacino, disminuyendo así la actividad del antibacteriano) ^{19,20}.

La morbilidad y la mortalidad son mayores en los brotes producidos por cepas resistentes a los antimicrobianos, probablemente debido a que el tratamiento es deficiente, o bien, apropiado pero tardío ^{11,20-23}

3.3 Resistencia de *S. Typhi* a los antimicrobianos

Desafortunadamente, las cepas multirresistentes de *S. Typhi* están aumentando en muchas regiones. Esta tendencia hacia una mayor incidencia de infecciones por *Salmonella* resistente a múltiples fármacos (*multidrug resistant*, MDR) en los países en vías de desarrollo queda reflejada en el aumento de la proporción de los casos estadounidenses provocados por cepas MDR, desde 0,6% entre 1985 a 1989 hasta 12% en el período 1990 a 1994. Ampicilina, cloranfenicol y cotrimoxazol fueron los fármacos de primera línea para el tratamiento de la fiebre tifoidea, sin embargo, el uso intensivo del escaso arsenal disponible para el tratamiento de esta enfermedad ha llevado a la aparición y diseminación global de cepas de *S. Typhi* MDR ²⁴.

Con la introducción de las fluoroquinolonas, tal como ciprofloxacino, para el tratamiento de fiebre tifoidea, cepas de *S. Typhi* con una elevada concentración inhibitoria mínima (CIM) a fluoroquinolonas han llegado a ser prevalentes ²². En el período 2009-2011, el 67% de las infecciones por *S. Typhi* en Estados Unidos fue resistente a ciprofloxacino ²⁵. Los datos de resistencia del año 2017, disponibles en www.cdc.gov/NARMS, mostraron

para *S. Typhi* un 70,8% de resistencia a ácido nalidíxico y un 11,1% de resistencia a ciprofloxacino. Hasta el año 2017 no se identificaron cepas resistentes a ceftriaxona, sin embargo, los datos preliminares del año 2018 y 2019 muestran un porcentaje de resistencia de 3,6 y 14,3%, respectivamente. Por otra parte, el año 2015 el 8,9% de las cepas de *S. Typhi* fueron MDR.

Asimismo, en Canadá, datos de vigilancia de resistencia de microorganismos prioritarios indicaron que el 87% de las cepas de *S. Typhi* fueron resistentes a ácido nalidíxico. Respecto a la resistencia a ciprofloxacino se indica que aumentó de 0% en 2003 a 22% en 2017 ²⁶.

En Europa, estudios de vigilancia epidemiológica mostraron que desde 1999 a 2001 entre el 22 y 29% de las cepas de *S. Typhi*, fueron MDR. Además, en este período, la ocurrencia de cepas con susceptibilidad disminuida a ciprofloxacino incrementó sostenidamente desde 20% en 1999 a 26% en 2001 ²⁷. Asimismo, durante el período 1996-2013, un total de 1.746 cepas de *S. Typhi* colectadas por el sistema de vigilancia nacional francés, mostró que la proporción de cepas MDR incrementó de 0% durante 1996-1999 a 22,3% durante el período 2010-2013 ²⁸. La mayoría de los países de Europa del Este han informado de cepas de *S. Typhi* con susceptibilidad disminuida a ciprofloxacino, siendo un problema importante también en África ²⁴.

En los 90s en el Sudeste Asiático, se observó resistencia a los antimicrobianos de primera línea. Esto llevó a las autoridades a cambiar las guías de tratamiento empírico de cloranfenicol a fluoroquinolonas ²⁹. Este cambio resultó en la progresiva reaparición de

susceptibilidad a los fármacos de primera línea y un rápido incremento en la resistencia a ácido nalidíxico. Lamentablemente, datos de vigilancia de la resistencia en América Latina son escasos ²⁹. En nuestro país, el ETAS comunicó susceptibilidad a los antimicrobianos de uso clínico, señalando presencia de resistencia intermedia a ciprofloxacino en cepas de *S. Typhi* ¹⁵.

La rápida aparición de cepas bacterianas resistentes a las fluoroquinolonas y la aparición de resistencia a cefalosporinas son motivo de preocupación. Las fluoroquinolonas de cuarta generación han mostrado buena actividad contra *S. Typhi*; no obstante, el año 2011 el gobierno de India prohibió el uso de gatifloxacino, debido a casos de reacciones adversas mortales. Por otra parte, la resistencia cruzada con otras fluoroquinolonas e iniciativas de resguardo, como por ejemplo la posible restricción de moxifloxacino para el tratamiento de la tuberculosis, podrían evitar tener a disposición estos fármacos para el tratamiento de la fiebre tifoidea ²⁹.

Los carbapenémicos y la tigeciclina son considerados tratamientos de última línea. La reaparición de cepas susceptibles a cloranfenicol y cotrimoxazol ha aumentado la posibilidad de la reintroducción de estos antimicrobianos de primera línea. Sin embargo, permanece la preocupación que pueda ocurrir un rápido incremento de la resistencia ^{29,30}.

Recientemente, en Pakistán fueron identificadas cepas de *S. Typhi* H58 con resistencia extrema (XDR, *extensively drug-resistant*) que mostraron ser resistentes a cloranfenicol, ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprim, fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera

generación ³¹. El aumento de cepas *S. Typhi* MDR/XDR plantea una amenaza real a los regímenes de tratamiento actuales y el riesgo de que la fiebre tifoidea sea intratable ³².

3.4 La crisis de la resistencia y la necesidad de encontrar nuevos blancos de susceptibilidad

El tratamiento de muchas infecciones, incluida *S. Typhi*, está amenazado por la creciente resistencia de los patógenos a los antimicrobianos. Uno de los problemas que ha agudizado esta crisis es el fracaso en el descubrimiento de nuevos antimicrobianos. Han transcurrido varias décadas sin que aparezca un antibacteriano con una estructura química diferente y con un nuevo mecanismo de acción para tratar infecciones de patógenos Gram negativo ^{33,34}. Si bien es cierto cada año las autoridades regulatorias autorizan nuevos antimicrobianos, estos sólo son estructuras que pertenecen a familias de antimicrobianos conocidos, siendo la mayoría de las veces modificaciones de los ya existentes. La edad dorada del desarrollo de los antibacterianos fue entre la década del 50 y el 70. Para encontrar estas moléculas se utilizaron distintas estrategias de *screening* de productos naturales y de compuestos químicos. Desde el punto de vista farmacológico, se realizaron esfuerzos para entender y mejorar el uso de los antibióticos optimizando la dosificación, administración, etc. Junto con ello, comenzó también el desarrollo del diseño racional de fármacos. Al mismo tiempo, el conocimiento de los efectos bioquímicos y de los mecanismos de resistencia llevaron a estudios de modificación química para evitar la resistencia ³⁵.

El avance de la biología molecular, la incorporación del análisis del genoma bacteriano, y el uso de diversas herramientas genéticas se convirtieron en un camino importante para el descubrimiento de antibióticos en la década de los 90s. Posteriormente, el desarrollo de la bioinformática y el uso de la metagenómica han sido parte de las estrategias que se fueron incorporando en la búsqueda de nuevos blancos de susceptibilidad ^{33,36}.

Sin embargo, lo anterior no ha convergido hacia el descubrimiento de nuevas moléculas, probablemente por el financiamiento insuficiente de la industria farmacéutica que cerró mucho de los programas dedicados a la búsqueda de nuevos antibacterianos, así como retorno económico el escaso obtenido comparado con otras patologías, como por ejemplo las patologías crónicas. Así nuevas estrategias para combatir las enfermedades infecciosas son necesarias ^{33,35-40}.

La diseminación de la resistencia ha estimulado grandes esfuerzos para encontrar nuevos antibióticos por una variedad de métodos. Entre los distintos esfuerzos, existen aquellos que se han enfocado en detectar nuevos blancos a través de la genómica usando herramientas genéticas como las anteriormente descritas. Una de las estrategias de búsqueda involucra potenciar los antibióticos existentes identificando blancos que incrementan la susceptibilidad a antimicrobianos específicos para microorganismos específicos ^{36,41-47}. Estudios utilizando microarreglos indican que los antibióticos llevan a cambios en la expresión de genes cuando son usados a concentraciones cercanas a la CIM. Se ha sugerido entonces que algunos de estos genes podrían estar involucrados en la resistencia y por lo tanto representar nuevos blancos. Parece probable que haya muchos más genes implicados en la susceptibilidad aumentada o disminuida de las bacterias de lo

que se había supuesto anteriormente y que la participación de algunos de estos genes puede llegar a tener relevancia clínica ^{42,48-50}.

3.5 Búsqueda o *screening* fenotípico para el encuentro de nuevos blancos de susceptibilidad

Desde etapas tempranas y durante los últimos 100 años, dos tipos de *screening* han dominado el descubrimiento y desarrollo de los fármacos, los *screening* fenotípicos y los *screening* basados en dianas. Los primeros analizan los efectos, o fenotipos, que los compuestos inducen en las células, los tejidos o los organismos completos, mientras que los segundos miden el efecto de distintos compuestos sobre una proteína diana o ligando, purificada a través de ensayos *in vitro*. El *screening* fenotípico puede llevar a la identificación de una molécula que modifique un fenotipo de enfermedad al actuar sobre un blanco o diana no descrito con anterioridad o por actuar simultáneamente sobre más de un blanco. Sin embargo, identificar el blanco relevante encontrado, ha probado ser muy difícil ^{35,46,51}.

En el descubrimiento de moléculas antimicrobianas, el método de *screening* fenotípico también se ha utilizado desde sus inicios siendo, por ejemplo, utilizado en el hallazgo de daptomicina y linezolid, los últimos antibacterianos introducidos en el mercado ^{45,52}. No obstante, dada sus limitaciones el *screening* fenotípico requiere del uso de metodologías complementarias para caracterizar e identificar potenciales blancos de susceptibilidad ^{51,53}. Entre estas metodologías, se encuentra la mutagénesis aleatoria con transposones, herramienta eficiente para la generación de colecciones de mutantes. Permite aislar

bacterias que poseen un fenotipo de interés en una población de mutantes y la rápida identificación de las mutaciones generadas por su inserción ^{54,55}. Ha sido ampliamente informado su uso en la búsqueda de genes implicados en la resistencia y susceptibilidad a antimicrobianos, otorgando un método eficiente para la construcción de mutantes con marcadores genéticos seleccionables ^{42-44,53,56-59}.

3.6 Uso de transposones para mutagénesis aleatoria

Los transposones son elementos genéticos móviles capaces de transponer (auto escisión y reinserción) su genoma en secuencias de DNA que varían dependiendo de la particularidad del transposón. La transposición del DNA es un fenómeno biológico importante involucrado en reordenamientos del genoma, herencia de determinantes de resistencia e integración del DNA retroviral. Los transposones han llegado a ser una poderosa herramienta en análisis genético. Los transposones pueden ser insertados de forma aleatoria en el cromosoma bacteriano, siendo posible encontrar inserciones del transposón en un gen o cercano a un gen de interés. Las colecciones se obtienen luego de una mutagénesis y posterior selección según el marcador al que venga asociado el transposón, en donde cada mutante que hereda el fenotipo de resistencia a antibiótico asociado al transposón tiene, probablemente, una inserción de éste ^{60,61}.

El uso de esta metodología ha revelado roles para cientos de genes involucrados en virulencia o colonización, incluyendo respuesta de estrés bacteriano, biosíntesis de nutrientes, funciones del sistema de secreción tipo III, etc. ^{36,62}.

El transposón Tn5 es uno de los mejor estudiados y se conoce que este elemento genético transpone vía un mecanismo de cortar y pegar. Los únicos componentes macromoleculares requeridos para este proceso son la transposasa, el transposón, que puede presumiblemente ser cualquier secuencia que esté flanqueada por dos secuencias específicas invertidas de 19 pb, y el DNA blanco donde se realiza la inserción ⁶⁰.

El transposón Tn5 ha mostrado ser activo en distintas especies y muchos estudios han utilizado derivados del Tn5 adaptados para uso en el laboratorio y su uso ha sido comunicado en más de 30 organismos, incluyendo bacterias Gram negativo y Gram positivo incluso se ha utilizado en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ^{60,63-67}. Estudios de secuenciación de inserciones realizados con Tn5 en serovares de *S. enterica* han mostrado un leve sesgo hacia regiones de secuencias ricas en AT. Sin embargo, esta preferencia no parece ser un mayor obstáculo dado las densidades extremadamente altas de inserción obtenidas con este transposón ⁶².

Un número de sistemas para transposición *in vitro* han sido descritos. El transposoma EZ-Tn5TM de *Epicentre* entrega un método sencillo para mutagénesis *in vivo*, seguido del clonamiento desde la mutante deseada para la identificación del DNA blanco. El sistema EZ-Tn5TM está basado en el sistema Tn5 hiperactivo. El transposoma EZ-Tn5TM contiene la transposasa (Tnp) unida covalentemente a los terminales en mosaicos de los invertidos repetidos de 19 pb que definen el transposón, que flanquean un origen de replicación condicional (R6K γ ori) y un gen de resistencia a kanamicina, KAN^R ⁶⁰.

El transposoma es estable pudiendo ser electroporado en una célula para lo cual un protocolo de electroporación ha sido establecido. La transposasa modificada de EZ-Tn5™ se inserta al azar a una frecuencia aproximadamente 1.000 veces mayor que el transposón Tn5 silvestre ⁶⁸. Seguido de electroporación, la transposasa es activada por el Mg⁺² presente en el citoplasma celular, permitiendo la transposición. Las mutantes con la inserción son seleccionadas por siembra en placas con medio que contengan kanamicina. El DNA cromosomal puede ser aislado desde las mutantes KAN^R con el fenotipo deseado, digerido con una endonucleasa de restricción apropiada y luego ligado. Sólo las moléculas que llevan el EZ-Tn5 R6K γ ori y el DNA cromosomal flanqueante pueden ser replicados en una cepa *pir*⁺. Los plasmidios generados pueden ser secuenciados usando partidores específicos que alinean dentro de la secuencia del transposón EZ-Tn5™ y que dirigen la reacción de secuenciación hacia el DNA cromosomal ⁶¹.

Nuestro grupo de trabajo ha estado interesado en entender los aspectos moleculares de patogenicidad de *S. Typhi* por más de 30 años. *Salmonella enterica* serovar Typhi STH2370, cepa aislada en 1991 desde una paciente con fiebre tifoidea en Santiago, ha sido usada como referencia en numerosos estudios durante los últimos 20 años y para la cual se dispone de la secuencia genómica completa (PMID 24558245) ⁶⁹. En este último tiempo, nuestro laboratorio se ha interesado en estudiar los mecanismos moleculares de resistencia o susceptibilidad de *Salmonella Typhi* a los antimicrobianos.

En virtud de lo anteriormente expuesto, consideramos de vital importancia la búsqueda de potenciales nuevos blancos de susceptibilidad, y conocer molecularmente de qué manera modifican la susceptibilidad a los antibacterianos en *S. Typhi*.

En conjunto, todos estos antecedentes nos llevan a postular la siguiente hipótesis y establecer los objetivos que se presentan a continuación.

4. HIPÓTESIS

Existen determinantes desconocidos de resistencia a antimicrobianos en *Salmonella* Typhi, que al ser inactivados aumentan la susceptibilidad y cuya caracterización molecular revela potenciales blancos para intervención terapéutica

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Identificar mutantes de *Salmonella* Typhi con susceptibilidad aumentada a antimicrobianos y caracterizar cómo los genes mutados contribuyen a la susceptibilidad de *S. Typhi*.

5.2 Objetivos específicos

1. Encontrar mutantes de *S. Typhi* con susceptibilidad aumentada a antimicrobianos seleccionados.

Generar una colección de mutantes de *S. Typhi* STH2370 con el transposón EZ-Tn5 y realizar un *screening* fenotípico para seleccionar mutantes con aumento en la susceptibilidad a distintos antimicrobianos.

2. Caracterizar genéticamente las mutantes seleccionadas y estudiar aquellas que representen un mecanismo novedoso de susceptibilidad en *S. Typhi*.

Realizar ensayos de susceptibilidad a las mutantes seleccionadas, contrastar la información bibliográfica disponible y comprobar mediante técnicas genéticas, el fenotipo encontrado.

3. Identificar el o los mecanismos de susceptibilidad, asociados a la pérdida del gen mutado en la mutante seleccionada.

Estudiar la mutante seleccionada mediante ensayos de susceptibilidad, determinación de perfil de proteínas de membrana externa, estudio de la expresión de transcrito y análisis global del transcriptoma.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

6.1.1 Reactivos

De Becton, Dickinson and Company, se obtuvo: discos para prueba de susceptibilidad de ácido nalidíxico 30 µg, ampicilina 10 µg, amoxicilina-ácido clavulánico 20/10 µg, ertapenem 10 µg, imipenem 10 µg, levofloxacin 5 µg, meropenem 10 µg, tetraciclina 30 µg, trimetoprim 5 µg.

De Epicentre®Biotechnologies (Madison, Wisconsin, EE. UU.) se obtuvo: kit EZ-Tn5™ <R6Kγori/KAN-2>Tnp Transposome™

De Gibco BRL (Grand Island, NY, EE. UU.), se obtuvo: Tris-HCl, bromuro de etidio, L-glutamina.

De Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EE. UU.) se obtuvo: dATP 100 mM, dCTP 100 mM, dGTP 100 mM, dTTP 100mM, enzima DNA ligasa T4, enzima de restricción *EcoR1*, enzima de restricción *EcoRV*, enzima *Taq* DNA polimerasa, enzima *Platinum™ Taq* DNA polimerasa, enzima DNAsa recombinante (Kit de remoción de DNA libre de DNA), enzima transcriptasa reversa *SuperScript™*, estándar de masa molecular para DNA (1kb y 100 pb), estándar de masa molecular para proteínas *BenchMark™ Pre-Stained*, hexámeros al azar *Random Hexamers*, Reactivo de eliminación de RNAsa *Rnase Away®*, kit de medición de proteínas *Pierce® BCA*, kit de purificación

de RNA *GeneJet*, lisozima, *Trizol*[®], kit de clonamiento *TOPO*[®] *TA Cloning*[®] *Kit*, kit de clonamiento *pBAD TOPO*[®] *TA Expression Kit*.

De Merck Química Chilena Soc. Ltda. se obtuvo: ácido acético glacial, ácido clorhídrico, ácido etilendiamino tetracético (EDTA), agar-agar granulado, agar Mueller-Hinton, agua calidad HPLC, cisteína, cloroformo, cloruro de amonio (NH₄Cl), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de calcio (CaCl₂), sulfato de cobre (CuSO₄), etanol absoluto, extracto de levadura, fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄), fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄), fosfato de sodio monobásico (NaH₂PO₄), glucosa, hidróxido de sodio (NaOH), isopropanol, medio de cultivo BHI (*Brain Heart Infusion*), membranas Millipore de 0,025 µm de diámetro de poro, metanol, peptona de caseína, triptófano.

De Promega se obtuvo: enzima RQ1-DNA libre de RNAsa, kit de purificación DNA genómico *Wizard*[®] *Genomic DNA Purification*, kit de purificación de DNA plasmidial *Wizard*[®] *Plus Minipreps*, kit de purificación de productos de PCR *Wizard*[®] *Plus PCR-clean*.

De Sigma Chemical Co, (St. Louis, Mo, EE. UU.) se obtuvo: acriflavina, agarosa, anhidrotetraciclina, azul de Coumassie, bencil viológeno, bromuro de etidio, carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona (CCCP), ciprofloxacino, cloranfenicol, clortetraciclina, cloruro de benzalconio, cloruro de magnesio, desoxicolato, dimetilsulfóxido (DMSO), gentamicina, kanamicina, metil viológeno, *N,N,N',N'*- tetrametiletildiamina (TEMED), dodecil sulfato de sodio (SDS), tetraciclina, triptófano, triton X-100, β-mercaptoetanol.

De Winkler se obtuvo: ácido tricloroacético, acrilamida, alcohol isoamílico, bisacrilamida, glicerol, glicina, fenol saturado ácido, fenol saturado básico, persulfato de amonio (APS), trizma base.

Las cubetas para electrotransformación se obtuvieron de **Bio-Rad**. El antisuero O9 para *S. Typhi* se obtuvo de **Denka Seiken (China)**. El Máster Mix para RT-qPCR 2X *Brilliant II SYBR*[®] se obtuvo de **Agilent**. De **Roche** se obtuvo: ceftriaxona 1 gr. Los filtros de 0,22 µm se obtuvieron de **Edlab**. Los partidores utilizados en este trabajo se obtuvieron de **IDT Technologies**.

6.1.2 Medios de cultivo

Agar Luria Bertani (ALB)

Triptona	1%
Extracto de levadura	0,5%
Cloruro de sodio	0,5%
Agar-agar	1,5%

Disolver en agua bidestilada ajustar a pH 7,0; esterilizar y distribuir en placas de Petri estériles, mantener a 4 °C.

Agar Mueller-Hinton MH (g/L)

Infusión de carne	2
Caseína hidrolizada	17,5
Almidón	1,5
Agar-agar	17

Disolver 38 g del polvo en 1 litro de agua bidestilada pH 7,3; esterilizar y distribuir en placas de Petri estériles un volumen de 20 mL, mantener a 4 °C.

Medio Luria Bertani (LB)

Triptona	1%
Extracto de levadura	0,5%
Cloruro de sodio	0,5%

Disolver en agua bidestilada ajustar a pH 7,0 y esterilizar ⁷⁰

Medio mínimo M9 (10X)

A 750 mL de agua bidestilada agregar:

Na ₂ HPO ₄	60 g
KH ₂ PO ₄	30 g
NH ₄ Cl	10 g
NaCl	5 g

Agregar los reactivos uno a la vez en agua bidestilada caliente, teniendo cuidado de disolver uno antes de agregar el siguiente. Completar a 1 L con agua bidestilada. Esterilizar en autoclave por 20 min. Mantener a temperatura ambiente.

Medio mínimo M9 (1X)

Sales para medio mínimo M9 (10X) 10 mL

Agua bidestilada 90 mL

Esterilizar en autoclave por 20 min. Suplementar el medio autoclavado con glucosa hasta una concentración final de 0,2 %, cisteína hasta una concentración 0,025 mg/mL, triptófano 0,025 mg/mL, MgCl₂ hasta una concentración final de 1 mM, CaCl₂ hasta una concentración final de 0,1 mM.

Medio rico infusión cerebro corazón (BHI) en glicerol al 20%

Disolver 3,7 gr en 80 mL de agua bidestilada, agregar 20 mL de glicerol. Esterilizar y dejar enfriar.

6.1.3 Antibacterianos

Para cada antibacteriano se prepararon soluciones *stock* 1000X en agua para biología molecular y se esterilizó con filtro de 0,22 μm de diámetro de poro.

Los antibacterianos se usaron a las siguientes concentraciones finales:

Ampicilina (AMP)	100 $\mu\text{g/mL}$
Ciprofloxacino (CIP)	0,05 $\mu\text{g/mL}$
Cloranfenicol (CAM)	20 $\mu\text{g/mL}$
Gentamicina (GEN)	50 $\mu\text{g/mL}$
Kanamicina (KAN)	50 $\mu\text{g/mL}$
Anhidrotetraciclina (AHTET)	0,05 y 0,1 $\mu\text{g/mL}$
Clortetraciclina (CTET)	0,025; 0,05 y 0,1 $\mu\text{g/mL}$

6.1.4 Material biológico

6.1.4.1 Cepas

Tabla 1. Cepas utilizadas en el presente estudio.

Cepa	Genotipo relevante	Fuente
<i>Salmonella</i> Typhi STH2370	Cepa silvestre auxótrofa para cisteína y triptófano. Produce cápsula Vi ⁺	Stock del laboratorio
Derivadas de S. Typhi STH2370		
<i>S.</i> Typhi STH 2370/pKD46	Recombinasa Red del fago λ inducible con arabinosa), AMP ^R , crecer a 30°C	Stock del laboratorio
<i>S.</i> Typhi STH2370 <i>zxx::EZ-Tn5</i>	KAN ^R	Este estudio
STH2370 <i>recC::EZ-Tn5</i>	<i>recC::EZ-Tn5</i> , KAN ^R	Este estudio
STH2370 <i>cysE::EZ-Tn5</i>	<i>cysE::EZ-Tn5</i> , KAN ^R	Este estudio
STH2370 <i>aefA::EZ-Tn5</i>	<i>aefA::EZ-Tn5</i> , KAN ^R	Este estudio
STH2370 <i>dacC::EZ-Tn5</i>	<i>dacC::EZ-Tn5</i> , KAN ^R	Este estudio
STH2370 <i>glnA::EZ-Tn5</i>	<i>glnA::EZ-Tn5</i> , KAN ^R	Este estudio
STH2370 <i>aefA::kan</i>	$\Delta aefA$, FRT-Kan-FRT, KAN ^R	Este estudio
STH2370 $\Delta aefA$	$\Delta aefA$, FRT	Este estudio
STH2370 <i>glnA::kan</i>	$\Delta glnA$, FRT-Kan-FRT, KAN ^R	Este estudio
STH2370 <i>glnA</i> ; STH2370 $\Delta glnA::FRT$	$\Delta glnA$, FRT	Este estudio
STH2370 $\Delta P^{glnA}::tetRA$	ΔP^{glnA} , <i>tetRA</i> , TET ^R	Este estudio
STH2370 $\Delta P^{ompF}::tetRA$	ΔP^{ompF} , <i>tetRA</i> , TET ^R	Este estudio
STH2370 $\Delta P^{4173}::tetRA$	ΔP^{4173} , <i>tetRA</i> , TET ^R	Este estudio
STH2370 $\Delta P^{glnA}::tetRA$ /pKD46	ΔP^{glnA} , <i>tetRA</i> , TET ^R , AMP ^R	Este estudio
STH2370 $\Delta P^{ompF}::tetRA$ /pKD46	ΔP^{ompF} , <i>tetRA</i> , TET ^R , AMP ^R	Este estudio

STH2370 $\Delta P^{4173}::tetRA/pKD46$	ΔP^{4173} , <i>tetRA</i> , TET ^R , AMP ^R	Este estudio
STH2370 $\Delta P^{glnA}::kan$	ΔP^{glnA} , <i>tetR</i> , $\Delta tetA$, FRT-Kan-FRT, KAN ^R	Este estudio
STH2370 $\Delta P^{ompF}::kan$	ΔP^{ompF} , <i>tetR</i> , $\Delta tetA$, FRT-Kan-FRT, KAN ^R	Este estudio
STH2370 $\Delta P^{4173}::kan$	ΔP^{4173} , <i>tetR</i> , $\Delta tetA$, FRT-Kan-FRT, KAN ^R	Este estudio
SHT2370 <i>glnA</i> ^{TD}	ΔP^{glnA} , <i>tetR</i> , $\Delta tetA$, FRT	Este estudio
STH2370 <i>ompF</i> ^{TD}	ΔP^{ompF} , <i>tetR</i> , $\Delta tetA$, FRT	Este estudio
STH2370 <i>4173</i> ^{TD}	ΔP^{4173} , <i>tetR</i> , $\Delta tetA$, FRT	Este estudio
STH2370 <i>glnG</i> _{STM} :: <i>kan</i>	$\Delta glnG::kan$, FRT-Kan-FRT, KAN ^R	Este estudio
STH2370 <i>glnL</i> _{STM} :: <i>kan</i>	$\Delta glnL::kan$, FRT-Kan-FRT, KAN ^R	Este estudio
STH2370 <i>micF</i> _{STM} :: <i>cam</i>	$\Delta micF::cam$, FRT-Cam-FRT, CAM ^R	Este estudio
Derivadas de <i>E. coli</i>		
<i>E. coli</i> DH5 α λ pir	K12 <i>endA1 hsdR17 (r-m+) supE44 thi-1 recA1 gyrA(NalR) relA1 $\Delta(lacZYA-argF)$U169 deoR [Φ80$\Delta(lacZ)$M15]</i>	S. Maloy
<i>E. coli</i> DH5 α λ pir/pKD4	KAN ^R	Stock del laboratorio
<i>E. coli</i> DH5 α λ pir/pK46	AMP ^R	Stock del laboratorio
<i>E. coli</i> DH5 α λ pir/pCP20	AMP ^R	Stock del laboratorio

6.1.4.2 Plasmidios

pKD4: este plasmidio posee clonado el gen *aph* (aminoglucósido fosfotransferasa, resistencia KAN) flanqueado por secuencias FRT (*FLP recombinase target*). Además, posee el gen *bla* como marcador de selección (β -lactamasa, resistencia a AMP) y un origen de replicación condicional (*oriR6K γ*) dependiente de la presencia de la proteína Pir (π)

del fago Lambda (λ). Se utiliza como molde para la amplificación del gen de resistencia a kanamicina flanqueada por las secuencias FRT para la generación de mutantes por reemplazo alélico por transformación directa con productos de PCR ⁷¹.

pKD46: este plasmidio posee clonados los genes que codifican las subunidades Bet, Gam y Exo de la recombinasa Red del bacteriófago λ , bajo el control del promotor P_{araB} inducible en presencia de L-arabinosa en el medio de cultivo. Para una expresión en forma transitoria y controlada, este promotor inducible evita eventos de recombinación bajo condiciones no inducibles. Además, posee el gen *bla* que codifica la enzima β -lactamasa como marcador de selección (resistencia a AMP) y un origen de replicación termosensible (no se replica a temperaturas iguales o superiores a 37 °C), que permite su fácil eliminación. Se utiliza para generar mutaciones por reemplazo alélico por transformación directa con productos de PCR. Este proceso ocurre mediante eventos de recombinación homóloga catalizados por la activación de los genes recombinasa Red del fago λ que están presentes en pKD46 ⁷¹.

pCP20: Este plasmidio posee clonado el gen que codifica la recombinasa Flp, bajo el control de un promotor termoinducible. Además, posee el gen *bla* como marcador de selección (β -lactamasa, resistencia a AMP) y un origen de replicación termosensible (no se replica a temperaturas iguales o superiores a 37 °C). Se utiliza para generar deleciones de material genético flanqueado por las secuencias FRT, por un evento de recombinación sitio-específica catalizado por la recombinasa Flp dejando una copia del sitio FRT y la deleción del gen interrumpido ⁷¹

6.1.4.3 Partidores

Los partidores utilizados para generar mutantes y su comprobación se diseñaron con el programa Vector NTI *Advance*TM 10. Los partidores generados para medir expresión relativa se diseñaron con el programa *PrimerQuest Tool* de Integrated DNA Technologies, Inc.

Tabla 2. Partidores usados en este estudio

Partidor	Secuencia 5´ - 3´
Partidor para la construcción de mutantes	
<i>aeiA</i> H1P1	TATTACAATTAGCGTTCCTATTATCCTGCTGCTCCTGTCAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
<i>aeiA</i> H2P2	GCCCTTAGCGTTATGCAGATGCACCTCAAGCTGGTTAAAGCATATGAATATCCTCCTTAG
<i>glnA</i> H1P1	GAGTACAAGTATGTCCGCTGAACACGTTTTGACGATGCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
<i>glnA</i> H2P2	TAATATACGATTAAACGCTGTAGTACAGCTCAAACCTACCATATGAATATCCTCCTTAG
<i>glnG</i> H1P1 FW	GAATAGTCTGGGTCGTCGATGATGATAGTTCCATCCGTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
<i>glnG</i> H2P2 RV	TTATTAATCTTTACTCGCGGATAATGTTTACTCCATTCATATGAATATCCTCCTTAG
<i>glnL</i> H1P1 FW	ATGCACTAAAATGGTGCAACCTTTCCAGGAGACTGCTGATGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
<i>glnL</i> H2P2 RV	CCGCTGACCATCGGGTAGAACAGCGTATCCTGTAATGGCATATGAATATCCTCCTTAG
<i>micF</i> H1P1 FW	GGGTGTGCTGAAAAAGGGTAAAAAAACCGAATGCGAAGCATCCGTGCAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>micF</i> H2P2 RV	TATATTCACGAACTTTTAAAAATCAACGGGTTAAATTGATGAAATCATATGAATATCCTCCTTA
<i>ompF</i> H1P1 FW	ATATAAAAAACCAATGAGGGTAATAAATAATGATGAAGCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
<i>ompF</i> H2P2 RV	CCGCCTGATCGTCCGGTGCCAACGTAGCTGGAGCTGTAGTCCATATGAATATCCTCCTTAG
H2 <i>tetA</i> P ^{<i>glnA</i>} RV	ACTTGTACTCTCCCGGATTGGTCATGGTCGGTCGTCGGATCATTGGTGACGAAATAA
H1 <i>tetR</i> P ^{<i>ompF</i>} FW	TAATAAAATCATAGTGATAAAATAAATAATCAAATCAAGGAAAAGGTTATGCTGCTT
H2 <i>tetA</i> P ^{<i>ompF</i>} RV	TATTTATTACCCTCATTGGTTTTTTTATATGACACCTGCCATCATTGGTGACGAAATAA
H1 <i>tetR</i> P ^{<i>STY4173</i>} FW	AGGTTGCCAGGTTTATACCAGTCAACGTGCGGGGGTTTTTCGAAAAAGGTTATGCTGCTT
H2 <i>tetA</i> P ^{<i>STY4173</i>} RV	AGAGCCCCTGCCAAAATATACGCAGCTCTCTCATAAAGATCATTGGTGACGAAATAA
Partidor para verificación de mutantes	
<i>KAN-2</i> FP-1 <i>Forward Primer</i>	ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC
<i>R6KAN-2</i> RP-1 <i>Reverse Primer</i>	CTACCTGTGGAACACCTACATCT

<i>aeiA</i> comp FW	TGCTGGAGATGTATCAATTGTGTCGACGC
<i>aeiA</i> comp RV	CGAAAAGGGCTTGAGCAAGGGTTGGCACAA
<i>glnA</i> comp FW	CACAAACATCCTCCGCAAAC
<i>glnA</i> comp RV	CTGCGCAACGCGAAAT
<i>glnG</i> comp FW	AATTGAGCAAGTACTGCTGA
<i>glnG</i> comp RV	GCTGAACAGTCCCACCAGCG
<i>glnL</i> comp FW	AGCATAGATAGCGATGTGAC
<i>glnL</i> comp RV	CAGAGCGACGGCTTCATCAA
<i>ompF</i> comp FW	AGATGCCTGTCAGACACATAAA
<i>ompF</i> comp RV	CCGTCAATGCCGAGATAGTT
comp <i>tetR</i> P ^{<i>glnA</i>} FW	ACTCGCTCTTGAGTTTCGGC
comp <i>tetR</i> P ^{<i>glnA</i>} RV	TGGACGCATCGGGCATCAGC
comp <i>tetR</i> P ^{<i>ompF</i>} FW	TAATAAAATCATAGTGATAAAAATAAAATAATCAAATCAAGGAAAAAGTTATGCTGCTT
comp <i>tetR</i> P ^{<i>ompF</i>} RV	CCCTGATACTGGATACCGAAAG
comp <i>tetR</i> P ⁴¹⁷³ FW	TGTTGCCATTACGGCGGACA
comp <i>tetR</i> P ⁴¹⁷³ RV	TAGGCGATGATAAAAGCGGT
M13 FW	GTAAAACGACGGCCAG
M13 RV	CAGGAAACAGCTATGAC
<i>pBAD</i> FW	ATGCCATAGCATTTTTATCC
<i>pBAD</i> RV	GATTTAATCTGTATCAGG
Partidor para RT-qPCR	
<i>acrB</i> RT FW	CGGATGAAGACCAGGGCGTATTC
<i>acrB</i> RT RV	CCCATGCTTTCAACGACACAAATG
<i>dnaN</i> RT FW	ACGTCGGCGACTTTATCTTTAC
<i>dnaN</i> RT RV	GCCCCGCTCCAGATGTTTAT
<i>envZ</i> RT FW	CTCGCGGAGTCGATCAATAAA
<i>envZ</i> RT RV	CCGGTACGCAGATAGTCAATAAA
<i>fis</i> RT FW	ACTGAATGGTCAGGACGTTAAT
<i>fis</i> RT RV	TGGTTACCACGGGTGTATTG
<i>glnA</i> RT FW	ACCGATGTTGCGCGATAAC
<i>glnA</i> RT RV	CTCAGACAGACCGGCATATTT
<i>glnG</i> RT FW	ACCGCGCATTCCGATTTA
<i>glnG</i> RT RV	GAGCGACGGCTTCATCAATA
<i>glnL</i> RT FW	GAAGTGACGCTGGTGATTGATAG

<i>glnL</i> RT RV	GCGCCATTCGAGCAGTATAA
<i>lon</i> RT FW	CGCAGATGTGGCAATGACCG
<i>lon</i> RT RV	CGCTTCACAGGATGAATATCCAGATC
<i>marA</i> RT FW	AATGGCACCTGCAACGGATGTTA
<i>marA</i> RT RV	ATGGTTCAGCGGCAGCATATACCGT
<i>marR</i> RT FW	AAAGTGCTGTCTGTGATCTCGGCG
<i>marR</i> RT RV	TGAGCAAATACTCAAGCGTTGCCAC
<i>micF</i> RT FW	ACAGAATCTTCATTCGCAACTA
<i>micF</i> RT RV	GGTAAACAGACATTCAGAAAGTGA
<i>ompC</i> RT FW	GACGCAGGTTCTTCGATTAT
<i>ompC</i> RT RV	TAAAGTTGTCAGCGCCGTAG
<i>ompF</i> RT FW	GCGCCTATACCGATAACTACAT
<i>ompF</i> RT RV	CCCTGATACTGGATACCGAAAG
<i>ompR</i> RT FW	GCGCTACTGGAACGTTATCT
<i>ompR</i> RT RV	CCTTCGCCGTGACCATAAT
<i>ramA</i> RT FW	CGCTCAGGTTATCGACACGATTGTC
<i>ramA</i> RT RV	GACAAATATCATACACCTTCTGGTCGGTG
<i>tolC</i> RT FW	CGGTAACTCGGTCGGTACACGTAC
<i>tolC</i> RT RV	CTGCGGCAGCATCTTGATCTGGCGT

6.2 Métodos

6.2.1 Técnicas microbiológicas

6.2.1.1 Mantenimiento de microorganismos

Todas las cepas utilizadas y generadas en este trabajo fueron conservadas a -80 °C en criotubos en medio BHI en glicerol al 20% (v/v). Los microorganismos fueron recuperados de la congelación a -80 °C en placas de agar LB suplementado con antibiótico si correspondiere. Las placas fueron incubadas durante la noche a la temperatura adecuada para cada caso.

6.2.1.2 Condiciones de cultivo bacteriano

Para la siembra en placa de Petri, se seleccionó una colonia y se sembró en una placa de agar LB por el método de siembra por estría cruzada, que se cultivó durante la noche a 30 o 37 °C, según corresponda. De esta siembra se tomó una colonia bacteriana y se inoculó en 2 mL de medio de cultivo adecuado, que se mantuvo en condiciones aeróbicas y agitación durante la noche a 30 °C o 37 °C, o hasta la densidad óptica leída a 600 nm (DO₆₀₀) necesaria según el experimento. Cuando fue necesario, los medios para las placas fueron suplementados con antibióticos o se tamponaron con *buffer* fosfato pH 7,0.

Los cultivos bacterianos se realizaron rutinariamente a 37 °C en forma aeróbica en caldo LB. Estos medios se tamponaron con *buffer* fosfato pH 7,0 cuando fue necesario. Los cultivos en medio sólido se llevan a cabo adicionando 15 g/L de agar a los medios líquidos correspondientes. Aquellas cepas que poseían plasmidios de replicación termosensible

como pKD46 y pCP20 se incubaron a 30 °C. Para eliminar estos plasmidios, las cepas se crecieron sin selección a una temperatura no permisiva (42 °C).

6.2.1.3 Ensayo de susceptibilidad por el método de difusión en agar

Para los ensayos de susceptibilidad a distintos antimicrobianos, se realizó el siguiente procedimiento. Se preparó placas de Petri con 20 mL de agar MH pH 7,3. Se preparó un inóculo de 3 mL de cada mutante seleccionada hasta una DO₆₀₀ de 0,5. Alcanzada la DO₆₀₀, el inóculo se diluyó 1000 veces (con suero fisiológico). Se inocularon las placas con 100 µL del inóculo anterior y con un rastrillo esterilizado se realizó la siembra asegurando una distribución homogénea. Se colocó un sensidisco estéril en el centro de la placa sembrada y sobre él 5 µL del antimicrobiano a ensayar. Después de 16-18 horas (h) de incubación a 37 °C se examinó y se midió con una regla el diámetro del halo que comprende el borde de inhibición ^{72,73}. Al medir los diámetros de los halos se aproximó al siguiente milímetro ⁷⁴. Para calcular el “n” muestral se realizó el siguiente procedimiento: cultivos de cada cepa se sembraron en triplicado sobre agar MH, a cada placa del triplicado se le realizó dos mediciones del diámetro del halo de inhibición y se obtuvo el promedio por placa. Luego se promedió el resultado de la medición del triplicado técnico, esto se repitió 3 veces para obtener triplicado biológico.

6.2.1.4 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Esta prueba se realizó para determinar cambios en la susceptibilidad *in vitro* de las cepas en estudio frente a diferentes concentraciones de un antimicrobiano, según correspondió.

La CIM está definida como la determinación de la concentración más baja de un agente

antimicrobiano requerida para prevenir el crecimiento de un cultivo, después de una incubación durante la noche en una prueba de susceptibilidad de dilución en agar o caldo, bajo las condiciones de prueba definidas ⁷⁵⁻⁷⁸. Permite encontrar el umbral macroscópicamente observable del inicio de la actividad inhibitoria del antimicrobiano sobre el crecimiento bacteriano ⁷⁹. Para determinar la CIM se preparó concentraciones seriadas en base 2 del fármaco, que después fue inoculado con las cepas bacterianas a estudiar.

6.2.1.4.1 Estándar de turbidez para preparación del inóculo

Para estandarizar la densidad del inóculo para las pruebas de susceptibilidad, se utilizó como criterio el estándar de turbidez de BaSO₄ a estándar 0,5 McFarland (equivalente a 1x10⁸ UFC/mL). La comparación entre el estándar y la turbidez de las suspensiones a evaluar permite seleccionar la dilución adecuada ⁷⁷. Para ello, se preparó un preinóculo de las cepas a estudiar, se dejó con agitación a 37 °C durante la noche. Luego, 10 µL fueron transferidos a 2 mL de medio de cultivo LB y puestos en agitación hasta superar la turbidez 0,5 McFarland.

Los cultivos fueron centrifugados a 13.000 g por 3 min a 4 °C y lavados con NaCl 0,9% tres veces. Luego el sedimento se suspendió en 500 µL de NaCl para el ajuste de la turbidez. Para cada cepa a estudiar, se preparó un tubo de ensayo con 5 mL de NaCl 0,9 % y se transfirió 30-60 µL del inóculo lavado en NaCl 0,9% del punto anterior hasta conseguir la turbidez 0,5 McFarland. Esto resultó en una suspensión que contiene aproximadamente 1 a 2 x10⁸ UFC/mL para *E. coli* ATCC 25922. Antes de los 15 min de

preparación, esta suspensión se diluyó en solución salina 500 veces, alcanzándose un valor aproximado de 2×10^5 UFC/mL (rango de 2 a 8×10^5 UFC/mL). Así después de la inoculación de 50 μ L de bacteria, cada pocillo con 200 μ L contuvo aproximadamente 5×10^4 UFC.

Para la preparación de las microdiluciones de antibiótico, se rellenó todos los pocillos de la placa ELISA con 150 μ L de medio LB. A partir de la solución *stock* del antimicrobiano, se preparó una solución al menos 4 veces mayor que la CIM descrita en la literatura. Se rellenó la primera columna de la placa de ELISA con 150 μ L de la solución del antimicrobiano preparado, se mezcló 10 veces y se realizó la dilución seriada en base dos. Utilizando un repetidor Combitip®, se agregó a cada pocillo 50 μ L de cada una de las cepas en estudio (de acuerdo con lo señalado en el párrafo anterior), el volumen final de cada pocillo fue de 200 μ L. Los ensayos se realizaron en triplicado. Las placas se cultivaron durante la noche en estufa a 37 °C y se leyó a DO_{600} al día siguiente en un lector de Elisa. La lectura de la CIM correspondió a la concentración más baja de antibiótico en la cual no hubo crecimiento visible ⁷⁶.

6.2.1.5 Curvas de crecimiento

Una colonia de la cepa de interés fue inoculada en 2 mL de caldo LB o M9 y cultivadas con agitación durante la noche a 37 °C. Alícuotas de 200 μ L fueron transferidas a 20 mL de caldo LB fresco (dilución 1:100) y agitadas a 37 °C. Usando caldo LB estéril como referencia, la DO_{600} fue medida cada 1 h por al menos 10 h y a las 24 h. Para el ensayo de inducción con AHTET en medio M9, 200 μ L de un preinóculo de *S. Typhi glnA^{TD}* fueron

transferidos a 20 mL de caldo M9 fresco con y sin AHTET, respectivamente. La DO₆₀₀ fue medida cada 1 h por al menos 10 h, a las 24 h y 48 h.

6.2.1.6 Ensayo de aglutinación

La confirmación del serotipo de las cepas mutantes de *S. Typhi* generadas durante este trabajo, se realizó mediante un ensayo de aglutinación usando un antisuero policlonal comercial (Denka Seiken). Para ello, se cultivó las cepas bacterianas en medio LB y se tomó una alícuota de 50 a 100 µL del cultivo, la que se depositó sobre una lámina de vidrio. A la suspensión bacteriana se agregó una gota de antisuero (10 µL aproximadamente) contra el antígeno O9 de *S. Typhi* (antisuero *Salmonella* O grupo D), se mezcló suavemente y se observó la aglutinación por inspección visual.

6.2.2 Técnicas genéticas para la construcción de cepas mutantes de *S. Typhi*

6.2.2.1 Mutagénesis aleatoria de *S. Typhi* con el transposoma EZ-Tn5TM <R6K_{ori}/KAN-2>TM

Para la obtención de la colección de *S. Typhi* *zxx::EZ-Tn5*, se siguió el siguiente protocolo. Se cultivó durante la noche a 37 °C una colonia de *S. Typhi* STH2370 en 2 mL de medio de cultivo LB con agitación constante. De este cultivo, se tomó dos alícuotas de 300 µL que se diluyeron en dos matraces con 30 mL de medio LB, cultivándose hasta una DO₆₀₀ 0,5. Luego, el cultivo de cada matraz se sedimentó a 4.500 rpm por 10 min y se siguió el siguiente procedimiento: se eliminó el sobrenadante y se lavó el sedimento con 40 mL de agua destilada estéril fría, se centrifugó a 4.500 rpm por 10 min a menos de 4 °C, procedimiento que se repitió tres veces.

Posteriormente, el sedimento de bacterias se resuspendió en 100 μ L de agua para biología molecular, se traspasó a un tubo *Eppendorf* de 1,5 mL, se agregó 1,4 mL de agua y se continuó lavando el sedimento con agua calidad HPLC, que se centrifugó a 13.000 rpm a menos de 4 °C, paso que se repitió otras tres veces. Terminados los lavados, se suspendió el sedimento bacteriano en 100 μ L de agua para biología molecular.

Se tomó una alícuota de 5 μ L del transposoma EZ-Tn5 <R6K γ ori/KAN-2>TM y se agregó a 95 μ L del cultivo de *S. Typhi* reconstituido, se mezcló y se dejó en hielo un par de min y se trasvasijó a la cubeta de electroporación. Como control, el sedimento restante de *S. Typhi* sin transposoma fue electroporado.

Para la transformación a cada cubeta de 0,1 cm se aplicó una carga de 1,8 kV, se leyó la constante de electroporación e inmediatamente se agregó 100 μ L de medio LB a la cubeta y se mezcló. Se extrajo el contenido de la cubeta y se llevó a un tubo con 1 mL de medio LB que se dejó en recuperación por 45 min a 37 °C con agitación constante. A partir de las bacterias recuperadas, se preparó subcultivos con 100 μ L de cultivo sin diluir, y 100 μ L con cultivos diluidos 10 y 100 veces, que se sembraron inmediatamente en placas LB KAN y se cultivaron en estufa a 37 °C por la noche.

El volumen restante de cultivo de la recuperación se mantuvo a 4 °C durante la noche. Al día siguiente se revisó las placas obtenidas por inspección visual y se seleccionó la dilución de la placa que dio de 100 a 200 colonias. Con el caldo del cultivo de recuperación que se conservó se sembró la dilución de bacterias seleccionada en placas LB KAN. Las

colonias obtenidas de estas siembras fueron posteriormente seleccionadas y ordenadas en placas de Petri con agar LB KAN.

6.2.2.2 Clonamiento y secuenciación de mutantes de *S. Typhi* STH2370 *zxx::EZ-Tn5* seleccionadas

A las mutantes *S. Typhi zxx::EZ-Tn5* seleccionadas del *screening* se extrajo DNA genómico según el punto 6.2.3.1.3, que fue digerido con EcoRV (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Luego, el DNA fue ligado con DNA ligasa T4 (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones dadas por el proveedor. Las reacciones de ligación fueron dializadas usando filtros de membrana de 0,025 μm (Millipore) para luego ser electroporado en una cepa de *E. coli* DH5 α pir electrocompetente, según lo descrito en el punto 6.2.2.3.3. Desde las transformantes seleccionadas en placas LB KAN, se extrajo el DNA plasmidial según lo descrito en 6.2.3.1.4. Obtenido el DNA plasmidial, se realizó una electroforesis (ver 6.2.3.1.1), se cuantificó el DNA, se midió la razón $A_{260/280}$ como medida de pureza y las muestras fueron enviadas a secuenciar.

Las secuencias fueron obtenidas por el método de Sanger según lo indicado en 6.2.2.6. Recibidas las secuencias, se utilizó el programa informático *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST[®]) para comparar la secuencia obtenida y así encontrar el lugar y la orientación de la inserción del transposón Tn5 en el genoma de las mutantes seleccionadas.

6.2.2.3 Reemplazo alélico por transformación directa con productos de PCR (“*Red-Swap*”)

Las mutantes se obtuvieron mediante la técnica de reemplazo alélico por transformación directa con productos de PCR. Esta técnica permite la interrupción de genes e involucra recombinación homóloga entre los productos de PCR y el gen blanco. Para esto, se utiliza el sistema de recombinación *Red-Swap* del fago Lambda (λ)⁷¹.

6.2.2.3.1 Construcción de la cepa receptora

La mutagénesis se realizó sobre *S. Typhi* STH2370, previamente electrotransformada con el plásmido termosensible pKD46. La cepa *S. Typhi* STH2370/pKD46 se obtuvo por electrotransformación. Para ello, se cultivó *S. Typhi* STH2370 en 2 mL de caldo LB a 37 °C, con agitación constante hasta una DO₆₀₀ de ~1,4. Se centrifugó 1 mL del cultivo a 10.000 $\times g$ por 3 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y el sedimento se suspendió en 1 mL de agua para biología molecular estéril fría. Se lavó y se repitió el mismo procedimiento 5 veces. Finalmente, las células se suspendieron en 70 μ L agua destilada estéril para obtener una suspensión bacteriana de 100 μ L. Se mezcló 99 μ L de células con 1 μ L de DNA de plásmido pKD46 previamente dializado por 30 min y se electrotransformó en un electroporador *Eppendorf Eporador* a un voltaje de 1,8 kV. Inmediatamente después de electroporar, se agregó 1 mL de medio LB y se incubó a 30 °C por 1 h. Luego, las transformantes se sembraron en placas de agar LB con AMP 100 μ g/mL. Las placas se incubaron durante la noche a 30 °C. Finalmente, se seleccionó uno de los clones resistentes a AMP, obteniéndose la cepa STH2370/pKD46 u otra cepa según corresponda.

6.2.2.3.2 Obtención del producto de PCR para mutagénesis

Para la obtención de estos productos se diseñó parejas de partidores de aproximadamente 60 pb, cuyos extremos 5' contienen 40 pb idénticos a las regiones que flanquean al gen a mutar. A su vez, el extremo 3' de los partidores contienen 20 nucleótidos que aparean con secuencias presentes en el plasmidio pKD4. Este plasmidio posee clonado un casete de resistencia que codifica el gen *aph* que confiere resistencia a KAN, flanqueado por secuencias de consenso FRT.

Para la amplificación del casete de resistencia por PCR, se utilizó como templado el plasmidio pKD4 y los partidores diseñados para cada transformación (explicados en el párrafo anterior). Terminado el ciclo de amplificación, se comprobó el tamaño del amplicón por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Obtenido el tamaño adecuado, se purificó la banda utilizando el kit *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System*. Para comprobar la eficiencia de la purificación a una alícuota de 3 µL de producto de PCR purificado se le realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Finalmente, se cuantificó la cantidad de DNA presente en la muestra, almacenándose a 4 °C hasta su utilización para electrotransformación.

6.2.2.3.3 Preparación de células electrocompetentes de la cepa receptora y transformación por electroporación

A partir de un preinóculo de la cepa STH2370/pKD46 en LB AMP, se cultivó 30 mL caldo LB con 30 µL de AMP 100 µg/mL y 300 µL de L-arabinosa 1 M para inducir la expresión de la recombinasa Red a 30 °C con agitación constante, hasta una DO₆₀₀ de 0,4. Alcanzada esta DO, se preparó las células de este cultivo para la electroporación. Para

ello, el cultivo se centrifugó a 4.500 rpm por 10 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y lavó con 40 mL de agua destilada estéril y fría. Este procedimiento se repitió tres veces, seguido de 3 lavados adicionales de 1 mL con agua para biología molecular estéril. Finalmente, el sedimento se suspendió en 70 µL de agua para biología molecular para obtener un volumen final aproximado de 100 µL. Se mezcló 90 µL de bacterias y 6 µL de producto de PCR obtenido en 6.2.2.3.2 dializado y se electrotransformó en un electroporador *Eppendorf Eporador* a un voltaje de 1,8 kV.

Las bacterias transformantes fueron recuperadas en medio de cultivo LB a 37 °C con agitación por 1 h para luego ser seleccionadas a 37 °C en placas de agar LB KAN 50 µg/mL. De las bacterias transformantes obtenidas, se seleccionó colonias que fueron estriadas y aisladas en placas de LB KAN. Para la eliminación del plasmidio pKD46, se aisló colonias en placas LB KAN las que luego fueron estriadas en paralelo en placas de agar LB KAN y agar LB AMP. Finalmente, las bacterias seleccionadas fueron cultivadas a 42 °C durante la noche. Se eligió aquellas bacterias que crecieron en placas LB KAN y susceptibles a AMP. Finalmente, se confirmó la presencia del casete génico en cada mutante generada por PCR, utilizando las parejas de partidores adecuados (Tabla 2) y posterior electroforesis de los productos de PCR.

6.2.2.3.4 Remoción de marcadores de selección flanqueados por sitios FRT

Una vez verificada la inserción del casete de resistencia y la pérdida del plasmidio pKD46, es posible eliminar el gen de resistencia. Para ello, se transformó las cepas mutantes con el plásmido pCP20 (AMP^R, CAM^R, *oriT^S*), en un electroporador *Eppendorf Eporador* a

un voltaje de 1,8 kV. Las bacterias transformantes fueron recuperadas en medio de cultivo LB a 37 °C en agitación por 1 h y luego seleccionadas a 37 °C en placas de agar LB.

Para comprobar la pérdida tanto del plasmidio como de la resistencia insertada en el cromosoma, se seleccionó varias colonias transformadas con el plásmido pCP20, que se aislaron dos veces sucesivas en placas de agar LB a 37 °C. Luego se seleccionó colonias realizándose pases sucesivos en agar LB incubando las placas a 42 °C. Tras tres o cuatro pases, se comprobó la pérdida de los marcadores de la mutación y del plasmidio pCP20 mediante un pase simultáneo en placas de agar LB KAN 50 µg/mL y LB AMP 100 µg/mL que se incubó a 42 °C durante la noche ⁷¹. Esto se repitió hasta que la cepa mutante creciera sólo en la placa LB y no en las placas LB KAN y LB AMP. Finalmente, las cepas mutantes fueron verificadas por PCR, utilizando partidores externos e internos descritos en Tabla 2.

6.2.2.4 Construcción de mutantes *S. Typhi* STH2370 dependientes de tetraciclina, por reemplazo alélico y transformación directa con productos de PCR

Primeramente, se diseñó partidores según lo descrito en el punto 6.2.2.3.2. Usando la técnica de intercambio alélico, descrita en el punto 6.2.2.3, se insertó el elemento *tetRA* en el promotor del gen *glnA*. Asimismo, se construyó las mutantes inducibles por tetraciclina para el promotor del gen *ompF* y el gen *STY4173* como un control no relacionado. Debido a la interferencia de la bomba de expulsión de tetraciclina TetA, que se inserta en la membrana interna, se quitó el gen *tetA* y se mantuvo su promotor. Para esto, *tetA* se reemplazó por un gen de resistencia a KAN. Finalmente, se removió el casete

de resistencia a KAN utilizando el plasmidio pCP20, obteniéndose las mutantes FRT tetraciclina dependiente (TD).

6.2.2.5 Cultivos de bacteriófagos

El bacteriófago P22 HT105/1 int-201 es un derivado mutante del fago P22, que posee una alta frecuencia de transducción, característica muy conveniente para aprovecharlo en transducciones generalizadas ⁸⁰. Para la obtención de los lisados de este fago, se creció una colonia de la cepa dadora en 2 mL de medio de cultivo LB suplementada con los antibióticos correspondientes, a 37°C con agitación constante hasta estado estacionario. Posteriormente, se mezcló 100 µL del cultivo saturado con 2 mL de medio con fago P22 y se incubaron por 16 h a 37°C con agitación constante. A los lisados producidos se le agregó 200 µL de cloroformo y se pasó por vortex por 10 min, posteriormente se transfirió a un tubo Eppendorf y se centrifugó por 2 min a 12.000 rpm; se rescató el sobrenadante y se transfirió a un tubo limpio y se agregó 10 µL de cloroformo y se pasó por vortex durante 10 s y se conservaron a una temperatura de 4°C.

Las transducciones posteriores de los lisados de *S. Typhimurium* se basaron en el siguiente procedimiento ⁸¹: se inoculó una colonia de la cepa receptora en 2 mL de LB a 37°C con agitación constante, se mezcló 1 mL de la bacteria en estado estacionario con 1 mL del lisado requerido e incubar la solución por 1 h a 37°C, para la expresión fenotípica de los genes contenidos en el bacteriófago. Luego, volúmenes de 200 µL de la transducción fueron sembrados con un rastrillo de vidrio estéril en placas de Petri con el medio LB y se incubó a 37°C por 16 h.

6.2.2.6 Secuenciación

La determinación de las secuencias en el entorno de las inserciones del transposón EZ-Tn5TM de las mutantes *S. Typhi* STH2370 *zxx::EZ-Tn5* y otras construcciones, fueron realizadas mediante secuenciación Sanger. Esta tarea fue realizada mediante externalización de servicios a la Unidad de Secuenciación de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Católica.

6.2.3 Técnicas de biología molecular y bioquímicas

6.2.3.1 Técnicas experimentales con DNA

6.2.3.1.1 Electroforesis en gel de agarosa

El DNA plasmidial, cromosomal y los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa. Los geles se prepararon usando agarosa al 1% en tampón TAE. Para el análisis de RNA, se agregó a la preparación del gel hipoclorito de sodio a una concentración final al 1%. Las muestras de DNA a analizar se mezclaron con el volumen requerido de tampón Blue II (6x) antes de ser cargadas en el gel. La electroforesis se realizó a 100 V constantes, durante 45 min, luego de lo cual el gel se tiñó por inmersión en una solución de bromuro de etidio a 0,5 µg/mL en TAE por 10 min. Las bandas de DNA o RNA presentes en los geles se visualizaron y se fotografiaron sobre un transiluminador UV.

6.2.3.1.2 Aislamiento de fragmentos de DNA

Para el aislamiento de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa, una vez visualizado el fragmento del tamaño esperado, éste se recortó del gel. De manera rutinaria,

los fragmentos se purificaron utilizando el kit comercial *Wizard SV gel and PCR clean-up system*, siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante.

6.2.3.1.3 Extracción de DNA cromosomal

Para cada extracción, se utilizó el kit de purificación DNA genómico *Wizard® Genomic DNA Purification*, realizándose el siguiente procedimiento: una colonia se sembró en 2 mL de medio de cultivo LB y se dejó en agitación constante a 37 °C por la noche. El cultivo se centrifugó a 13.000 g a 4 °C por 5 min, se descartó el sobrenadante y al sedimento se agregó 600 µL de solución de lisis. El sedimento se pipeteó y solubilizó con suavidad para mezclar y se dejó en incubación por 5 min a 80 °C. Se enfrió a temperatura ambiente y se agregó 3 µL de solución de RNAasa. Se mezcló e incubó a 37 °C por 1 h, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se agregó 200 µL de solución de precipitación de proteínas y se agitó en vórtex vigorosamente e incubó en hielo por 5 min. Se centrifugó a 13.000 g por 10 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio con 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente, se mezcló por inversión y se centrifugó a 13.000 g a 4 °C por 5 min y se descartó el sobrenadante. Se agregó al sedimento 600 µL de etanol al 70%, se mezcló y se dejó en hielo por 5 min. Posteriormente, se centrifugó por 5 min a 4 °C a 13.000 g, se aspiró el etanol y se dejó secar al aire el sedimento hasta que se evaporó completamente el etanol. Al sedimento se agregó 100 µL de una solución de rehidratación y se dejó a 65 °C por 1 h o a 4 °C durante la noche. Se verificó la presencia de DNA cromosomal por electroforesis, se cuantificó y se midió la razón $A_{260/280}$. Esta solución se mantuvo a -20 °C hasta su utilización.

6.2.3.1.4 Extracción de DNA plasmidial

Los plasmidios y vectores recombinantes utilizados en este estudio fueron purificados usando el kit de extracción de plasmidios *Wizard® Plus Miniprep* (Promega) según las instrucciones del proveedor. Brevemente, se removió el medio de cultivo a 13.000 g a un preinóculo de 2 mL cultivado durante la noche con agitación, con el antibiótico y temperatura adecuados para selección y crecimiento. El sedimento fue resuspendido, lisado y neutralizado para finalmente centrifugar a máxima velocidad por 10 min. El lisado fue transferido a una columna de unión de DNA, que fue lavada dos veces removiendo la solución por centrifugación. Finalmente, el DNA unido a la columna fue removido con agua libre de nucleasas, por centrifugación. La extracción se verificó por electroforesis, se cuantificó y midió la razón $A_{260/280}$. Esta solución se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

6.2.3.1.5 Reacciones de amplificación por PCR

Las amplificaciones de ADN se realizaron en un termociclador *Verit Thermal Cycler*. Cada reacción de amplificación de ADN contenía $10\text{ }\mu\text{M}$ de cada partidor, dNTPs $0,2\text{ mM}$ cada uno, MgCl_2 $1,5\text{ mM}$, 1 a 2 unidades de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) y aproximadamente 100 ng de DNA molde en un volumen de $25\text{ }\mu\text{L}$. Las condiciones utilizadas para las amplificaciones por PCR fueron 1 ciclo de desnaturalización ($94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min), y 30 ciclos de amplificación de $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 45 s; $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 45s (temperatura que varió según la T_m de los partidores) y $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un tiempo variable según tamaño del amplicón (1 kb/minuto) y un ciclo de elongación final ($72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min). Los productos de PCR

se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Para la amplificación de ADN que requirió de una fidelidad elevada, se utilizó la enzima *Taq* DNA polimerasa *Platinum*TM.

6.2.3.1.6 Clonamiento de productos de PCR en vectores

Amplicones de productos de PCR del gen *glnA* fueron clonados en vectores usando *TOPO*[®] *TA Cloning*[®] *Kit* o *pBAD TOPO*[®] *TA Expression Kit*. Brevemente, se amplificó productos de PCR con la enzima *Taq* DNA polimerasa *Platinum*TM. Como *Taq* DNA polimerasa regular, *Taq Platinum*TM tiene una actividad transferasa terminal no dependiente del templado que agrega una sola desoxiadenosina (A) a los extremos 3' de los productos de PCR. Se mezcló 2 µL de producto de PCR fresco, 1 µL de solución salina diluida y 1 µL de vector en un volumen final de 6 µL e incubados a temperatura ambiente por 5 min. Trascurrido este tiempo la mezcla fue puesta en hielo.

El fabricante provee este plasmidio linealizado, con una timidina en su terminal 3'. Esto permite a los productos de PCR ligarse eficientemente al vector mediante la acción de una topoisomerasa I unida a dicho vector. Luego, el vector circularizado fue electrotransformado en *E. coli* DH5αλpir. Una vez recuperadas las bacterias transformadas, distintos volúmenes fueron sembrados en placas de agar LB AMP e incubados durante la noche a 37 °C. Se seleccionó clones, que fueron incubados en caldo LB AMP para posterior extracción del DNA plasmidial utilizando el *kit Wizard*[®] *Plus Miniprep* (Promega). Luego, utilizando partidores externos e internos y amplificación por PCR, se verificó la direccionalidad de la inserción en el vector.

6.2.3.2 Técnicas experimentales con proteínas

6.2.3.2.1 Obtención de proteínas de membrana externa (PME)

Se crecieron bacterias en 2 mL de medio LB durante la noche a 37 °C con agitación. El cultivo se centrifugó por 10 min a 13.000 g y se eliminó el sobrenadante. El sedimento se lavó y se resuspendió en 1 mL de Tris-HCl pH 8, 10 mM (tampón 1). Luego, la muestra de bacterias fue lisada por sonicación por 100 s de manera continua en hielo. La mezcla obtenida, fue centrifugada a 7.000 g por 5 min y el sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 13.000 g por 45 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó y el sedimento se resuspendió en 500 µL de Tris-HCl pH 8, 10 mM; Triton X-100 2%; MgCl₂ 10 mM (tampón 2) y se incubó por 30 min a 37 °C, con agitación ocasional. Finalmente, la mezcla se centrifugó a 13.000 g por 45 min, se eliminó el sobrenadante y el sedimento de PME se suspendió en 50 µL de Tris-HCl pH 8, 100 mM; SDS 2% (tampón 3). La concentración de proteínas se determinó usando el kit de medición de proteínas *BCA proteins* (Pierce®) a 562 nm. Las muestras fueron conservadas a -20 °C hasta su uso.

6.2.3.2.2 Electroforesis en geles desnaturantes de poliacrilamida-SDS

Las fracciones de PME se resolvieron mediante el método de electroforesis en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (*SDS-PAGE*)⁸². A las muestras de proteínas se le agregó un volumen de tampón de carga 2X y se calentó en placa calefactora a 95 °C por 5 min. El gel se sumergió en tampón de corrida (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS) y se cargó con 10 a 20 µL de muestra. La electroforesis se realizó a 50 V para el gel concentrador y luego a 100 V para el gel resolutivo con el equipo *Mini-PROTEAN*

Tetra Cell de Biorad. Se utilizó como estándar de peso molecular de proteínas el *BenchMark™ Pre-Stained Protein Standard Ladder* (ThermoFisher Scientific). Terminada la electroforesis, el gel se tiñó con una solución de tinción de azul de *Coomassie* (0,2% Azul brillante de Coomassie R-250, 10% ácido tricloroacético, 25% isopropanol) con agitación suave con balancín durante la noche. Luego, el gel fue lavado con ácido acético 10% para eliminar el exceso de tinción ^{83,84}.

6.2.3.2.3 Análisis de las imágenes de geles desnaturantes de poliacrilamida-SDS

El análisis densitométrico del perfil electroforético de las proteínas de membrana externa se realizó a partir de las imágenes digitales de los geles. Para esto se analizaron las bandas correspondientes a OmpF con el programa ImageJ (*Image Processing and Analysis in Java*) desarrollado en *National Institute of Health* ⁸⁵. Usando la herramienta de selección de área, se seleccionaron las bandas correspondientes a OmpF, se pidió al programa estimar la densidad de pixeles y los picos de densidad óptica resultantes fueron cortados a nivel de la línea basal para comparar la densidad óptica de la cepa mutante y compararla a la muestra control ⁸⁵.

6.2.3.3 Técnicas experimentales con RNA

6.2.3.3.1 Extracción de RNA total

6.2.3.3.1.1 Extracción de RNA total usando tioisocianato de guanidina (*Trizol*®, *Invitrogen*)

Este método se utilizó para todos los análisis de expresión relativa. Se creció 2 mL de preinóculos de las cepas correspondientes en medio de cultivo LB tamponado a pH 7,0 durante la noche a 37 °C con agitación. Posteriormente, se subcultivó alícuotas de 200

μL de estas cepas en 20 mL del medio de cultivo tamponado hasta DO_{600} 0,5. Antes de iniciar la extracción y con el objeto de inactivar las nucleasas, las superficies de los mesones, equipos, insumos y pipetas fueron limpiados con una solución de hipoclorito al 1% y una solución de reactivo de descontaminación *Rnase Away*[®].

Brevemente, los cultivos fueron lavados dos veces en agua libre de nucleasas y centrifugados a 13.000 g a 4 °C, suspendidos en lisozima 1 mg/mL e incubados 5 min en hielo con 1 mL de *Trizol*[®]. Luego, las muestras fueron agitadas e incubadas nuevamente en hielo por 5 min, se agregó 200 μL cloroformo con agitación por 1 min, siendo incubadas nuevamente en hielo por 5 min y centrifugadas por 15 min a 12.000 g a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante de las muestras y se agregó 500 μL de isopropanol frío que se mezcló por inversión y seguido de incubación hielo por 30 min. Luego, las muestras se centrifugaron por 10 min a 12.000 g y se eliminó el sobrenadante, se agregó 500 μL de etanol 70 % frío y se centrifugó durante 5 min a 7.500 g a 4 °C. Se eliminó el etanol de las muestras, las que posteriormente se suspendieron en 40 μL de agua sin nucleasas. Las muestras obtenidas se conservaron a -80 °C.

6.2.3.3.1.2 Extracción de RNA total con fenol ácido caliente

Esta metodología se utilizó para el análisis del transcriptoma de la mutante *glnA* y de *S. Typhi* STH2370. Se centrifugó 20 mL de cultivo (13.000 x g, 10 min, 4 °C), y el sedimento celular se suspendió y lavó con agua libre de nucleasas. Luego, el sedimento se suspendió en 400 μL de *buffer* de lisis (30 μL de acetato de sodio pH 5,5, 250 μL de SDS 10 %, 5 μL EDTA 1 M pH 8,0, hasta completar un volumen de 5 mL) y se agregó

fenol ácido (pH 5,2) precalentado a 65 °C. Se agitó la mezcla de manera constante y vigorosa por 5 min y se dejó en hielo por 10 min. A continuación, se centrifugó a 13.000 x g por 4 min a temperatura ambiente. Se tomó la fase superior (fase acuosa) que se traspasó a un tubo con 500 µL de una solución de fenol ácido: cloroformo: alcohol isoamílico 25: 24: 1 y se agitó de manera constante y vigorosa durante 5 min, para luego incubar la mezcla en hielo por 10 min. Después se centrifugó a 13.000 x g durante 4 min a 20 °C, se recogió la fase acuosa superior que se traspasó a un tubo con 500 µL de cloroformo, se agitó por 5 min vigorosa y constantemente para luego incubar en hielo por 10 min. Se tomó la fase superior y se trasvasijó a un tubo con 55 µL de acetato de sodio 3 M pH 5,5, se mezcló para luego adicionar 1,5 mL de etanol 100% frío que se mezcló por inversión. Esta mezcla se incubó durante la noche a -80 °C. Pasado este tiempo se centrifugó 30 min a 13.000 x g a menos de 4 °C. Se eliminó el sobrenadante, se dejó secar los tubos con las muestras para eliminar el etanol residual y se adicionó 40 µL de agua libre de nucleasas. Las muestras obtenidas se conservaron a -80 °C.

6.2.3.3.1.3 Digestión con DNAsa I

Para eliminar las trazas de DNA, las muestras de RNA fueron digeridas con la enzima DNAsa I (*Promega*). En hielo, se prepararon reacciones que contenían 20 µL de las muestras de RNA obtenidas en 6.2.3.3.1.1 y 6.2.3.3.1.2; 3 µL de tampón DNAsa I 10X, 3 µL de DNAsa y 4 µL de agua libre de nucleasas. Las reacciones se incubaron a 37 °C por 30 min, luego se agregó 3 µL de solución de detención y se incubó por 10 min a 65 °C. Para comprobar la integridad del RNA extraído se realizó una electroforesis en gel

de agarosa al 1%, con hipoclorito de sodio al 1% y teñida con bromuro de etidio, donde se observó la integridad de las bandas del RNAr 16S y 23S. Las muestras fueron cuantificadas por espectrofotometría con el equipo *NanoDrop Epoch* de *Biotek*, se determinó la razón $A_{260/280}$ como medida de la pureza y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para las muestras que fueron enviadas a secuenciación masiva del transcriptoma, se utilizó DNasa recombinante (rDNase) del kit de remoción de DNA libre de DNA (Invitrogen). Brevemente, se agregó 0,1 volúmenes del *buffer* DNase 10X y 1 μL de rDNase I al RNA, se mezcló suavemente. Se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min. Se agregó 0,1 volúmenes de solución de detención (*DNase Inactivation Reagent*).

6.2.3.3.2 Transcripción reversa (RT)

A partir de cada muestra, se mezcló 1 μg de RNA libre de DNA con 1 μL de *Random hexamers* (Invitrogen), 1 μL de dNTPs y agua sin nucleasas hasta completar un volumen 13 μL . Las reacciones fueron mezcladas cuidadosamente e incubadas a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min y enfriadas inmediatamente en hielo. Se agregó 4 μL de tampón primera hebra 5X (*Ist strand buffer*) y 2 μL de DTT (Ditiotreitol) 0,1 M, mezclando suavemente. Las mezclas fueron incubadas a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 min y se agregó 0,5 μL de transcriptasa reversa *SuperScript® II* (Invitrogen) y se continuó la incubación a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 50 min. Las reacciones se detuvieron incubando a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min. Las muestras de cDNA obtenidas se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.2.3.3.3 PCR en tiempo real (RT-qPCR)

Las muestras de cDNA obtenidas en el punto anterior, se diluyeron 100 veces. Las muestras para la reacción se prepararon en un volumen final de 10 μL con 5 μL de *Brilliant II SYBR[®] Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies)*, 0,12 μL de partidor FW y RV, 0,07 μL de ROX (carboxi-X-rodamina), 1 μL de templado y 3,69 μL de H₂O destilada libre de nucleasas. Los ensayos de RT-qPCR se realizaron en un termociclador *Eco Real-Time PCR System Illumina[®]*. Fueron diseñados partidores específicos para cada gen utilizando la herramienta *Primerquest Tool* de *Integrated DNA Technologies*. Las condiciones utilizadas para las amplificaciones fueron 1 ciclo de activación de la polimerasa (95 °C por 10 min), 40 ciclos de amplificación (95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 20 s), un ciclo para análisis de curva de *Melting* (95 °C por 15s, 45 °C por 15 s y 95 °C por 15 s) y una incubación final (52 °C por 2 min).

La cuantificación de la expresión relativa se realizó utilizando la metodología del $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ usando como control endógeno el gen *dnaN* (subunidad beta de la DNA polimerasa III) y el gen *lon* (proteasa Lon)⁸⁶⁻⁸⁸

Previo a la realización de los experimentos de cuantificación relativa, se realizó la validación de los partidores utilizados, calculando la eficiencia de la amplificación. Para ello, se preparó una dilución seriada de DNA genómico de las muestras a evaluar y se realizó el ensayo de RT-qPCR. Mediante la gráfica del C_q obtenido de cada concentración frente al logaritmo del número de copias de DNA, se determinó la ecuación de la recta y se calculó la eficiencia a partir de la pendiente. Se utilizó la siguiente fórmula⁸⁶.

$$\text{Eficiencia} = 10^{(-1/m)} - 1$$

Se seleccionaron parejas de partidores que presentaron eficiencia de reacción similar. Validados los partidores se determinó de la expresión relativa de los genes de interés. Para la realización de los experimentos se utilizó el equipo Eco Real-Time PCR System de Illumina.

6.2.4 Técnicas informáticas

Se utilizó el programa informático *on-line* de alineamiento de secuencias de ADN *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST®). Este programa es una herramienta provista por *NCBI* que encuentra regiones de similitud en función biológica entre secuencias de DNA. Con esta base, es posible comparar datos de nucleótidos, nucleótidos traducidos y secuencias de proteínas con cada secuencia enviada en una consulta. Esta herramienta fue utilizada en el *screening* para comparar secuencias obtenidas y determinar la región del DNA en la que se insertó el transposón EZ-Tn5 en cada una de las mutantes. También, se utilizó esta herramienta para obtener las secuencias nucleotídicas a partir de secuencias las anotaciones de proteínas obtenidas desde el informe del análisis global del transcriptoma.

6.2.5 Expresión de resultados y Pruebas estadísticas

Los resultados presentados corresponden al promedio \pm desviación estándar (DE) del número de experimentos independientes indicados. Las figuras corresponden a resultados representativos de cada grupo de experimentos repetidos, al menos, 3 veces en forma independiente o lo que indique la figura. Para contrastar la normalidad de los resultados

obtenidos se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk. Para identificar significancia estadística entre las medidas se aplicó la prueba t de *Student* pareada de un factor de dos colas, con un error α de 5%.

7 RESULTADOS

7.1 Selección de una mutante *S. Typhi* STH2370 *zxx::EZ-Tn5*, con aumento en la susceptibilidad tras un *screening* fenotípico bajo condiciones selectivas

7.1.1 Mutagénesis aleatoria en *S. Typhi* STH2370 con el transposón EZ-Tn5TM por electroporación

De la electroporación de *S. Typhi* STH2370 con el transposón EZ-Tn5TM <R6K γ ori/KAN-2>TM (Epicentre®), se obtuvo una colección de 3.216 mutantes *S. Typhi* STH2370 *zxx::EZ-Tn5*.

7.1.2 Construcción de cepario de mutantes *S. Typhi* STH2370 *zxx::EZ-Tn5*

Las 3.216 mutantes *S. Typhi* STH2370 *zxx::EZ-Tn5* fueron ordenadas en 67 lotes de 48 mutantes cada uno, renovados cada dos meses en placas LB KAN, mantenidas a 4 °C (Figura 1). Estos lotes también fueron respaldados en placas de Elisa en medio BHI y glicerol al 20% y conservados a -80 °C. A cada mutante de la colección se le asignó un código para su identificación, compuesto por el número de lote, seguido del número columna y fila. Así, por ejemplo, el código L1C1F1, corresponde a la mutante que se encuentra en el lote N°1, fila 1, columna 1. Considerando como punto de referencia la anotación del número de lote en el reverso de la placa de Petri, las filas se numeraron de arriba hacia abajo y las columnas de izquierda a derecha, como se muestra en la Figura 1.

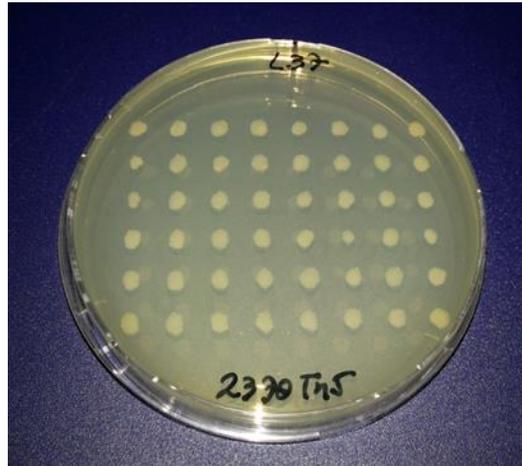


Figura 1. Colección de 48 mutantes *S. Typhi* STH2370 *zxx::EZ-Tn5*.

Para la construcción de un lote, las mutantes fueron sembradas de forma ordenada en agar LB Kan en un patrón de 6 x 8 y cultivadas durante la noche a 37 °C. Las placas se conservaron hasta 2 meses a 4 °C.

7.1.3 *Screening* fenotípico de mutantes *S. Typhi* STH2370 *zxx::EZ-Tn5* con concentraciones subletales de antimicrobianos

7.1.3.1 Selección de los antimicrobianos para la realización del *screening* fenotípico a las mutantes *S. Typhi* STH2370 *zxx::EZ-Tn5*

Ciprofloxacino, fluoroquinolona de primera generación, se escogió para el *screening* por ser el antibacteriano de elección para el tratamiento de la infección causada por *Salmonella Typhi* ². Cloruro de benzalconio, amonio cuaternario, es un antiséptico usado en formulaciones farmacéuticas como preservantes y es utilizado en el tratamiento de desinfección en plantas procesadoras de alimentos ^{89,90}. Su uso está siendo explorado en estrategias combinadas para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias formadoras de biopelículas ⁹¹. Por otra parte, la exposición de las bacterias a los biocidas puede seleccionar mutantes con susceptibilidad disminuida que a menudo muestran

también susceptibilidad disminuida a antibióticos, así los biocidas pueden actuar como agentes para seleccionar resistencia ⁹². Por esta razón pareció un compuesto interesante de explorar para la búsqueda de nuevos genes cuya inactivación aumenten la susceptibilidad a benzalconio. Finalmente, se escogió para realizar el *screening* el cobre (sulfato de cobre), este elemento ha sido conocido como agente antimicrobiano desde la antigüedad. Sin embargo, su potencial antimicrobiano está siendo investigado y caracterizado intensamente durante el último tiempo ^{37,93}.

7.1.3.2 Selección de la concentración del antimicrobiano para la realización del *screening* fenotípico a las mutantes *S. Typhi* STH2370 *zxx::EZ-Tn5*

La selección de las concentraciones para el *screening* se determinó revisando en la literatura la CIM de cada antibacteriano comunicado para *S. Typhi*. Posteriormente, se determinó la CIM experimental para cada uno de los antimicrobianos; para ello se utilizó la técnica de microdilución en caldo ^{75,94}. Obtenida la CIM experimental, se preparó placas de agar LB con concentraciones de los antimicrobianos (1/2 CIM) en estudio para la búsqueda de mutantes con susceptibilidad aumentada (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración de los antimicrobianos utilizados, para la selección de mutantes *S. Typhi* STH2370 *zxx::EZ-Tn5* en el *screening* bajo condiciones selectivas.

Antimicrobiano	CIM/2 determinada \pm DE	CIM referencia CLSI (CLSI, 2015)
Ciprofloxacino	0,053 \pm 0,0 mg/L	0,06 mg/L
Benzalconio	1,4 \pm 0,0 mg/L	No comunicada
Cobre	250 \pm 0,0 mg/L	No comunicada

Las cepas fueron cultivadas durante la noche a 37 °C en medio LB. Los cultivos se ajustaron a McFarland 0,5 en NaCl 0,9 % y se diluyeron 500 veces. Se mezclaron con concentraciones seriadas decrecientes del antimicrobiano. Luego de 24 h de incubación a 37 °C, se determinó la CIM. Los resultados se expresan como el promedio \pm DE (n=3).

7.1.3.3 Selección de mutantes *S. Typhi* STH2370 *zxx::EZ-Tn5* con cambios fenotípicos bajo condiciones selectivas

Con la información obtenida de la CIM experimental se preparó placas de Petri para el *screening* de mutantes con susceptibilidad aumentada. Las placas contuvieron el antimicrobiano a una concentración la mitad de la CIM ⁴² (Tabla 3). Utilizando un replicador de 48 puntas (Boekel), las 3.216 mutantes *S. Typhi* STH2370 *zxx::EZ-Tn5* fueron cultivadas con ciprofloxacino 0,053 μ g/mL, cloruro de benzalconio 1,4 mg/L y cobre 250 mg/L. De ellas, se seleccionó mutantes *S. Typhi* STH2370 *zxx::EZ-Tn5* que presentaron un aumento en la susceptibilidad al antimicrobiano ensayado respecto al control. Por inspección visual, una mutante fue considerada hipersusceptible si ésta no crece o disminuye su crecimiento a concentraciones permisivas del antibiótico en la cepa silvestre ⁴² (Figura 2).

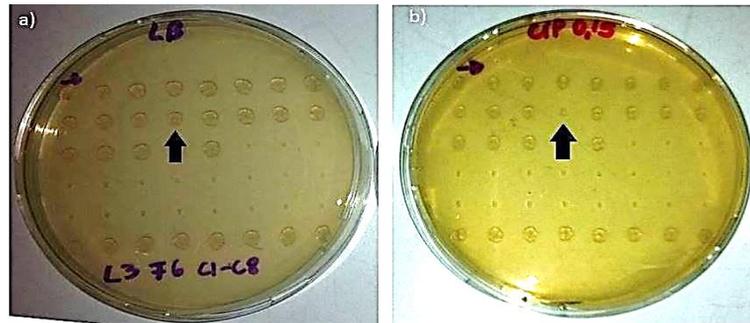


Figura 2. Screening a mutantes *S. Typhi* $zxx::EZ-Tn5$ con susceptibilidad aumentada a un antimicrobiano.

La flecha negra muestra el cambio fenotípico de una mutante *S. Typhi* STH2370 $zxx::EZ-Tn5$ cuando es expuesta a CIP. a) mutantes en placa con medio LB. b) mutantes en placa con medio LB CIP 0,053 $\mu\text{g/mL}$ (0,16 μM). Las placas fueron cultivadas durante la noche a 37 °C. (n=3).

Se encontró un total de 117 mutantes *S. Typhi* STH2370 $zxx::EZ-Tn5$ con un aumento en la susceptibilidad, de las que 43 fueron más susceptibles a ciprofloxacino, 51 a cloruro de benzalconio y 58 a cobre que la cepa silvestre.

7.1.3.4 Confirmación del cambio fenotípico en mutantes *S. Typhi* STH2370 $zxx::EZ-Tn5$ bajo condiciones selectivas, mediante el ensayo de susceptibilidad por el método de difusión en agar

Para la confirmación del cambio fenotípico de las mutantes encontradas en 7.1.3.3, se realizó un ensayo de susceptibilidad por el método de difusión en agar⁷². Se utilizó como criterio de corte un cambio mayor o igual a 6 mm en el diámetro del halo de la mutante probada comparada con el halo la cepa silvestre⁴⁵. De la realización de este ensayo, se obtuvo 27 mutantes *S. Typhi* STH2370 $zxx::EZ-Tn5$ con un halo mayor que la cepa control bajo el antimicrobiano ensayado. De éstas, 2 fueron más susceptibles que la cepa silvestre

a los tres antimicrobianos en estudio, 4 más susceptibles a dos y 21 más susceptibles a 1 antimicrobiano.

7.1.4 Determinación de la CIM en mutantes *S. Typhi* STH2370 *zxx::EZ-Tn5* seleccionadas, mediante la técnica de microdilución en caldo

Para comprobar el cambio en la CIM en las mutantes seleccionadas en el punto 7.1.3.4, se determinó la CIM utilizando la técnica de microdilución en caldo descrita en métodos. Los resultados confirmados de tres ensayos independientes son mostrados.

7.1.4.1 Resultados de la búsqueda de mutantes susceptibles a ciprofloxacino

El ensayo de determinación de la CIM de ciprofloxacino, mostró ocho mutantes cuya susceptibilidad aumentó al doble, una mutante fue cuatro veces más susceptible y una mutante 8 veces más susceptible que la cepa *S. Typhi* STH2370 silvestre (Tabla 4).

7.1.4.2 Resultados de la búsqueda de mutantes susceptibles a cloruro de benzalconio

El ensayo de determinación de la CIM de cloruro de benzalconio, mostró que 2 mutantes no tuvieron cambio en la CIM, mientras que otras 2 tuvieron una CIM 2 veces menor, 3 una CIM 4 veces menor, dos 8 veces menor y 1 mutante con una CIM 16 veces menor respecto la cepa silvestre (Tabla 5).

Tabla 4. CIM de ciprofloxacino en mutantes *S. Typhi* STH2370 *zxx::EZ-Tn5* candidatas que presentaron un halo mayor que la cepa silvestre.

Cepa	CIM ciprofloxacino µg/mL	CIM respecto al control
<i>S. Typhi</i> STH2370	0,078	Control
<i>S. Typhi</i> STH2370 <i>zxx::EZ-Tn5</i>		
L4C4F4	0,039	½ CIM
L6C1F2	0,0098	⅛ CIM
L21C4F4	0,039	½ CIM
L24C8F6	0,039	½ CIM
L31C8F3	0,039	½ CIM
L41C7F3	0,039	½ CIM
L43C7F2	0,039	½ CIM
L46C3F4	0,039	½ CIM
L60C8F6	0,02	¼ CIM
L64C7F2	0,039	½ CIM

Las cepas fueron cultivadas durante la noche a 37 °C en medio LB. Los cultivos se ajustaron a McFarland 0,5 en NaCl 0,9 % y se diluyeron 500 veces. Se mezclaron con concentraciones seriadas decrecientes de ciprofloxacino. Luego de 24 h de incubación a 37 °C, se determinó la CIM. Los resultados se expresan como el promedio ± DE (n=3).

Tabla 5. CIM de cloruro de benzalconio en mutantes *S. Typhi* STH2370 *zxx::EZ-Tn5* candidatas que presentaron un halo mayor que la cepa silvestre.

Cepa	CIM benzalconio mg/L	CIM respecto al control
<i>S. Typhi</i> STH2370	2,93	Control
<i>S. Typhi</i> STH2370 <i>zxx::EZ-Tn5</i>		
L4C4F4	0,18 ± 0	1/16 CIM
L6C1F4	2,93 ± 0	1 CIM
L11C8F1	2,93 ± 0	1 CIM
L20C7F4	1,46 ± 0	½ CIM
L40C2F6	0,37 ± 0	⅛ CIM
L44C1F3	0,73 ± 0	¼ CIM
L51C2F5	0,73 ± 0	¼ CIM
L53C1F5	0,37 ± 0	⅛ CIM
L53C3F4	1,46 ± 0	½ CIM
L56C2F6	0,73 ± 0	¼ CIM

Las cepas fueron cultivadas durante la noche a 37 °C en medio LB. Los cultivos se ajustaron a McFarland 0,5 en NaCl 0,9% y se diluyeron 500 veces. Se mezclaron con concentraciones seriadas decrecientes de cloruro de benzalconio. Luego de 24 h de incubación a 37 °C, se determinó la CIM. Los resultados se expresan como el promedio ± DE (n=3).

7.1.4.3 Resultados de la búsqueda de mutantes susceptibles a cobre (II)

De las 10 mutantes más susceptibles a cobre (II) seleccionadas en la prueba confirmatoria, sólo la mutante L4C4F4 tuvo una CIM 16 veces menor que la cepa silvestre.

De los resultados de esta prueba, se encontró que 19 de las 26 mutantes probadas tuvieron una CIM menor que la cepa silvestre (Tabla 4, Tabla 5 y punto 7.1.4.3). Estas mutantes fueron preseleccionadas para clonamiento del fragmento cromosómico mutado y envío a secuenciación tipo Sanger.

7.1.5 Clonamiento y secuenciación de las mutantes *S. Typhi* STH2370 *zxx::EZ-Tn5* preseleccionadas para caracterización

El DNA cromosomal de cada una de las mutantes preseleccionadas fue purificado, digerido y ligado. Luego, el DNA de cada mutante fue transformado en la cepa *E. coli* DH5 α pir. Obtenidas las colonias que presentaron plasmidios que contienen las mutaciones cromosomales, se purificó el DNA plasmidial según protocolo. Sólo se obtuvo DNA plasmidial de 15 de las 19 mutantes con cambio en la CIM. La electroforesis de los plasmidios obtenidos, comprobó que sólo existía una inserción a partir de cada clonamiento. Los distintos clonamientos presentaron inserciones distintas. La Figura 3 resume un ejemplo de los perfiles electroforéticos de los clones obtenidos de distintas mutantes. Se cuantificó el DNA, se midió la razón $A_{260/280}$ y las muestras obtenidas fueron enviadas a secuenciar. Recibidas las secuencias donde se insertó el transposón, se utilizó el programa informático *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) para el

alineamiento de las secuencias contra *S. Typhi* CT18, y así encontrar el lugar y la orientación de la inserción del transposón EZ-Tn5 en el genoma. El análisis de las secuencias genéticas de los clones arrojó que tuvieron sólo una inserción coincidiendo con lo señalado en la literatura ⁶⁰.

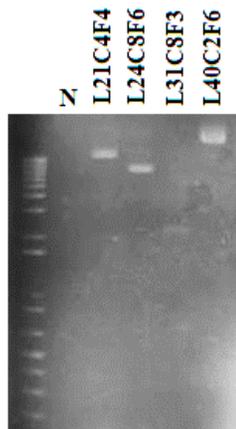


Figura 3. Ejemplo representativo de los análisis electroforéticos de clones obtenidos a partir de la digestión con EcoRV, ligación con T4 ligasa y electrotransformación de los plasmidios resultantes en *E. coli* DH5 α pir. N: Control negativo de extracción de DNA plasmidial de *E. coli* DH5 α pir. La variedad de tamaños de los clones es indicativa de inserción al azar.

En la Figura 4 se esquematiza el resumen del flujo de trabajo del *screening* para ciprofloxacino aplicable a los tres antimicrobianos, realizado durante este trabajo de tesis de doctorado y de las cuales se enviaron a secuenciar 15 mutantes para la obtención de los genotipos, que correspondió al 0,5% de la población analizada.

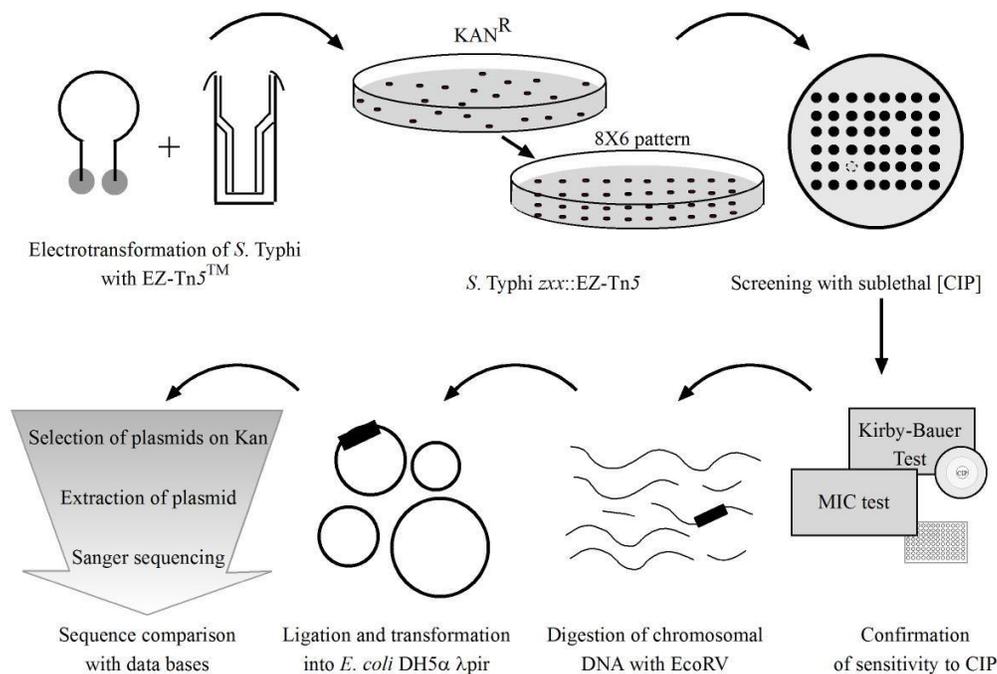


Figura 4. Flujo de trabajo en la realización del *screening* con tres antimicrobianos a 3.216 mutantes *S. Typhi* STH2370 *zxx::EZ-Tn5* para la búsqueda de mutantes con susceptibilidad aumentada.

En la Tabla 6, se encuentran los genes identificados como resultado del *screening* con ciprofloxacino CIP, cloruro de benzalconio (BZK) y cobre (Cu⁺²). Como se observa en la misma, el *screening* mostró 5 genes involucrados en resistencia de enterobacterias, estos fueron *acrA*, *acrB*, *tolC*, *rfaE* y *rfaG*⁹⁵⁻⁹⁸. También, se seleccionó 6 mutantes con susceptibilidad aumentada a BZK, una mutante correspondió a *rfaE* y 5 mutantes correspondieron al mismo gen *rfaG*, sin encontrarse genes nuevos o genes no descritos que participen en susceptibilidad a este compuesto en *Salmonella* en la población estudiada.

Se puede observar 6 genes de *S. Typhi* cuya interrupción y relación con el aumento en la susceptibilidad a los antimicrobianos expuestos no habían sido descritos a la fecha de la revisión bibliográfica para este serovar. Estos genes fueron *aeiA*, *cysE*, *dacC*, *glnA*, *recB*, *recC*. La inactivación de estos genes con el transposón aumentó la susceptibilidad a ciprofloxacino.

La mutante *rfaE* mostró un aumento en la susceptibilidad a los tres antimicrobianos probados y la mutante de mayor disminución de la CIM para todos ellos. Dos mutantes relacionadas con el metabolismo de aminoácidos *cysE* y *glnA*, mostraron susceptibilidad aumentada a ciprofloxacino. En resumen, de las 15 mutantes enviadas a secuenciar, se obtuvo 11 genotipos diferentes, 5 conocidos y 6 nuevos relacionados con resistencia para *S. Typhi*.

Utilizando como criterios la magnitud del cambio en la susceptibilidad y la novedad, se realizó una búsqueda bibliográfica *on-line* en *PubMed* con la palabra clave de cada gen, seguido de la palabra *Salmonella Typhi*, más el nombre del antimicrobiano o de la familia del antimicrobiano a la que la mutante mostró cambio en la susceptibilidad.

Con esta información, se preseleccionaron 5 mutantes como candidatas para confirmación fenotípica para la posterior elección de una mutante, con el objeto de caracterizar el posible mecanismo que contribuye al aumento en la susceptibilidad observada.

Tabla 6. Genotipos de 15 mutantes *S. Typhi* STH2370 *zxx::EZ-Tn5* secuenciadas

Código Mutante	Genotipo	Fenotipo	Producto del gen	Función del gen
L4C4F4	<i>rfaE::EZ-Tn5</i>	BZK ^S CIP ^S Cu ^{+2S}	ADP-heptosa sintasa	Biosíntesis de ADP -L-glicero-D-manno-heptosa
L6C1F2	<i>recC::EZ-Tn5</i>	CIP ^S	Subunidad de exonucleasa V	Recombinación homóloga
L11C7F6	<i>cysE::EZ-Tn5</i>	CIP ^S	Serina acetiltransferasa	Biosíntesis de cisteína
L21C4F4	<i>acrB::EZ-Tn5</i>	CIP ^S	Proteína B de resistencia a acriflavina	Bomba de expulsión
L24C8F6	<i>aefA::EZ-Tn5</i>	CIP ^S	Proteína integral de membrana AefA	Homeostasis del potasio intracelular
L31C8F3	<i>recB::EZ-Tn5</i>	CIP ^S	Subunidad de exonucleasa V	Recombinación homóloga
L40C2F6	<i>rfaG::EZ-Tn5</i>	BZK ^S	Glicosiltransferasa	Biosíntesis del <i>core</i> del lipopolisacárido
L41C7F3	<i>dacC::EZ-Tn5</i>	CIP ^S	D-alanil D-alanina carboxipeptidasa	Biosíntesis de peptidoglicano
L43C7F2	<i>glnA::EZ-Tn5</i>	CIP ^S	Glutamina sintetasa	Biosíntesis de glutamina
L44C1F3	<i>rfaG::EZ-Tn5</i>	BZK ^S	Glicosiltransferasa	Biosíntesis del <i>core</i> del lipopolisacárido
L51C2F5	<i>rfaG::EZ-Tn5</i>	BZK ^S	Glicosiltransferasa	Biosíntesis del <i>core</i> del lipopolisacárido
L53C1F5	<i>rfaG::EZ-Tn5</i>	BZK ^S	Glicosiltransferasa	Biosíntesis del <i>core</i> del lipopolisacárido
L56C2F6	<i>rfaG::EZ-Tn5</i>	BZK ^S	Glicosiltransferasa	Biosíntesis del <i>core</i> del lipopolisacárido
L60C8F6	<i>tolC::EZ-Tn5</i>	CIP ^S	Proteína de membrana externa TolC	Sistema de secreción bacteriana
L64C7F2	<i>acrA::EZ-Tn5</i>	CIP ^S	Proteína A de resistencia a acriflavina	Resistencia múltiple a fármacos

Con el objeto de determinar si la susceptibilidad observada en este subgrupo de 5 mutantes era general o particular a un antimicrobiano o grupo de ellos, se realizó un *screening* secundario de susceptibilidad utilizando para ello el método de difusión en agar descrito en la sección Métodos, con una batería de 18 antimicrobianos distintos. Los resultados de este segundo *screening* se presentan en la Tabla 7.

Con el resultado de este *screening* se seleccionó a las tres candidatas más interesantes para su confirmación y posterior caracterización en el presente estudio, las mutantes *S. Typhi* STH2370 *aeiA::EZ-Tn5*; *S. Typhi* STH2370 *glnA::EZ-Tn5* y *S. Typhi* STH2370 *dacC::EZ-Tn5*. La mutante *S. Typhi* STH2370 *aeiA::EZ-Tn5* mostró un aumento en la susceptibilidad a 9 de los antibacterianos utilizados y con los mayores cambios en magnitud con diferencias de hasta 17 mm respecto la cepa silvestre (Tabla 7) y por ello fue la mutante más interesante para estudiar. De tal forma, se procedió a construir la mutante sitio dirigida para la candidata *S. Typhi* STH2370 *aeiA::EZ-Tn5* para confirmar el fenotipo encontrado. Para ello, utilizando la técnica de intercambio alélico, se construyó la mutante STH2370 *aeiA::kan* y luego para descartar, o por lo menos disminuir, efectos polares de la inserción del casete de resistencia a kanamicina, se construyó la mutante FRT⁷¹. Sin embargo, el fenotipo de aumento en la susceptibilidad de esta mutante resultó ser un falso positivo, ya que perdió el fenotipo de susceptibilidad cuando se construyó la mutante *S. Typhi* STH2370 *aeiA::FRT*.

Al contrario de la mutante *aeiA::EZ-Tn5*, que mostró un perfil de susceptibilidad general a distintos antimicrobianos, la mutante *glnA::EZ-Tn5* mostró un perfil de susceptibilidad

restringido y aumento del halo menores a la mutante *aeiA*. Aunque mostró aumento de la susceptibilidad a antimicrobianos tales como cloranfenicol, tetraciclina, y ácido nalidíxico, el cambio más importante fue para la fluoroquinolona ciprofloxacino, con más de 10 mm de diferencia en el tamaño del halo, respecto la cepa silvestre.

Para la confirmación fenotípica de la mutante *glnA::EZ-Tn5*, se construyó la mutante sitio dirigida siguiendo el mismo procedimiento de construcción que para la mutante *aeiA*. Obtenida la mutante *glnA::FRT* (Figura 5), se realizó ensayos de susceptibilidad para ciprofloxacino por el método de difusión en agar y determinación de CIM, repitiéndose el fenotipo de aumento en la susceptibilidad encontrado en la mutante con la inserción del transposón EZ-Tn5, con diferencias en el halo de 11 mm en promedio y siendo dos veces más susceptible que la cepa silvestre (Figura 6, Tabla 8).

Este resultado indica que el cambio en la susceptibilidad observado se debe a la inactivación del gen *glnA* y no a un efecto polar debido a la inserción del transposón o del casete de resistencia a kanamicina u otra mutación no asociada. Como resultado de la confirmación del fenotipo de cambio en la susceptibilidad en la mutante *glnA*, ésta se seleccionó para su caracterización e identificación del posible mecanismo molecular que explique la susceptibilidad aumentada a ciprofloxacino.

Tabla 7. Halos de inhibición de la prueba de *screening* de mutantes *S. Typhi* STH2370 *zxx::EZ-Tn5* con genotipo identificado, expuestas a distintos antimicrobianos

Halos de inhibición (mm)						
<i>S. Typhi</i> STH2370						
Antimicrobiano	WT	<i>recC::EZ-Tn5</i>	<i>cysE::EZ-Tn5</i>	<i>aefA::EZ-Tn5</i>	<i>dacC::EZ-Tn5</i>	<i>glnA::EZ-Tn5</i>
CIP	37,3	45,7	43,2	45,3	46,3	48,6
LVX	35,0	40,0	38,5	35,0	45,0	38,0
NAL	29,0	35,0	28,0	37,0	30,0	35,0
MEM	34,3	37,0	32,0	32,0	39,0	35,0
IPM	35,0	37,0	34,0	33,0	40,0	32,0
ETP	37,0	40,0	35,0	38,0	47,0	40,0
CRO	40,0	43,0	40,0	50,0	45,0	45,0
AMP	31,5	34,0	31,0	32,5	38,0	35,0
AMC	31,5	34,5	28,0	29,0	36,0	31,0
TMP	32,5	31,0	35,0	39,0	33,0	35,0
ERY	7,0	7,0	7,0	19,0	7,0	7,0
TET	29,0	31,5	27,0	29,0	39,0	34,0
GEN	27,0	32,0	28,0	28,0	36,0	30,0
CAM	34,0	38,5	35,0	43,0	45,0	40,0
ACR	18,0	20,0	18,0	35,0	18,0	18,0
MV	16,8	17,0	22,0	23,0	14,0	18,0
BZ	27,0	31,0	31,0	30,0	23,0	27,0
DC	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
PMB	29,0	7,0	26,0	26,0	32,0	31,0

Las cepas se crecieron durante la noche a 37 °C en medio LB. Para el ensayo de difusión en disco, se sembró un césped en agar MH pH 7,3. Los sensibilizadores con el antimicrobiano correspondiente fueron colocados en el centro de placa. Las placas fueron cultivadas durante la noche a 37° C para medir las zonas de inhibición. WT: *wild type*. ACR, acriflavina; AMC, amoxicilina/clavulánico; AMP, ampicilina; BZ, bencil viológeno; CRO, ceftriaxona; CAM, cloranfenicol; CIP, ciprofloxacino; DC, ácido deoxicólico; ERY, eritromicina; ETP, ertapenem; GEN, gentamicina; IPM, imipenem; LVX, levofloxacino; MEM, meropenem; MV, metil viológeno; NAL, ácido nalidíxico; PMB, polimixina B; TET, tetraciclina; TMP, trimetoprim. Los resultados se expresan como el promedio (n=3).

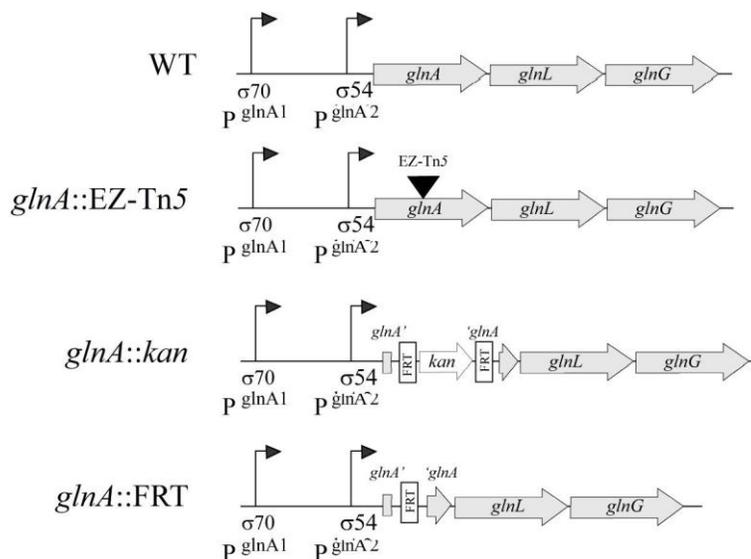


Figura 5. Operón *glnA* de *S. Typhi* y las mutantes nulas en *glnA* utilizadas en este trabajo.

WT (*wild type*): contexto genético de *glnA* en *S. Typhi*. *glnA::EZ-Tn5*: mutante con la inserción del transposón EZ-Tn5TM. *glnA::kan*: deleción de *glnA* con el casete de kanamicina. *glnA::FRT*: deleción de *glnA* sin resistencia.

S. Typhi STH2370

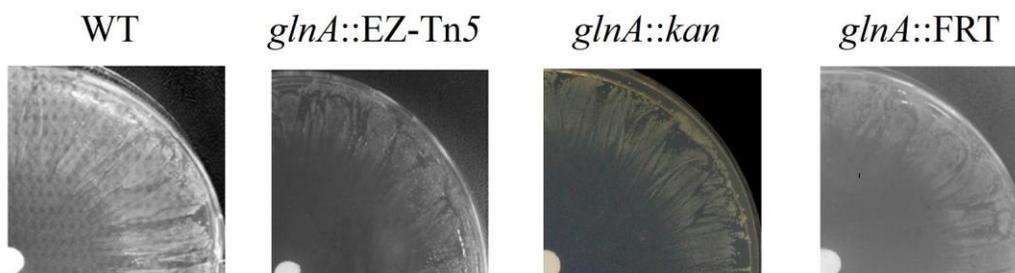


Figura 6. Las mutantes *S. Typhi* STH2370 *glnA::EZ-Tn5*, *S. Typhi* STH2370 *glnA::kan* y *S. Typhi* STH2370 *glnA::FRT* tienen susceptibilidad aumentada a ciprofloxacino.

Un césped fue sembrado en agar MH pH 7,3. Discos de papel filtro fueron cargados con 5 μ L de ciprofloxacino 2 mg/mL y colocados en el centro de placa. Las placas fueron cultivadas durante la noche a 37 $^{\circ}$ C para medir las zonas de inhibición. Ejemplo representativo de los análisis realizados (n=5).

Tabla 8. Las mutantes en *glnA* son 2 veces más susceptibles que *S. Typhi* STH2370 (WT). Halos de inhibición y CIM de ciprofloxacino determinados en WT, *glnA::EZ-Tn5*, *glnA::kan* y *glnA::FRT*.

STH2370	Halo de inhibición CIP (mm ±DE)	CIM CIP (mg/L ± DE)	CIM respecto al control
WT	37,3 ± 1,25	0,078 ± 0	Control
<i>glnA::EZ-Tn5</i>	47,8 ± 0,76	0,039 ± 0	½ CIM
<i>glnA::kan</i>	48,0 ± 0,50	0,039 ± 0	½ CIM
<i>glnA::FRT</i>	48,2 ± 0,29	0,039 ± 0	½ CIM

Las cepas se crecieron durante la noche a 37 °C en medio LB. Para el ensayo de difusión en disco, se sembró un césped en agar MH pH 7,3. Discos de papel filtro fueron cargados con 5 µL de ciprofloxacino 2 mg/mL y colocados en el centro de placa. Las placas fueron cultivadas durante la noche a 37° C para medir las zonas de inhibición. Para el ensayo de determinación de la CIM los cultivos se ajustaron a McFarland 0,5 en NaCl 0,9% y se diluyeron 500 veces. Se mezclaron con concentraciones seriadas decrecientes de ciprofloxacino. Luego de 24 h de incubación a 37 °C, se determinó la CIM. Los resultados se expresan como el promedio ± DE (n=4).

7.2. Caracterización de los mecanismos que contribuyen a la susceptibilidad a quinolonas tras la inactivación de *glnA* en *S. Typhi*

7.2.1. La mutante *glnA* presenta un deterioro en el crecimiento

La primera característica fenotípica de la mutante *glnA* es el tamaño de colonia, aproximadamente 10 veces menor que el de su contraparte silvestre, siendo además auxótrofa para glutamina en medio M9.

Se encontró también que la mutante *glnA* presenta deterioro del crecimiento en medio rico. Como se observa en la Figura 7, la mutación del gen *glnA* ocasiona un retardo del crecimiento en medio LB, con una fase *lag* mucho mayor y no alcanza la misma DO₆₀₀ en fase estacionara respecto la cepa de *S. Typhi* STH2370. Además, esta mutante alcanza la

fase estacionaria después de 24 h de incubación a 37 °C con agitación, comparada con las 5 h de la cepa silvestre.

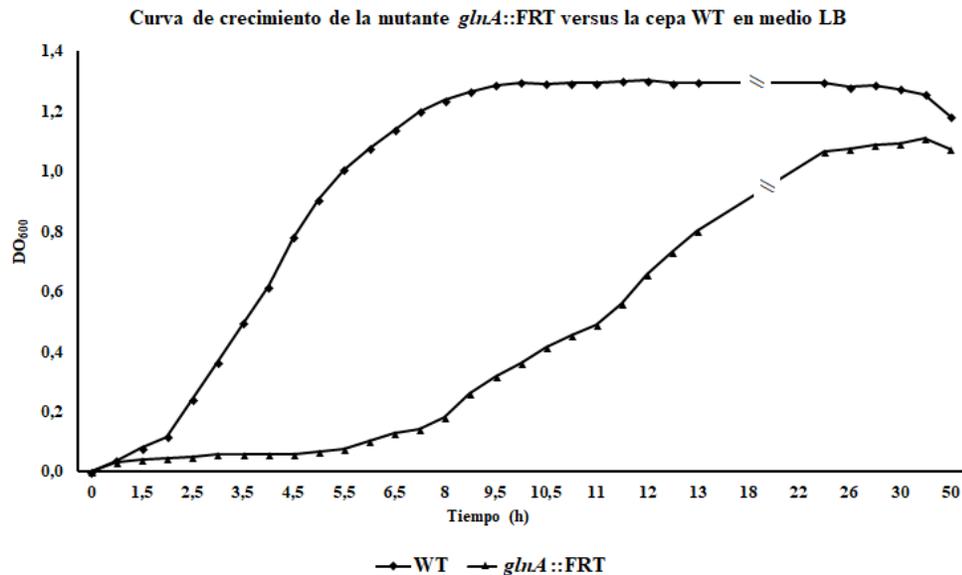


Figura 7. La mutante *S. Typhi glnA*::FRT presenta un deterioro en el crecimiento respecto *S. Typhi* STH2370 (WT).

200 μ L de un preinóculo de *S. Typhi* STH 2370 (WT) y *S. Typhi glnA*::FRT fueron transferidos a 30 mL caldo LB pH 7,0 y crecidos con agitación a 37 °C. La DO₆₀₀ fue medida y registrada a distintos intervalos de tiempo. Los resultados se expresan como el promedio (n=4).

7.2.2. El fenotipo WT no pudo ser complementado en la mutante *glnA*

La complementación genética en bacterias es comúnmente alcanzada por reintroducir copias funcionales de los genes mutados o delecionados, para así restablecer la función silvestre⁹⁹. Entre los ensayos clásicos de complementación se encuentra el uso de vectores para insertar el gen de interés. Estos vectores pueden ser de un alto o bajo número de copias. Otra estrategia para complementar es integrar una copia intacta del gen de interés en otro *locus* del genoma.

Para complementar el fenotipo observado de cambio en la susceptibilidad en la mutante *glnA* y descartar cualquier efecto no específico, se procedió a la realización del ensayo de complementación del gen *glnA* en *trans*. Para ello se utilizó los vectores TOPO[®]TA y pBAD TOPO[®]TA (Invitrogen). Utilizando la enzima Taq DNA polimerasa *Platinum*[™] se amplificó por PCR el gen *glnA*, que se insertó en los vectores para ser transformados en *E. coli* DH5 α y seleccionados en placas de agar LB AMP. Tras la extracción de DNA plasmidial, se realizó la prueba de determinación de la orientación de la inserción del gen *glnA* en el vector por PCR. En cada una de las estrategias en las que se utilizó estos vectores, todos los clones analizados tuvieron inserto el gen *glnA* en dirección contraria a la orientación del promotor del vector.

Luego, se procedió a utilizar una estrategia para integrar una copia intacta del gen *glnA* asociado a una resistencia en la mutante *glnA*::FRT. Se realizaron experimentos utilizando la técnica de intercambio alélico para integrar la copia en el gen *phoN*. Este gen codifica para una fosfatasa ácida no específica, y aparentemente no está involucrado en patogénesis en *S. Typhi*¹⁰⁰. Posteriormente, se utilizó la estrategia para integrar el gen *glnA* bajo el control del promotor *tetRA* en el gen *phoN*. En todas las transformaciones se obtuvo colonias resistentes, sin embargo, en ninguna se pudo comprobar la inserción del gen *glnA* en el lugar esperado.

7.2.3 La delección de *glnA* provoca cambios en el perfil de PME de *S. Typhi*

Para evaluar si la mutación en *glnA* provoca cambios en el perfil de proteínas de membrana externa de *S. Typhi*, se procedió a extraer estas proteínas, seguido de una electroforesis en gel de poliacrilamida.

Como se observa en la Figura 8, se encontró un cambio en el perfil de PME, encontrándose cambios en el perfil de expresión de OmpF. El análisis densitométrico de las fotografías de los gels, reveló que la mutante *glnA* tiene una densidad cercana a 3,5 veces mayor de OmpF, comparado con la cepa *S. Typhi* silvestre ⁸⁵.

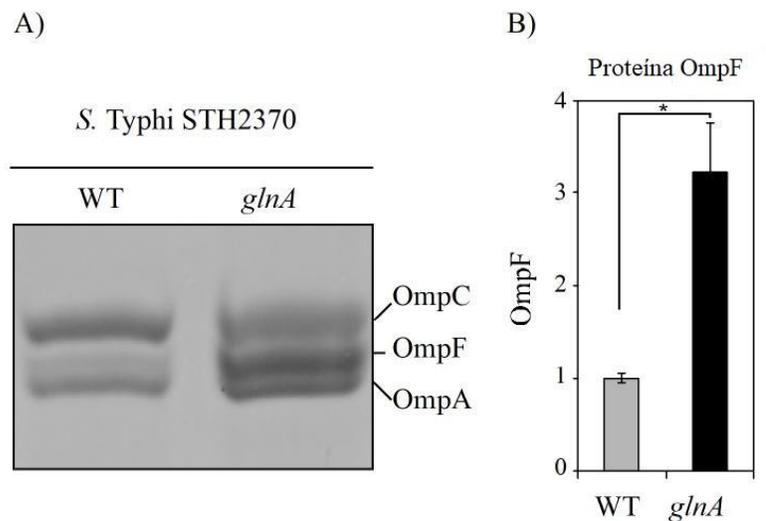


Figura 8. La mutante *S. Typhi glnA* tiene aumentada la porina OmpF.

A). Perfil de PME de *S. Typhi* STH2370 (WT) y *S. Typhi* STH2370 *glnA*::FRT (*glnA*). **B)** análisis densitométrico de la porina OmpF en la mutante *glnA* comparada con la cepa WT. Los extractos de proteínas se obtuvieron a partir de cultivos bacterianos crecidos hasta la misma DO en medio LB a 37°C con agitación constante. 50 µg de proteínas fueron resueltos mediante SDS-PAGE 10% y teñidos con azul de *Coomassie*. Ejemplo representativo de los análisis realizados. Los análisis de las imágenes realizaron con el programa ImageJ. Los resultados se expresan como el promedio ± DE (n=3). * $p \leq 0,05$

Además del cambio en la producción de la proteína OmpF, el perfil de proteínas de membrana externa de la mutante *S. Typhi* STH2370 *glnA::FRT* mostró otros cambios. Para identificar algunos de ellos, se seleccionó dos proteínas que disminuyen en la mutante *S. Typhi* STH2370 *glnA::FRT*, marcadas con flechas (1 y 2) en la Figura 9. Para ello se realizó una electroforesis según lo descrito en el punto 6.2.3.2.2 en métodos. Se recortó del gel las 2 muestras señaladas desde *S. Typhi* STH2370 y que se perdieron en la mutante *glnA* y fueron enviadas a análisis para identificación a *Proteome Factory* (*Proteoma Factory AG, Berlin, Germany*). La identificación de estas proteínas se realizó por nanoHPLC-ESI-MS/MS. El análisis arrojó que la primera probabilidad para la proteína 1, fue para Flagelina de *Salmonella Choleraesuis*, seguida de la proteína TolC de. Para la muestra marcada con 2 el primer *match* fue para primera proteína ribosomal 50S de *E. coli*, seguido de OmpW de *S. Typhi*.

Junto con lo anterior, y con el objeto de complementar los resultados obtenidos, se construyó la mutante *S. Typhi* STH2370 *ompF::kan*. Luego se realizaron ensayos de difusión en disco y determinación de CIM en ciprofloxacino para esta mutante. La delección de *ompF* provocó una disminución en el halo de inhibición a ciprofloxacino de 10 mm y un aumento de la CIM, de 4 veces respecto la cepa silvestre (Tabla 9).

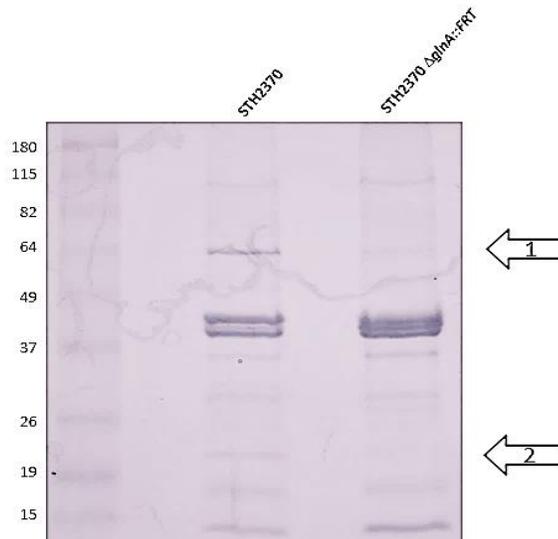


Figura 9. Perfil de PME de membrana externa de *S. Typhi* STH2370 y la mutante *S. Typhi* STH2370 *glnA::FRT*

Los extractos de PME se obtuvieron a partir de cultivos bacterianos crecidos durante la noche en medio LB a 37 °C con agitación constante. 50 µg de proteínas fueron resueltos mediante SDS-PAGE 12,5% y teñidos con azul de *Coomassie* coloidal. Flecha 1 y 2 indican las proteínas que fueron recortadas desde *S. Typhi* STH2370 y fueron enviadas a análisis por nanoHPLC-ESI-MS/MS.

Tabla 9. Halos de inhibición y CIM en *S. Typhi* STH2370 (WT), *glnA::FRT* y *ompF::kan* frente a ciprofloxacino.

STH2370	Halo de inhibición CIP (mm ±DE)	CIM mg/L CIP (mm ± DE)	CIM mg/L respecto al control
WT	36,4 ± 0,40	0,078 ± 0,00	Control
<i>glnA::FRT</i>	47,0 ± 0,80	0,039 ± 0,00	½ CIM
<i>ompF::kan</i>	27,0 ± 0,15	0,312 ± 0,00	4 CIM

Las cepas se crecieron durante la noche a 37 °C en medio LB. Para el ensayo de difusión en disco, un césped fue sembrado en agar MH pH 7,3. Discos de papel filtro fueron cargados con 5 µL de ciprofloxacino 2 mg/mL y colocados en el centro de placa. Luego de 16-18 h de incubación a 37 °C, se midieron los halos de inhibición. Para el ensayo de determinación de la CIM cada cultivo se ajustó a McFarland 0,5 en NaCl 0,9% y se diluyó 500 veces. Luego, se mezcló con concentraciones seriadas decrecientes de ciprofloxacino. Luego de 24 h de incubación a 37 °C, se determinó la CIM. Los resultados se expresan como el promedio ± DE (n=3).

7.2.4 La delección del gen *glnA* aumenta la expresión del gen *ompF*

Para evaluar la expresión del gen *ompF* en la cepa *S. Typhi* STH2370 respecto a la mutante *glnA*, se realizó ensayos de RT-qPCR. Brevemente, se extrajo RNA por el método de Trizol, seguido de inactivación del DNA de las muestras extraídas. Luego, se cuantificó el RNA y se realizó transcripción reversa para la obtención del cDNA. Se midió el nivel de transcrito de *ompF* relativo a la expresión del gen *dnaN* y el gen *lon*, según lo descrito en métodos. Las diferencias de la expresión de *ompF* en la mutante *glnA* comparado a la cepa silvestre se mantuvieron, independiente del gen control utilizado (los resultados de los ensayos de expresión relativa obtenidos con el gen *lon* usado control endógeno no son presentados). La Figura 10 muestra el cambio de la expresión del gen *ompF* en la mutante *glnA* comparado con la cepa silvestre. Este resultado corresponde al ensayo de 11 replicados biológicos cada uno en triplicado técnico. La expresión de *ompF* en la mutante *S. Typhi* STH2370 *glnA::FRT* es 4,4 veces mayor que la cepa silvestre *S. Typhi* STH2370. Estos resultados confirman lo observado en el perfil de proteínas de membrana externa.

Está descrito que la entrada de ciprofloxacino y otras quinolonas en bacterias Gram negativo es principalmente por la porina OmpF (Ferreira and Gameiro, 2015; Sousa et al., 2017). Así, el aumento en la susceptibilidad a ciprofloxacino observada para la mutante *glnA* podría estar asociado con el incremento de OmpF en esta mutante, incrementando la concentración intracelular de quinolonas.

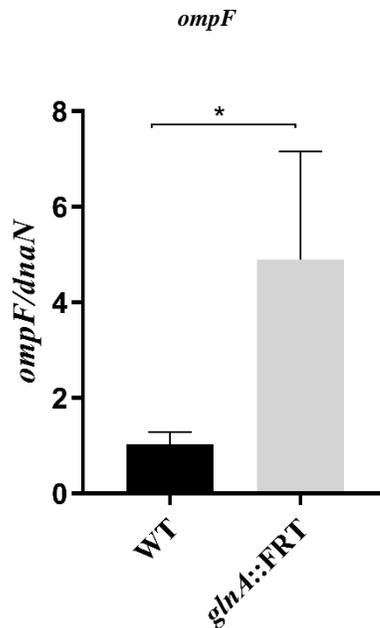


Figura 10. La expresión del gen *ompF* en *S. Typhi glnA* es 4,4 veces mayor que en *S. Typhi* STH2370.

Expresión relativa del gen *ompF* de *S. Typhi* STH2370 (WT) y *S. Typhi* STH2370 *glnA::FRT*. Las cepas fueron cultivadas a 37 °C a pH 7,0 hasta una DO_{600} 0,5, para luego realizar extracción de RNA total y una posterior medición de expresión mediante RT-qPCR. Los resultados se expresan como el promedio \pm DE. (n=9), *= $p \leq 0,05$ comparada con WT.

7.3 Estudio de cambios en la expresión de *ompF* vía un sistema inducible

7.3.1 Construcción de mutantes con el elemento *tetRA* en el promotor de los genes *glnA*, *ompF* y *4173*

Con el objeto de estudiar si los cambios en la expresión de *glnA* afectan la expresión de *ompF*, se utilizó un sistema inducible por tetraciclina. Para ello se reemplazó el promotor *glnA* por el casete de resistencia a tetraciclina *tetRA*. El casete *tetRA* ha sido utilizado para estudios de expresión de genes en procariontes ^{103,104}. Este elemento contiene las

secuencias de los genes *tetR* y *tetA* y confiere resistencia a tetraciclina. El gen *tetA* codifica para la proteína multimérica antitransporte TetA, que es proteína integral de la membrana interna, que expulsa selectivamente complejos de tetraciclina-Mg²⁺ desde el citosol al periplasma por un intercambio de protones, limitando así el acceso de tetraciclina al ribosoma en la célula ⁷⁰.

Cuando TetA está presente en altas concentraciones, los cationes son transportados desde la célula bacteriana a una velocidad tal que la membrana se despolariza y la viabilidad de la célula está amenazada. Para prevenir esto, la expresión de *tetA* es controlada por la proteína represora TetR, producto del gen *tetR*.

En ausencia de tetraciclina, homodímeros del represor se unen fuertemente ($K_d=10^{-11}$ M) a los surcos mayores de dos secuencias del operador palindrómicas de 15 pb que se encuentran entre los genes *tetR* y *tetA*, reprimiendo la expresión de estos genes que se transcriben de forma divergente. La unión de tetraciclina-Mg⁺² a TetR ($K_a=10^9$ M⁻¹) induce un cambio conformacional que reduce la afinidad del represor por *tetO* en nueve órdenes de magnitud. Los diferenciales entre las constantes de unión aseguran que la transcripción de *tetR* esté suprimida en ausencia de tetraciclina e inducida por concentraciones del fármaco que son demasiado bajas para afectar la síntesis de proteínas ⁷⁰.

La entrada de tetraciclina en la célula bacteriana involucra la entrada por difusión pasiva a través de la proteína OmpF, acumulándose en el periplasma. Sin embargo, en el movimiento desde el espacio periplásmico hacia el citoplasma no parece estar involucrado un canal proteínico específico. En vez de esto, la tetraciclina cruza la membrana

citoplasmática en un proceso dirigido por pH ¹⁰⁵. La tetraciclina inhibe el crecimiento bacteriano por unirse a los ribosomas ($K_a \sim 10^9 \text{ M}^{-1}$) e interrumpir interacciones codón-anticodón, interfiriendo en la unión del aminoacil-tRNA al sitio aceptor en la subunidad 30S. Tetraciclina se une fuerte, pero reversiblemente a un único sitio de la subunidad 30S, compuesto de residuos de al menos 4 proteínas (S3, S4, S14 y S19) y residuos desde la región 893-1054 del rRNA ⁷⁰.

Para regular la expresión de *glnA* vía intercambio alélico se introdujo el casete de resistencia *tetRA* en el promotor del gen *glnA* obteniéndose la cepa STH2370 $\Delta P^{glnA}::tetRA$. Asimismo, también se construyó las mutantes inducibles por tetraciclina para el promotor del gen *ompF* y el gen *STY4173* como un control no relacionado, estas cepas fueron nombradas STH2370 $\Delta P^{ompF}::tetRA$ y STH2370 $\Delta P^{4173}::tetRA$, respectivamente. Cuando clortetraciclina es autoclavada en caldo se desnatura perdiendo su actividad tóxica, pero reteniendo su capacidad de inducir los genes *tetR* y *tetA* en células resistentes a tetraciclina ¹⁰⁶. Para la realización de los ensayos de inducción se utilizó clortetraciclina autoclavada a una concentración 10-40 veces bajo la MIC comunicada para tetraciclina en *Salmonella* ⁹⁴.

La construcción de este sistema inducible se realizó con el objeto de observar cambios en el halo de inhibición a ciprofloxacino al inducir el gen *glnA*, ya que de acuerdo con los resultados obtenidos en el perfil de proteínas de membrana externa y los resultados del transcrito, se postuló que los cambios en la susceptibilidad estarían relacionados con los cambios en la expresión de la porina OmpF. Por lo tanto, con la mutante STH2370

$\Delta P^{glnA}::tetRA$ se esperaba observar una disminución en el halo a ciprofloxacino a medida que se induce *glnA*. Por el contrario, en la mutante STH2370 $\Delta P^{ompF}::tetRA$, se esperaba un aumento en el halo a ciprofloxacino a medida que se inducía el promotor de *ompF*.

Para probar esto primeramente se realizó ensayos de susceptibilidad a ciprofloxacino a las cepas con *tetRA* en sus promotores las que fueron sembradas en placas de agar MH pH 7,3 en presencia de concentraciones crecientes de clortetraciclina. Sin embargo, no se observaron cambios en la susceptibilidad de acuerdo con nuestras predicciones. Para las mutantes STH2370 $\Delta P^{glnA}::tetRA$, STH2370 $\Delta P^{ompF}::tetRA$ y la mutante control se observó un aumento en la susceptibilidad a ciprofloxacino a medida que aumenta la concentración del inductor clortetraciclina (Tabla 10). Esto llevó a pensar que TetA, producto del gen *tetA*, podía estar interfiriendo en los resultados observados. El aumento de TetA en la membrana podría alterar también el transporte de OmpF y otras proteínas a la membrana externa y el nivel de resistencia a ciprofloxacino.

Con el objeto de disminuir la interferencia que podría implicar la resistencia a tetraciclina en los constructos, se quitó el gen *tetA* y se mantuvo su promotor, que se reemplazó por un gen de resistencia a kanamicina. Finalmente, se removió el casete de resistencia a kanamicina gracias a la flipasa codificada en el plasmidio pCP20, como se describió en Materiales y Métodos, obteniéndose las mutantes FRT, a las que denominamos mutantes tetraciclina dependiente (TD), al estar bajo el control del promotor de *tet* (P^{tet}). En la Figura 11, se encuentra el detalle secuencial de los pasos realizados para obtener las mutantes TD para el gen *glnA*.

Tabla 10. Halos de inhibición de las mutantes STH2370 $\Delta P^{glnA}::tetRA$, STH2370 $\Delta P^{ompF}::tetRA$ y $\Delta P^{4173}::tetRA$ frente a ciprofloxacino

STH2370	Halos de inhibición (mm \pm DE)		
	$\Delta P^{glnA}::tetRA$	$\Delta P^{ompF}::tetRA$	$\Delta P^{4173}::tetRA$
Sin CTET	53,5 \pm 0,50	39,7 \pm 0,29	49,7 \pm 0,58
CTET 0,05 μ g/mL	52,2 \pm 0,29	45,5 \pm 0,5	51,8 \pm 0,29
CTET 0,25 μ g/mL	53,5 \pm 0,50	45,8 \pm 0,76	54,0 \pm 0,0
CTET 0,5 μ g/mL	57,0 \pm 1,73	57,8 \pm 0,29	58,0 \pm 0,0

Las cepas se crecieron toda la noche a a 37 °C en medio LB. Para el ensayo de difusión en disco, un césped fue sembrado en agar MH pH 7,3 con concentraciones crecientes de CTET. Discos de papel filtro fueron cargados con 5 μ L de ciprofloxacino 2 mg/mL y colocados en el centro de placa. Las placas fueron cultivadas durante la noche a 37°C para medir las zonas de inhibición. Los resultados se expresan como el promedio \pm DE. (n=3).

7.3.2 La inducción de *glnA* en la mutante tetraciclina dependiente disminuye la susceptibilidad a ciprofloxacino

Construidas las mutantes TD, se realizó ensayos de susceptibilidad a ciprofloxacino en placas de agar MH pH 7,3 con concentraciones crecientes de clortetraciclina autoclavada. En la Tabla 11, se presentan los resultados de resistencia frente a ciprofloxacino como respuesta a la inducción de los promotores con clortetraciclina en las cepas mutantes. Se encontró que para la mutante *S. Typhi* STH2370 *glnA*^{TD} (*glnA*^{TD}) a medida que aumenta la concentración de clortetraciclina y por consiguiente la inducción de la expresión de *glnA*, disminuyó el halo de inhibición de ciprofloxacino, desde 46 a 38 mm, con una diferencia de 8 mm. Por el contrario, al inducir el promotor de la mutante *ompF*^{TD}, el halo a ciprofloxacino aumentó a medida que aumentó la concentración de clortetraciclina de 32 mm a 41 mm, siendo este cambio de 9 mm. La inducción del promotor del gen *STY4173* (*4173*^{TD}), no provocó cambios en el halo de inhibición a ciprofloxacino. Mientras el

impacto de la clortetraciclina es mínimo en las cepas que no poseen el constructo inducible (WT y *glnA::FRT*).

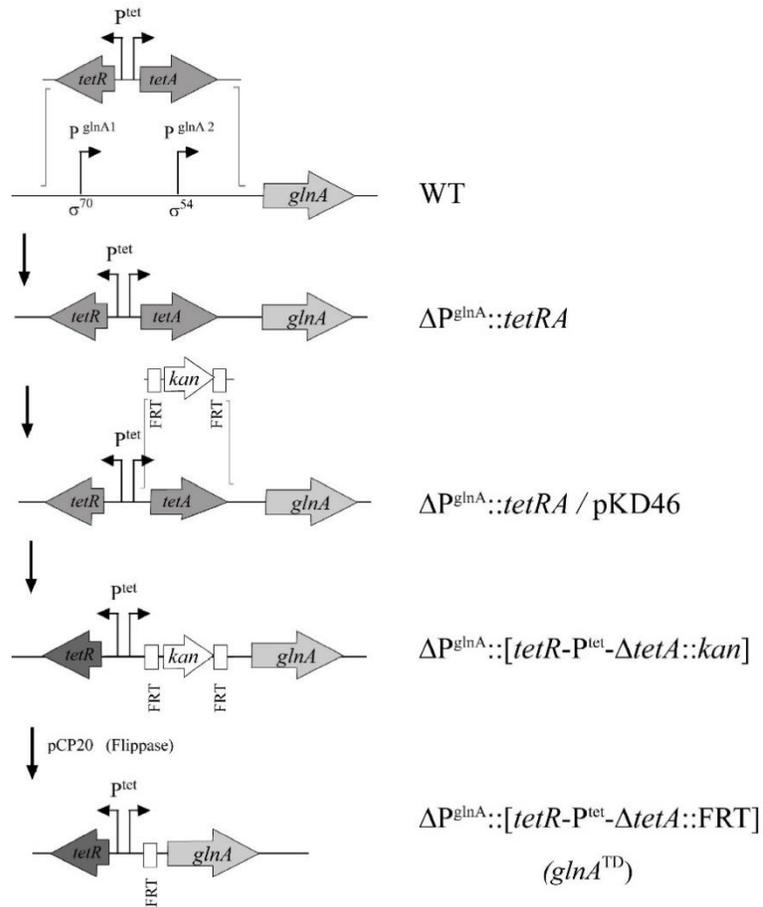


Figura 11. Estrategia para la construcción de la mutante dependiente de tetraciclina *S. Typhi* STH2370 *glnA*^{TD}.

La misma estrategia fue utilizada para la obtención de las mutantes *S. Typhi* STH2370 *ompF*^{TD} y *S. Typhi* STH2370 *4173*^{TD}.

Tabla 11. Halos de inhibición de las mutantes tetraciclina dependiente frente a ciprofloxacino

STH2370	Halos de inhibición (mm ± DE)				
	<i>glnA^{TD}</i>	<i>ompF^{TD}</i>	STY4173 ^{TD}	WT	<i>glnA::FRT</i>
Sin CTET	46,0 ± 0,10	31,9 ± 0,25	40,1 ± 0,12	37,0 ± 0,17	48,0 ± 0,17
CTET 0,025 µg/mL	41,9 ± 0,17	37,3 ± 0,00	40,0 ± 0,10	38,9 ± 0,42	49,1 ± 0,25
CTET 0,050 µg/mL	38,1 ± 0,42	41,0 ± 0,17	40,0 ± 0,10	39,1 ± 0,50	48,8 ± 0,44

Las cepas se crecieron toda la noche a 37 °C en medio LB. Para el ensayo de difusión en disco, un césped fue sembrado en agar MH pH 7,3 con concentraciones crecientes de clortetraciclina (CTET). Discos de papel filtro fueron cargados con 5 µL de CIP 2 mg/mL y colocados en el centro de placa. Las placas fueron cultivadas durante la noche a 37 °C para medir las zonas de inhibición. Los resultados se expresan como el promedio ± DE (n=3).

7.3.3 La mutante *glnA^{TD}* crece en presencia de anhidrotetraciclina en medio mínimo

Con el objeto de comprobar que la construcción del sistema inducible funcionaba como se predecía, es decir revirtiendo los fenotipos asociados a la mutación de *glnA*, se decidió estudiar si la inducción de *glnA* revertía el fenotipo de poco crecimiento observado en las mutantes *glnA*. Para esto, se realizó una curva de crecimiento con anhidrotetraciclina y sin anhidrotetraciclina en medio M9. Se puede observar en la Figura 12, que la mutante *glnA^{TD}* no creció sin anhidrotetraciclina; sin embargo, al inducir con 0,05 µg/mL de anhidrotetraciclina la mutante *glnA^{TD}* creció en forma similar a la cepa silvestre (WT) en medio M9.

La inducción del sistema también se comprobó midiendo la expresión del transcrito de *glnA* en la mutante *glnA^{TD}*. Como se observa en la Figura 13, la expresión de *glnA* aumenta

a medida que incrementa la concentración del inductor, indicando que el sistema ha quedado correctamente construido.

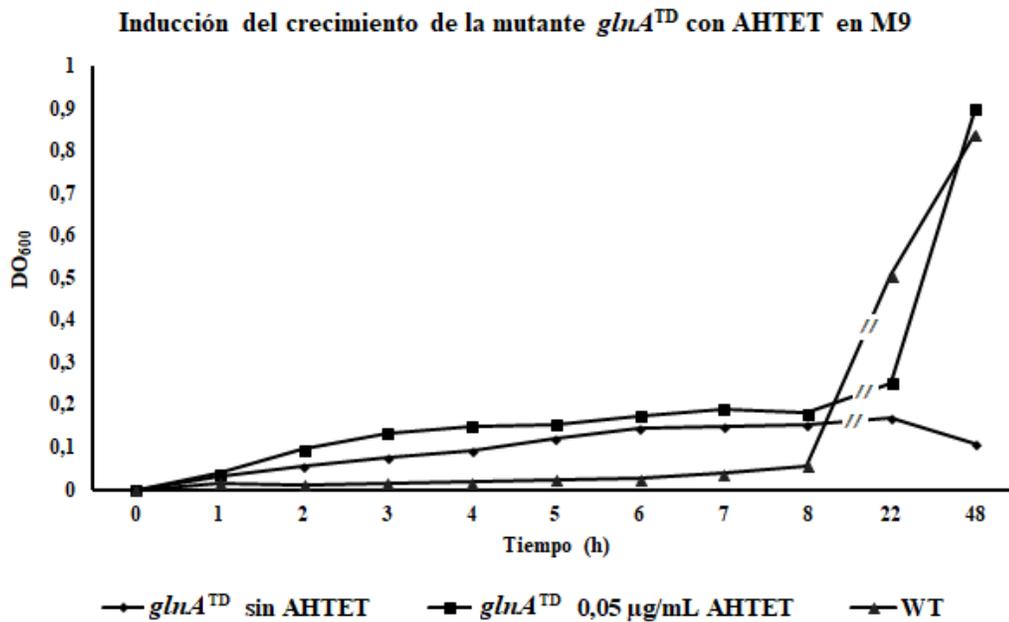


Figura 12. La mutante *glnA^{TD}* crece en presencia de anhidrotetraciclina (AHTET)

Crecimiento de *S. Typhi* STH2370 *glnA^{TD}* sin y con 0,05 µg/mL de AHTET y *S. Typhi* STH2370 (WT) en medio M9. 200 µL de un preinóculo de cada una de las cepas fueron transferidos a 20 mL caldo M9 y crecidos con agitación a 37 °C. La DO₆₀₀ fue medida y registrada a distintos intervalos de tiempo. Los resultados se expresan como el promedio. (n=3).

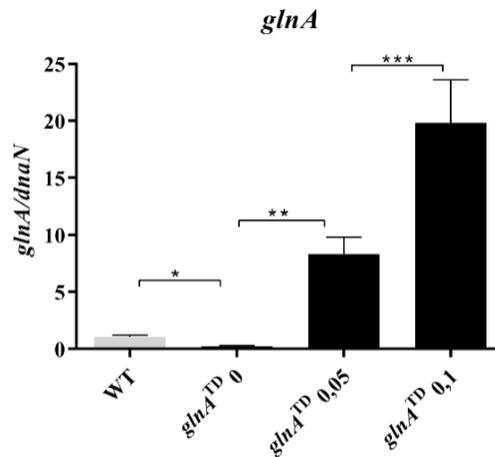


Figura 13. La expresión de *glnA* aumenta en la mutante *glnA*^{TD} cuando se induce el promotor con clortetraciclina

Expresión relativa del gen *glnA* de *S. Typhi* STH2370 *glnA*^{TD} a concentraciones de 0, 0,05 y 0,1 µg/mL de clortetraciclina comparada con *S. Typhi* STH2370 (WT). Las cepas fueron cultivadas a 37 °C a pH 7,0 hasta una DO₆₀₀ 0,5, para luego realizar extracción de RNA total y una posterior medición de expresión mediante RT-qPCR. Los resultados se expresan como el promedio ± DE. (n=3), * = $p \leq 0,05$ comparada con WT, ** = $p \leq 0,05$ comparada con *S. Typhi* STH2370 *glnA*^{TD} 0, *** = $p \leq 0,05$ comparada con *S. Typhi* STH2370 *glnA*^{TD} 0,05.

7.3.4 La inducción de *glnA* disminuye la expresión de *ompF*

Para demostrar que la susceptibilidad a ciprofloxacino en las cepas *glnA* ocurre en función de la expresión de *ompF*, se realizó un ensayo de expresión relativa del transcrito *ompF*, para cada una de las mutantes dependientes de tetraciclina. La Figura 14 muestra el cambio de la expresión de *ompF* de la mutante *glnA*^{TD} cuando se indujo el promotor de *glnA* con concentraciones crecientes de clortetraciclina. Se observó que en ausencia de clortetraciclina, cuando no se expresa el promotor de *glnA* en este sistema, la expresión de *ompF* es 5 veces mayor en la mutante *glnA*^{TD}, comparada con la cepa silvestre. A su vez, los resultados muestran que la expresión de *ompF* en la mutante *glnA*^{TD} disminuye en

la medida que aumenta la expresión del promotor del gen *glnA*, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados llevan a concluir que *glnA* regula negativamente *ompF*. A una concentración de clortetraciclina de 0,05 µg/mL, el nivel de expresión de *ompF* fue 2,5 menor comparado con la mutante *glnA*^{TD} sin clortetraciclina, y cuando se utilizó una concentración de 0,1 µg/mL la expresión disminuyó 10 veces, respecto la mutante *glnA*^{TD} sin clortetraciclina.

El nivel de expresión de *ompF* de la mutante *glnA*^{TD} sin inducir el promotor fue similar en nivel a la mutante nula en *glnA*. A partir de estos resultados podemos inferir que la delección del gen *glnA* provoca un aumento en el nivel de transcrito de *ompF* y que este transcrito disminuye en la medida que aumenta el transcrito de *glnA*. Así, la inducción de la expresión de *ompF* podría ser la mayor causa de la susceptibilidad observada en la mutante *glnA*.

En la Figura 15, se muestran los resultados de expresión relativa de *ompF* en la mutante *ompF*^{TD} y la mutante *4173*^{TD}. Se encontró que la expresión de *ompF* en la mutante *ompF*^{TD} aumentó 1,7 veces su expresión a una concentración de clortetraciclina de 0,05 µg/mL. A una concentración de 0,1 µg/mL la expresión cayó más de la mitad de lo que expresa la cepa WT, posiblemente debido a un mecanismo de control transcripcional o efecto directo sobre la función de los ribosomas y desacoplamiento de la transcripción. En la mutante utilizada como control, la expresión aumentó a medida que se indujo el promotor. Sin embargo, el cambio en el nivel de expresión es menor que el alcanzado en la mutante *glnA*^{TD} no alcanzando a doblar su valor.

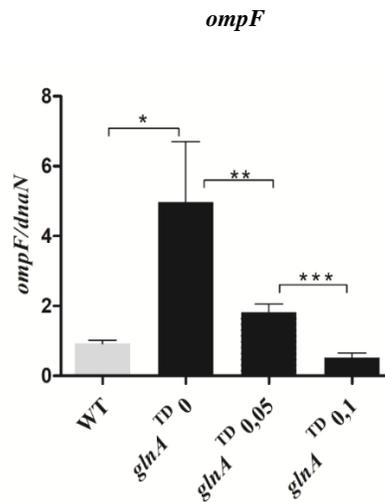


Figura 14. La inducción de *glnA* disminuye la expresión de *ompF*.

Expresión relativa del gen *ompF* de *S. Typhi* STH2370 *glnA*^{TD} a distintas concentraciones de clortetraciclina comparada con *S. Typhi* STH2370 (WT). Las cepas fueron cultivadas a 37 °C a pH 7,0 hasta una DO₆₀₀ 0,5, para luego realizar extracción de RNA y una posterior medición de expresión mediante RT-qPCR. Los resultados se expresan como el promedio ± DE. (n=3), * $p \leq 0,05$ comparada con WT, ** $p \leq 0,05$ comparada con *S. Typhi* STH2370 *glnA*^{TD} 0, *** $p \leq 0,05$ comparada con *S. Typhi* STH2370 *glnA*^{TD} 0,05.

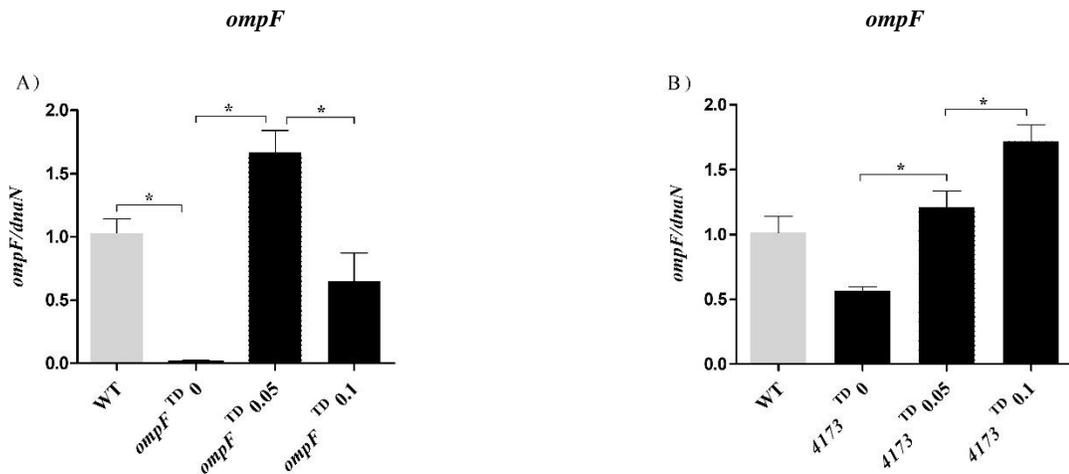


Figura 15. Expresión de *ompF* en la mutante *ompF*^{TD} y 4173^{TD}.

Expresión relativa del gen *ompF* de A) *S. Typhi* STH2370 *ompF*^{TD} y B) *S. Typhi* STH2370 4173^{TD} a distintas concentraciones de CTET comparada con *S. Typhi* STH2370 (WT). Las cepas fueron cultivadas a 37 °C a pH 7,0 hasta una DO₆₀₀ 0,5; para luego realizar extracción de RNA y una posterior medición de expresión mediante RT-qPCR. Los resultados se expresan como el promedio ± DE (n=3). * $p \leq 0,05$

7.3.5 La inactivación de *glnA* disminuye la expresión de MicF.

MicF es un RNA pequeño que promueve la degradación del transcrito de *ompF* y bloquea la traducción al interactuar con la secuencia Shine-Dalgarno¹⁰⁷. Debido al efecto directo de MicF sobre OmpF, se estudió la expresión de MicF en la mutante *glnA* y en la mutante *glnA*^{TD}. Como se observa en la Figura 16 A, la expresión de MicF en la mutante *S. Typhi* STH2370 *glnA* fue ¼ comparado con la cepa WT. Luego, la expresión de MicF fue estudiada en la mutante *S. Typhi* *glnA*^{TD}. El incremento de la expresión de *glnA* con 0,05 y 0,1 μg/mL CTET (Figura 16 B) aumenta la expresión de MicF. Se observa también que, en condiciones no inducidas, los niveles de MicF están levemente reducidos comparado

con la cepa WT. Se desconoce si la relación que existe entre MicF y GlnA es directa o a través de otros factores.

Se estudió el fenotipo de resistencia a ciprofloxacino asociado a la delección de *micF* encontrándose un aumento de la susceptibilidad (Tabla 12).

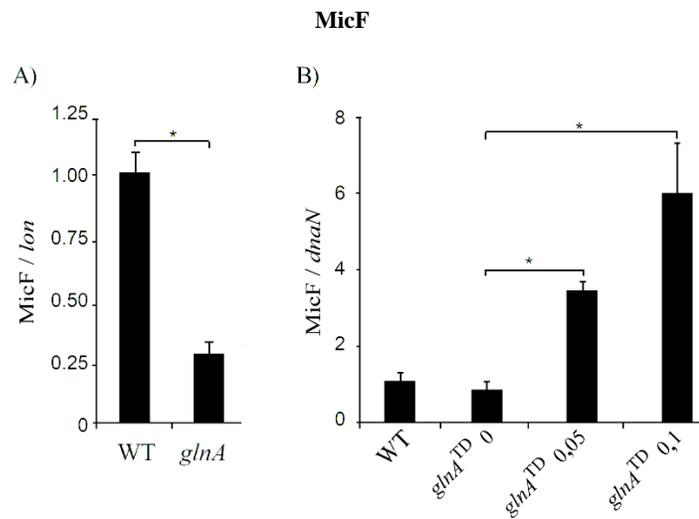


Figura 16. La inactivación de *glnA* disminuye la expresión de MicF, su inducción aumenta la expresión de MicF

Expresión relativa del gen MicF. **A)** *S. Typhi* STH2370 (WT) y *S. Typhi* STH2370 *glnA*. **B)** *S. Typhi* STH2370 *glnA*^{TD} a concentraciones de 0, 0,05 y 0,1 µg/mL de clortetraciclina comparada con WT. Las cepas fueron cultivadas a 37 °C a pH 7,0 hasta una DO₆₀₀ 0,5; para luego realizar extracción de RNA y una posterior medición de expresión mediante RT-qPCR. Los resultados se expresan como el promedio ± DE (n=3). * $p \leq 0,05$.

Tabla 12. Susceptibilidad a ciprofloxacino de *S. Typhi* STH2370 (WT) y mutantes nulas en *micF* y *ompF*

<i>S. Typhi</i> STH2370	Halos de inhibición (mm \pm DE)
WT	36,4 \pm 0,4
$\Delta micF::cam$	39,1 \pm 0,3
$\Delta ompF::kan$	27,7 \pm 0,3

Las cepas se crecieron toda la noche a 37 °C en medio LB. Para el ensayo de difusión en disco, un césped fue sembrado en agar MH pH 7,3. Discos de papel filtro fueron cargados con 5 μ L de ciprofloxacino 2 mg/mL y colocados en el centro de placa. Las placas fueron cultivadas durante la noche a 37°C para medir las zonas de inhibición. Los resultados se expresan como el promedio \pm DE. (n=3).

7.4 La mutación del gen *glnA* no afecta la expresión de *ompC*

Con el objeto de comprobar los resultados observados en el perfil de PME (Figura 8) y descartar que los cambios encontrados en la susceptibilidad puedan deberse a cambios en la expresión de otras PME, como la porina *ompC*, se procedió a determinar la expresión relativa del transcrito de *ompC*. La expresión relativa de *ompC* es menor en la mutante *glnA* que en la cepa silvestre, sin embargo, ésta no es significativa entre ambas cepas (Figura 17). Luego, se determinó el nivel de expresión de *ompC* con la mutante inducible *glnA*^{TD}, encontrándose que los cambios en la expresión de *glnA* no afectan la expresión de *ompC* (Figura 18).

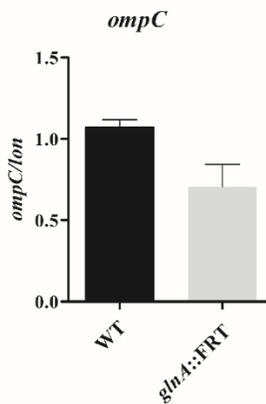


Figura 17. La delección de *glnA* no cambia significativamente la expresión de *ompC*.

Medición de la expresión relativa del gen *ompC* de *S. Typhi* STH2370 (WT) y *S. Typhi* STH2370 *glnA::FRT*. Las cepas fueron cultivadas a 37 °C a pH 7,0 hasta una DO₆₀₀ 0,5, para luego realizar extracción de RNA total y una posterior medición de expresión mediante RT-qPCR. Los resultados se expresan como el promedio ± DE. (n=3).

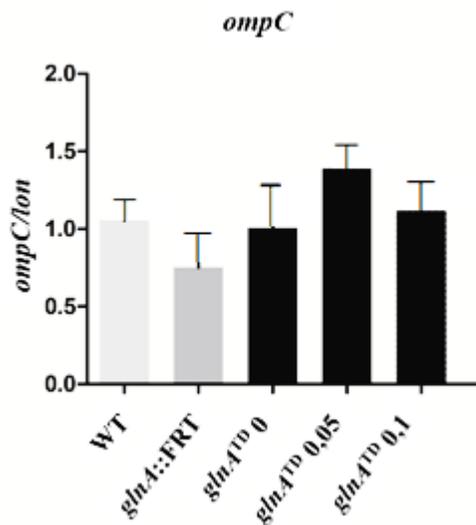


Figura 18. La inducción de *glnA* no cambia significativamente la expresión de *ompC*.

Medición de la expresión relativa del gen *ompC* de *S. Typhi* STH2370 *glnA^{TD}* a distintas concentraciones de clortetraciclina comparada con *S. Typhi* STH2370 (WT) y *S. Typhi* STH2370 *glnA::FRT*. Las cepas fueron cultivadas a 37 °C a pH 7,0 hasta una DO₆₀₀ 0,5, para luego realizar extracción de RNA y una posterior medición de expresión mediante RT-qPCR. Los resultados se expresan como el promedio ± DE. (n=3).

Estos resultados sugieren que los cambios en la expresión de *glnA* y que el cambio observado asociado a la entrada de ciprofloxacino se debe fundamentalmente a un cambio en la expresión de *ompF*.

7.5 La delección de *glnA* no afecta la expresión de los genes del sistema de dos componentes *envZ-ompR*

Las bacterias Gram negativo requieren de transporte de nitrógeno, carbón, iones y agua, que deben cruzar la membrana externa y la membrana interna. La membrana externa actúa como una barrera al *shock* osmótico y tiene la capacidad de incrementar o disminuir la abundancia de las porinas dependiendo del ambiente. OmpR es uno de los sistemas más caracterizados que regula la expresión de porinas en enterobacterias ¹⁰⁸.

En *S. Typhi*, cambios en la osmolaridad sólo afectan la expresión de *ompF* aumentando sus niveles en baja osmolaridad, mientras que los niveles de *ompC* se mantienen constantes, en contraste a lo que ocurre en *E. coli* ^{108,109}. Con el objeto de evaluar si existen cambios en la expresión del sistema de dos componentes *envZ-ompR*, se analizó la expresión relativa de los transcritos de *envZ* y *ompR* en la mutante *glnA*. En la Figura 19, se puede observar que no hubo expresión diferencial para ambos genes entre la cepa mutante y la silvestre.

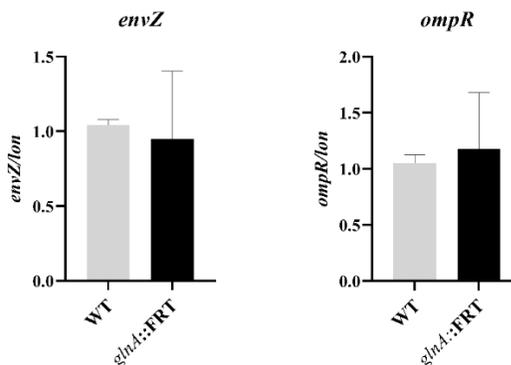


Figura 19. La delección de *glnA* no provoca cambios significativos en la expresión de *envZ* y *ompR*.

Medición de la expresión relativa de los genes *envZ* y *ompR* de *S. Typhi* STH2370 (WT) comparada con *S. Typhi* STH2370 *glnA::FRT*. Las cepas fueron cultivadas a 37 °C a pH 7,0 hasta una DO₆₀₀ 0,5, para luego realizar extracción de RNA y una posterior medición de expresión mediante RT-qPCR. Los resultados se expresan como el promedio ± DE. (n=3).

7.6 La delección de *glnA* no cambia la expresión de los reguladores *marA*, *marR*, *ramA* y genes que codifican para la bomba de expulsión AcrB-TolC

Desde el punto de vista fisiológico, los sistemas de regulación global pueden responder a muchas señales de estrés ambiental incrementando la expresión de bombas de expulsión y disminuyendo la expresión de porinas para detener la acumulación de substratos potencialmente tóxicos dentro del citoplasma. Asimismo, mecanismos regulatorios complejos son responsables de la entrada y salida de los antimicrobianos determinando así su concentración intracelular. Así, las porinas junto con las bombas de expulsión determinan la concentración de los antibióticos al interior de la bacteria. En bacterias resistentes se han encontrado proteínas que regulan la sobreexpresión de bombas de expulsión junto con la represión de porinas^{110,111}.

En *Salmonella* y otras bacterias las bombas de expulsión están bajo control transcripcional preciso y complejo. En esencia, la regulación es vía represores locales, activadores transcripcionales,

sistemas regulatorios de dos componentes, entre otros mecanismos. Los últimos dos comprenden reguladores globales con numerosos genes dentro de sus regulones ¹¹².

Con el objeto de caracterizar si los cambios en la susceptibilidad observados en la mutante *glnA* afectan la vía de salida de los antimicrobianos, se midió la expresión relativa de los mensajeros de los determinantes *marA*, *marR*, *ramA*, *acrB* y *tolC*. Estos determinantes participan en la resistencia a quinolonas en *S. Typhi* y otras enterobacterias. En la Figura 20, se muestran los resultados de los ensayos de expresión relativa, entre la mutante *glnA* y la cepa silvestre donde fue observado que no hubo diferencias significativas de la expresión de los reguladores estudiados, así como tampoco en los transcritos de la bomba de expulsión AcrB-TolC.

Estos resultados sugieren que el cambio en la susceptibilidad observada en la mutante *glnA* no se debe a cambios en la expresión de las bombas de expulsión, al menos en el sistema más importante para *Salmonella* y que el cambio observado en la susceptibilidad obedece a un incremento en la entrada y no a una disminución de la expulsión de ciprofloxacino. La mutación en *glnA*, aparentemente, tampoco generaría una respuesta compensatoria de aumento de la vía de expulsión del antimicrobiano.

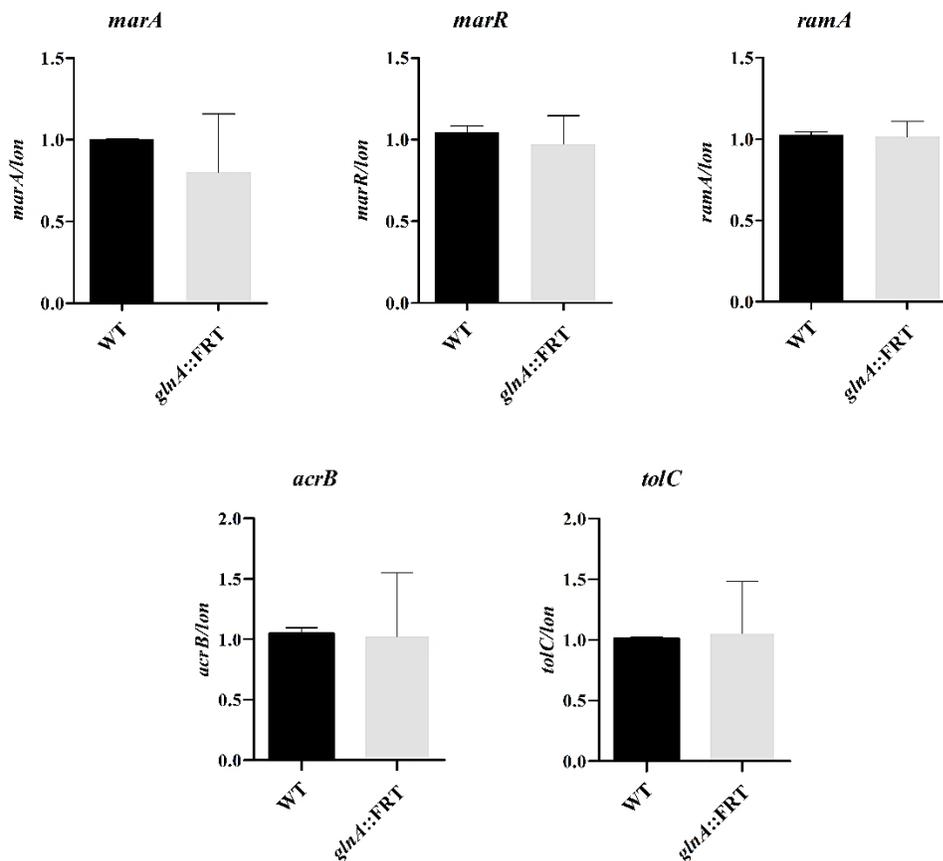


Figura 20. La expresión de *marA*, *marR*, *ramA*, *acrB* y *tolC* no cambia significativamente en la mutante *glnA*.

Medición de la expresión relativa de los genes *marA*, *marR*, *ramA*, *acrB* y *tolC* de *S. Typhi* STH2370 (WT) y *S. Typhi* STH2370 *glnA::FRT*. Las cepas fueron cultivadas a 37 °C a pH 7,0 hasta una DO₆₀₀ 0,5, para luego realizar extracción de RNA total y una posterior medición de expresión mediante RT-qPCR. Los resultados se expresan como el promedio ± DE. (n=3).

7.7 La delección de *glnA* de *S. Typhi* provoca cambios pleiotrópicos en la expresión de genes

A fin de complementar y tener información que lleve a caracterizar con mayor detalle el mecanismo por el que la mutante *glnA* aumenta la expresión de la porina OmpF, se realizó un análisis transcriptómico global de la cepa silvestre y de la mutante *glnA*. Las muestras de RNA extraídas para el análisis del transcriptoma fueron obtenidas a una DO₆₀₀ 0,5 usando el método de Fenol ácido caliente, según lo descrito en Métodos. Para la eliminación del DNA se utilizó DNasa recombinante con el propósito de disminuir la degradación del RNA que ocurre con el tratamiento térmico con DNasa I. Con esta metodología se pudo obtener RNA de la calidad necesaria para la construcción de las genotecas.

Las muestras de RNA total purificado fueron enviadas al Área de Secuenciación del Centro de Genómica y Bioinformática de la Universidad Mayor donde se construyeron las genotecas para análisis mediante *RNA-Seq-Illumina*. Las genotecas se prepararon con el kit *TruSeq Stranded Total RNA LT Kit (Illumina)*. Para la secuenciación se usó el sistema *NextSeq 500* y para el análisis de datos se utilizó el *software DESeq2*. Se utilizó como genoma de referencia la cepa *S. Typhi* STH2370⁶⁹. Los genes que fueron anotados con expresión diferencial fueron aquellos que tuvieron una tasa de cambio mínimo de dos veces ($\log_{2}FC \geq 1$) y valor *p* ajustado o *False Discovery Change* menor o igual a 0,05 ($FDR \leq 0,05$).

Desde el análisis de los transcriptomas se pudo observar que la delección del gen *glnA* provocó cambios pleiotrópicos en la expresión de genes. Un total de 267 genes fueron observados como diferencialmente expresados: 179 genes fueron reprimidos mientras que 88 genes fueron sobreexpresados respecto a la cepa WT *S. Typhi* STH2370 (Anexo 2 y 3, respectivamente).

Entre los genes que se encuentran con una expresión menor en la cepa *glnA* (Anexo 2) están aquellos genes asociados a la estructura del flagelo, motilidad y quimiotaxis. Ejemplo de ello son los genes de los operones asociados a la estructura del flagelo *flg*, *fli*, *flh*, y los genes relacionados a quimiotaxis y motilidad *che* y *mot*, respectivamente. Los genes estructurales del T3SS (*Type three secretion system* por sus siglas en inglés, localizados en la SPI-1 (*Salmonella Pathogenicity Island*, por sus siglas en inglés), incluyen *prgHIJK* (*PhoP repressed genes*), *spaMNOPQRS* e *invABCEFGH*, se encuentran reprimidos en la mutante *glnA*, excepto *invB* e *invC*.

Junto con lo anterior, el análisis transcriptómico reveló que 34 genes que codifican para proteínas hipotéticas se encuentran reprimidas en la mutante *glnA*. Entre estos genes se encuentran proteínas de membrana y distintos reguladores transcripcionales pertenecientes a distintas familias. Destaca también la represión de reguladores transcripcionales conocidos (*invF*, *hilC*, *sprB*) e hipotéticos (*STY2996* y *STY4515*), todos ellos pertenecen a reguladores transcripcionales de la familia AraC.

Entre los genes que diferencialmente aumentaron su expresión en la mutante *glnA* (Anexo 3), se encuentran aquellos genes relacionados con la red de asimilación del nitrógeno, tales

como *glnK*, *amtB*, *glnG*, *glnL*. También se encontraron sobreexpresadas permeasas asociadas al transporte de aminoácidos.

De los 88 genes que se encontraron sobreexpresados, 13 codifican para proteínas hipotéticas, 19 codifican para proteínas putativas y 3 corresponden a proteínas probables. Para la anotación AA09_09975, no se encontró coincidencia con algún gen de *S. Typhi*, encontrándose en una región intergénica. Esta secuencia en *S. Typhimurium* 14028s codifica para un RNA regulador del almacenamiento de carbono y se encontró con una expresión diferencial de 12 veces mayor respecto *S. Typhi* WT. También se encontraron sobreexpresados genes de respuesta al estrés como *bolA*, *relA*, *rpoS*, así como también genes asociados a sistemas de dos componentes, como *glnL-glnG*, *dpiB-dpiA*.

Se realizó una búsqueda bibliográfica de los genes obtenidos del análisis transcriptómico que relacionara cambios con el gen *ompF*. Dado el número de genes involucrados se seleccionó algunos por considerarse relevantes como resultado de la búsqueda bibliográfica. Estos genes fueron *glnL* y *glnG* cuyo cambio en la expresión se confirmó por RT-qPCR.

7.8 La delección de *glnA* activa el sistema de dos componentes NtrBC

Investigaciones previas en *E. coli* encontraron, mediante experimentos de microarreglos, que *ompF* está bajo el control del sistema de dos componentes NtrBC, codificado por los genes *glnL* y *glnG*, respectivamente ¹¹³. En la Figura 21, se puede observar que para *glnL* el cambio en la expresión fue 12 veces mayor que la cepa silvestre (el análisis del transcriptoma arrojó una diferencia de 8 veces). Para el gen *glnG* el cambio en la expresión

en la mutante *glnA* fue de 8 veces mayor respecto a cepa silvestre (en comparación con el valor de 4,5 veces del análisis transcriptómico). Esto indica que *glnA* regula negativamente la expresión de *glnL* y *glnG*. Esto último podría ocurrir, posiblemente, al mantener las concentraciones fisiológicas de glutamina.

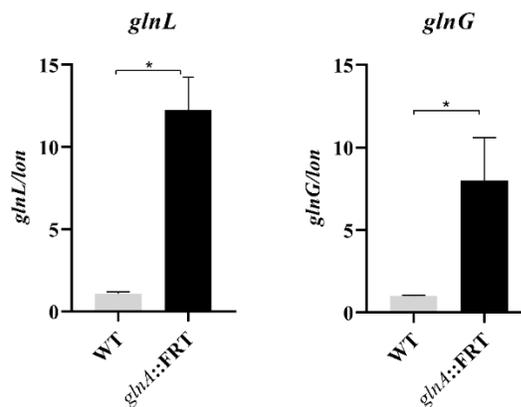


Figura 21. Los genes *glnL* y *glnG* se sobreexpresan en la mutante *glnA*

Medición de la expresión relativa de los genes *glnL* y *glnG* de *S. Typhi* STH2370 (WT) y *S. Typhi* STH2370 *glnA::FRT*. Las cepas fueron cultivadas a 37 °C a pH 7,0 hasta una DO₆₀₀ 0,5, para luego realizar extracción de RNA total y una posterior medición de expresión mediante RT-qPCR. Los resultados se expresan como el promedio ± DE (n=3). * $p \leq 0,05$ comparada con WT.

Se estudió el fenotipo de resistencia a ciprofloxacino asociado a *glnL* y *glnG*. Mutaciones nulas de estos genes fueron transducidos en *S. Typhi*. Como se muestra en la Tabla 13, la delección del gen *glnL* no tuvo efecto en la resistencia a ciprofloxacino. Cuando *glnG* está delecionado en *S. Typhi*, la mutante muestra un aumento de la resistencia moderado a ciprofloxacino.

Tabla 13. Susceptibilidad a ciprofloxacino de *S. Typhi* STH2370 (WT) y mutantes nulas en genes *glnL*, *glnG*, y *ompF*

<i>S. Typhi</i> STH2370	Halos de inhibición (mm \pm DE)
WT	36,4 \pm 0,4
Δ <i>glnL::kan</i>	36,2 \pm 0,0
Δ <i>glnG::kan</i>	32,6 \pm 0,8
Δ <i>ompF::kan</i>	27,7 \pm 0,3

Las cepas se crecieron toda la noche a a 37 °C en medio LB. Para el ensayo de difusión en disco, un césped fue sembrado en agar MH pH 7,3. Discos de papel filtro fueron cargados con 5 μ L de ciprofloxacino 2 mg/mL y colocados en el centro de placa. Las placas fueron cultivadas durante la noche a 37°C para medir las zonas de inhibición. Los resultados se expresan como el promedio \pm DE. (n=3).

8 DISCUSIÓN

8.1. *Screening* bajo condiciones selectivas a partir de una colección de mutantes obtenida por mutagénesis aleatoria y selección de una mutante para su caracterización

Si bien la construcción de un *pool* de mutantes con el transposón EZ-Tn5 es una metodología de fácil aplicación, la realización del *screening* bajo condiciones selectivas es un procedimiento laborioso y que consume tiempo³⁷. Del *screening* a 3.216 mutantes de *S. Typhi* *zxx::EZ-Tn5* realizado con concentraciones subinhibitorias de cloruro de benzalconio, cobre y ciprofloxacino, de acuerdo a nuestros criterios de búsqueda, se preseleccionaron 19 mutantes *S. Typhi* *zxx::EZ-Tn5* para la identificación del sitio de la inserción, que correspondió al 0,5 % del *pool* de mutantes. El bajo rendimiento obtenido es similar al encontrado en distintas publicaciones que han utilizado esta metodología^{42-45,56,114}. Las 19 mutantes *S. Typhi* *zxx::EZ-Tn5* preseleccionadas mostraron aumentos en el halo de inhibición mayor a 6 mm y disminución de la CIM de 2 a 16 veces respecto la cepa silvestre.

El *screening* a una población de mutantes con inserciones al azar de un transposón es una metodología que no permite discriminar y no puede descartar *a priori* el encuentro de blancos ya conocidos, disminuyendo aún más el rendimiento final de la técnica. Por ello, es necesario identificar cada una de las mutantes seleccionadas. Como era predecible, esta búsqueda mostró determinantes conocidos involucrados en resistencia y cuya inactivación

rendiría aumento en la susceptibilidad, estos determinantes están representados por inserciones en los genes *acrA*, *acrB*, *rfaE*, *rfaG* y *tolC*^{36,42,44}. Sin embargo, y a pesar del bajo rendimiento de la metodología se encontró nuevos determinantes como *aeiA*, *cysE*, *dacC*, *glnA*, *recB*, *recC*. La interrupción de estos genes con el transposón EZ-Tn5 provocó un aumento en la susceptibilidad a ciprofloxacino. Sin embargo, no se encontró determinantes nuevos para cobre y benzalconio. Una posible explicación a este resultado y que es una de las limitaciones de este estudio se debe a que del ensayo de transposición no se obtuvo un número de mutantes que cubra en totalidad el genoma de *S. Typhi*.

Considerando el tamaño del genoma de *S. Typhi* STH2370 y el número de mutantes *S. Typhi* *zxx::EZ-Tn5* se obtiene en promedio una inserción cada 1.493 pb⁶⁹. Esta densidad de inserciones es baja si se compara con otros estudios en *S. Typhi* y *S. Typhimurium* donde se han obtenido *pools* de mutantes con más de 80 inserciones únicas por gen⁶². Sin duda, *pools* de mutantes con máxima cobertura de genes facilita el *screening* bajo una condición selectiva particular¹¹⁵. Sin embargo, el tiempo que conlleva su realización limitó que no se realizara un *screening* en una población mayor de mutantes. Posiblemente, en un *screening* a una colección de mutantes que tenga una mayor cobertura del genoma de *S. Typhi* permita encontrar determinantes no descritos para estos y otros antimicrobianos. Sería interesante para futuros estudios determinar el resistoma de *S. Typhi* a los distintos antimicrobianos.

A su vez, las mutantes seleccionadas e identificadas deben ser comprobadas para descartar efectos polares producto de la inserción del transposón^{44,62}. De acuerdo con nuestros

parámetros de selección para la búsqueda, la mutante *aefA*, resultó la mejor candidata para caracterización. Esta mutante mostró susceptibilidad incrementada a ciprofloxacino y en el *screening* secundario a una variedad de distintos antimicrobianos. Sin embargo, al construir la mutante sitio dirigida, el fenotipo encontrado en el *screening* se perdió. Este gen codifica para una proteína integral de membrana, que expulsa iones potasio y responde a cambios en la turgencia de la célula. Su activación requiere altas concentraciones de potasio en el espacio periplásmico. Este gen se encuentra en el entorno del operón *acrAB*.

Los genes *acrAB* codifican para una bomba de expulsión en *E. coli* y *Salmonella*. El gen *acrR* codifica para un represor de *acrAB*. El gen *aefA* está corriente abajo del represor *acrR*. Posiblemente, la inserción del transposón y luego la inserción del casete de resistencia a kanamicina, produjo un efecto polar en la transcripción del operón *acrAB*, disminuyendo su expresión y, por lo tanto, aumentando la susceptibilidad observada. Construida la mutante *aefA::FRT*, posiblemente la transcripción del operón *acrAB* fue normal, restaurándose la susceptibilidad tipo silvestre.

Por otra parte, de los 12 genotipos obtenidos 5 correspondieron al gen *rfaG* que codifica para una glicosiltransferasa, que participa en la biosíntesis del *core* del lipopolisacárido⁹⁵. Estudios de secuenciación de inserciones realizados con Tn5 en serovares de *S. enterica* han descrito un leve sesgo hacia regiones de secuencias ricas en AT⁶². En consecuencia y considerando que el gen *rfaG* tiene una sola copia en el genoma de *S. Typhi*, es posible que este gen presente un *hotspot* para el transposón EZ-Tn5.

Además de las limitaciones anteriores, se encontró nuevos genes asociados a resistencia cuya inactivación aumenta la susceptibilidad en *S. Typhi*. Entre estos se seleccionó para su posible caracterización dos que están asociados al metabolismo de aminoácidos: *glnA* y *cysE*; *dacC* participaría en la formación de pared y los genes *recB*, *recC*, son genes cuyos productos están asociados a funciones del DNA (Turnbull and Surette, 2008; van Heeswijk et al., 2013; González-Soltero et al., 2015; Obergfell et al., 2018).

8.2 Selección de la mutante *glnA*

La selección de una mutante para su caracterización se basó en la magnitud del cambio de la susceptibilidad observada y la novedad encontrada. Para discriminar y elegir entre las mutantes que fueron identificadas y preseleccionadas, se realizó un segundo *screening* con una batería de antimicrobianos con el objeto de cubrir gran parte del espectro de sitios de acción conocidos y encontrar patrones de susceptibilidad general o particular. Para los genes *recB*, *recC* y *dacC* el mecanismo detrás del cambio en la susceptibilidad era aparentemente deducible y aunque que mostraban un cambio mayor en la CIM que los otros determinantes no se escogieron para la caracterización. Cabe destacar que durante la realización de este trabajo se publicó un artículo, demostrando la relación entre la inactivación de *recBC* y el aumento en la susceptibilidad a quinolonas en *E. coli*¹¹⁷.

Luego de descartar la mutante *aeiA* por resultar ser un falso positivo, se decidió caracterizar la mutante *glnA*, por parecer una mutante prometedora ya que no se tenía

antecedentes que relacionaran la falta de *glnA*, un gen metabólico, con el aumento en la susceptibilidad a quinolonas en *S. Typhi*. Tras comprobar el fenotipo de cambio en la susceptibilidad tanto por el método de difusión en agar como en la determinación de la CIM, se comprobó que las mutantes en *glnA* aumentan al doble la susceptibilidad a ciprofloxacino. La mayoría de los genes involucrados en mecanismos de resistencia intrínseca sólo resultan en una reducción 2 a 4 veces la CIM. El resistoma intrínseco comprende el conjunto de genes cromosomales que están involucrados en la resistencia intrínseca y cuya presencia en cepas de una bacteria es independiente de la exposición previa a los antimicrobianos y no es debida a transferencia horizontal de genes ⁴³. El gen *glnA* caería dentro de esta categoría, siendo parte del resistoma intrínseco a quinolonas de *S. Typhi* y posiblemente de otras enterobacterias. Existen antecedentes que señalan que la inhibición de glutamina sintetasa (GS) puede tener potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades infecciosas como tuberculosis, pero también para enfermedades crónicas como cáncer e incluso para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer; sin embargo, su estudio como potencial blanco para el tratamiento de enfermedades causadas por enterobacterias no ha sido explorado ¹²⁰.

El estudio del resistoma intrínseco de patógenos bacterianos ha revelado que distintos genes metabólicos contribuyen a la resistencia a antibióticos. Es así como, actualmente, ha sido de particular interés conocer detalladamente cómo los antibióticos perturban el metabolismo bacteriano y cómo el metabolismo puede influir en la actividad antibiótica observada. Expertos señalan la importancia de profundizar las investigaciones en esta materia y caracterizar los mecanismos intrínsecos que reducen la susceptibilidad a los

antibióticos en organismos ya susceptibles. En algunos casos, estos genes incrementan sólo marginalmente la resistencia ^{42,43,48,49,121}. Intervenciones que modifiquen la susceptibilidad en patógenos que tienen mecanismos de resistencia intrínsecos, y también en aquellos que tienen mecanismos de resistencia adquirida por mutación o transferencia horizontal de genes, se podría lograr probablemente con fármacos adyuvantes que alteren el metabolismo bacteriano. Este enfoque ofrece una perspectiva prometedora para la terapia de infecciones resistentes en una biosfera contaminada con antibióticos ⁴⁹.

Entre las primeras características que se observaron en la mutante *glnA* de *S. Typhi* fue su lento crecimiento, como consecuencia de la disminución del *pool* de glutamina. La limitación de nutrientes resulta en reducidas tasas de crecimiento, gatillando adaptaciones fisiológicas y de circuitos regulatorios. Existen antecedentes que señalan que *S. Typhimurium* y *E. coli*, aparentemente, percibe la restricción de nitrógeno externa como una caída interna del *pool* de glutamina ^{122,123}.

De los resultados del transcriptoma, se encontró que la mutante *glnA* sobreexpresa los genes del operón *glnHPQ*, que permiten el transporte activo de glutamina con una alta especificidad ¹¹⁸. Sin embargo, la sobreexpresión de este transportador, aparentemente, no es capaz de suplementar la glutamina necesaria para que la mutante *glnA* alcance un crecimiento normal en medio LB. Por otra parte, llama la atención que la mutante *glnA* tiene un crecimiento lento y es más susceptible a ciprofloxacino. En términos generales, la resistencia a los antibióticos cambia el *fitness* bacteriano usualmente por disminuir su valor, lo cual es generalmente conocido como el costo biológico de la resistencia, las

bacterias de crecimiento lento tienden a ser más resistentes a los antimicrobianos; sin embargo, la mutante *glnA* rompe con esta regla y es más susceptible ^{124,125}.

En el análisis del transcriptoma se encontró que la mutación *glnA* tiene disminuido el nivel de expresión del gen *STY2158*, que codifica para una proteína similar al regulador transcripcional de división celular SdiA. La represión de este gen junto con otros genes podría explicar en parte, la fase *lag* significativamente mayor en la mutante nula en *glnA* (Figura 7).

Fue llamativo que la mutante en el gen *glnA* no pudo ser complementada ni en cis ni trans (vectores de expresión o en un *locus* distinto al original) con ninguna de las estrategias utilizadas, ¿Cómo se puede explicar que esta mutante no recupere su fenotipo por experimentos de complementación? Dado el rol fundamental que tiene GS en la asimilación del nitrógeno al incorporar amonio y con ello sintetizar glutamina, si hubiera más de una copia del gen de GS podría significar un exceso de producción de glutamina, entonces la totalidad del glutamato de la célula sería convertido a glutamina y no habría suficiente glutamato para la síntesis de proteínas, o por el contrario, se podría pensar que un exceso de glutamina disponible podría llevar a un exceso de síntesis de glutamato, lo que podría ser tóxico para la bacteria. Es posible que razones que tengan que ver con el dosaje génico impidan complementar en cis o en trans el gen *glnA* en *S. Typhi*. Sin embargo, existen antecedentes en la literatura que muestran que han transducido el gen *glnA* de *S. Typhimurium* a *Vibrio cholerae* ¹²⁶.

8.3 Mecanismo(s) que aumenta(n) la susceptibilidad a ciprofloxacino en *S. Typhi glnA*

Se preguntó por qué la inactivación del gen *glnA*, un gen que codifica para GS (única ruta conocida en enterobacterias para la síntesis del aminoácido glutamina) aumentó la susceptibilidad a quinolonas en *S. Typhi*. Según los antecedentes de la literatura, concerniente con el mecanismo de acción de la inhibición de GS en *M. tuberculosis*, los autores han señalado que esta micobacteria posee cuatro GS homólogas, una de las cuales juega un rol en la biosíntesis de la pared celular, específicamente vía la producción de un componente poli-L-glutamato-glutamina, un componente encontrado exclusivamente en micobacterias patogénicas. Esta GS es liberada al espacio extracelular, pudiendo ser fácilmente inhibida, disminuyendo así la disponibilidad de glutamina para la construcción de la pared celular actuando sinérgicamente con isoniazida ^{127,128}.

En *S. aureus* susceptible y meticilino-resistente, se encontró que la disminución de los niveles de GS y la consecuente disminución de la disponibilidad de glutamina causó una disminución de los niveles de resistencia a meticilina. La construcción de muropéptido del peptidoglicano de *S. aureus* contiene residuos de isoglutamina, en el cual la amidación de los residuos de glutamato en el peptidoglicano involucra la participación de glutamina como dador de NH_4^+ . Por lo tanto, en *S. aureus* la actividad de GS puede provocar modificaciones en la pared celular, tales como espesor o reducción en el entrecruzamiento del peptidoglicano ^{129,130}.

Publicaciones recientes señalan que en *Streptococcus pneumoniae* sensible y resistente a penicilina la inhibición de GS aumentó la susceptibilidad a este antibiótico ; asimismo la

inhibición de GS con sorafenib inhibe el crecimiento de *Staphylococcus xylosus* *in vitro* como *in vivo* (El Khoury et al., 2017; Cui et al., 2019).

Dado que la actividad de GS tiene un rol bien establecido en la formación de la pared celular de micobacterias, y existe información experimental de su participación la biosíntesis de la pared celular de bacterias Gram positivo, un mecanismo similar podría ocurrir con la inactivación de *glnA* en *S. Typhi*. Sin embargo, los resultados del *screening* secundario en la mutante *glnA* no mostraron cambios en la susceptibilidad a los antimicrobianos cuyos blancos participan en la biosíntesis de la pared celular. No hubo cambios en los halos de inhibición de los carbapenémicos: meropenem, imipenem y ertapenem. Asimismo, la mutante *glnA* no mostró cambios en la susceptibilidad a los beta-lactámicos ampicilina y la combinación amoxicilina-clavulánico. Sólo mostró un aumento en el halo de 5 mm a la cefalosporina ceftriaxona.

Junto con lo anterior, los resultados del análisis global del transcriptoma no mostraron una expresión diferencial en genes conocidos de participar en la síntesis del peptidoglicano. Estos resultados ponen de manifiesto que existiría una diferencia en el mecanismo del aumento en la susceptibilidad a antimicrobianos mediado por GS descrito en *M. tuberculosis* y algunas bacterias Gram positivo, del encontrado en *S. Typhi* en este estudio.

Debido a que la mutación de *glnA* provoca un estado de hambruna relativa de nitrógeno, nos preguntamos si este estado metabólico podría conducir a que el perfil de proteínas

de membrana externa pudiera estar alterado. Al realizar un análisis del perfil de proteínas de membrana externa, se encontró que la mutante *glnA* tiene aumentada la porina OmpF.

La proteína de membrana externa F (OmpF) de *S. Typhi* es una porina importante en la translocación de antibióticos. La unidad funcional de OmpF es un homotrímero, que forman canales llenos de agua, que permite la difusión pasiva de pequeñas moléculas hidrofílicas polares (600-700 Da) como agua, nutrientes, antibióticos y productos de desecho a través de la membrana bacteriana externa. Cada monómero de peso molecular 37 kDa forma una estructura de barril β que tiene 16 cadenas β que abarcan la membrana

133.

La internalización de las quinolonas a la bacteria es un paso clave para su actividad antibacteriana. Las fluoroquinolonas hidrofóbicas pueden difundir parcialmente a través de la bicapa lipídica, pero la mayoría de las fluoroquinolonas, incluido ciprofloxacino, son hidrofílicas y así su capacidad para cruzar la membrana por difusión está comprometida. Las porinas, especialmente OmpF se convierte entonces en la vía principal para la entrada de estas fluoroquinolonas. Estudios que han evaluado la interacción de ciprofloxacino con modelos de membrana en bacterias Gram negativo, muestran que la entrada de ciprofloxacino a través de la membrana bacteriana debiera ser dependiente de OmpF^{101,102}.

Está ampliamente descrito en bacterias Gram negativo que, si la expresión de porinas está reprimida, conduce a la expresión de resistencia a quinolonas y otros antimicrobianos, siendo este mecanismo codificado cromosomalmente¹³⁴⁻¹³⁹. Junto con

lo anterior, se ha comunicado en cepas resistentes a quinolonas de *S. Typhi* clínicas y de laboratorio, una disminución de producción de la porina OmpF^{111,140-142}.

Análisis posteriores de la expresión relativa del transcrito del gen *ompF* mostraron que la mutante *glnA* sobreexpresa *ompF* en 4,4 veces respecto la cepa silvestre, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Este resultado confirma lo observado en el perfil de proteínas de membrana externa. Un trabajo encontró en cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* hipersusceptibles a betalactámicos y fluoroquinolonas tienen una sobreproducción de la porina OprF¹⁴³.

Luego, para estudiar si cambios en la expresión de *glnA* se relacionan con cambios en la expresión de *ompF*, se construyó una mutante en *glnA* cuyo promotor se reemplazó por el casete *tetRA* que posee un promotor inducible por tetraciclina. Debido a interferencias en el sistema se quitó del constructo el elemento *tetA*, dejando el P^{tet} obteniéndose la mutante *glnA^{TD}*. Con este constructo *glnA^{TD}*, se midió la expresión relativa de los transcritos y se encontró que cuando aumenta la expresión del gen *glnA* disminuye la expresión de *ompF*. En los ensayos de susceptibilidad, cuando se indujo la expresión de *glnA* disminuyó el halo de inhibición a ciprofloxacino. Lo contrario se observó en la mutante de *ompF^{TD}* en la misma magnitud.

Sorprendentemente, un trabajo reciente encontró que mutantes de *E. coli* resistentes a quinolonas sobreexpresan el gen *glnA* como indicador del aumento del regulador RpoN y otros reguladores tales como RpoS, SOS y RpoH. Los autores postulan que la

asociación estaría mediada por una sobreexpresión de respuesta al estrés en mutantes de la girasa como un resultado de superenrollamiento alterado ¹⁴⁴. En contraste, esta investigación postula que el cambio en la expresión de *ompF* y consecuentemente el aumento de la cantidad de la porina OmpF, explicaría al menos en parte el mecanismo por el cual la delección de *glnA* provoca un aumento en la susceptibilidad a quinolonas.

Otra diferencia con el artículo de Webber *et al.*, (2017) resultan en el gen *rpoN*, que no mostró una expresión diferencial en el análisis transcriptómico en la mutante *glnA* respecto la cepa WT, por lo cual no estaría, aparentemente mediando el cambio en la expresión de la porina OmpF bajo las condiciones probadas. Sin embargo, se debería evaluar y confirmar mediante RT-qPCR si la expresión de *rpoN* cambia en la mutante *glnA*.

De acuerdo con datos publicados se puede concluir que la regulación de porinas bajo limitación de nutrientes es extremadamente compleja y no conocida del todo. Las porinas controlan la permeabilidad de la membrana externa y la limitación de nutrientes regula fuerte y diferencialmente su expresión. Además de la limitación de nutrientes, el nivel de porinas es también sensible a una amplia variedad de parámetros ambientales que incluyen osmolaridad, temperatura, pH, fase de crecimiento y densidad celular. La osmolaridad es el factor más extensamente estudiado. Por ejemplo, condiciones de baja osmolaridad favorecen su producción ¹⁴⁵.

En *E. coli* la síntesis de GS incrementa cuando el crecimiento está limitado por la disponibilidad de nitrógeno. La síntesis de GS se regula en respuesta a la disponibilidad

de la fuente de nitrógeno y carbono. La limitación de nitrógeno externa ha sido asociada con una caída en el *pool* interno de glutamina; así, el nivel de nitrógeno en la célula señalado por glutamina y 2-oxoglutarato, regula la actividad de GS ¹¹⁸.

Los mayores niveles de expresión del gen *glnA*, que codifica para GS, se detectan en limitación de nitrógeno y los menores en presencia de amonio. Cultivos de *E. coli* en un medio con exceso de glucosa y limitación de nitrógeno exhiben un alto nivel de GS no adenililada (forma activa de la enzima). Por el contrario, en cultivos con abundancia de nitrógeno y glucosa limitada, los niveles de GS son reprimidos y la enzima se encuentra completamente adenililada (forma inactiva) ¹¹⁸.

Por otra parte, análisis de PME han mostrado en *E. coli* creciendo en condiciones de limitación de glucosa un aumento de la porina OmpF, cambio no observado cuando crece en limitación de nitrógeno ^{146,147}. Estos resultados aparentemente contradictorios a nuestro hallazgo de aumento de la porina OmpF en la mutante *glnA*, son congruentes con los nuestros.

En el estudio realizado por Liu y Ferenci (1998), la enzima GS se encontraba completamente funcional. La actividad máxima de GS ocurre a bajas concentraciones de fuente de amonio, por lo tanto, se puede inferir que, en las condiciones de crecimiento bajo limitación de nitrógeno utilizada por los autores, el gen *glnA* se está expresando para una actividad máxima de la enzima GS. En estas condiciones los autores encontraron que OmpF se expresa menos. Esto se relacionaría con nuestros resultados, donde la expresión de *glnA* disminuye la expresión de *ompF*. Posiblemente, los efectos encontrados en el

perfil de proteína de membrana externa, por estos autores no se debe solamente al cambio de las condiciones de crecimiento, sino que también debido a la expresión del *glnA* y la consecuente actividad de GS.

Se encontró una relación inversa entre la expresión de *glnA* y *ompF* y una correlación directa entre la expresión de *glnA* y MicF. La expresión disminuida de MicF en la mutante nula en *glnA* podría explicar al menos en parte el incremento de expresión de *ompF* y el incremento en la susceptibilidad a ciprofloxacino en las mutantes en *glnA*. Este resultado se correlaciona con los resultados fenotípicos de resistencia donde la delección de *micF* en *S. Typhi* STH2370 provocó un aumento de la susceptibilidad a ciprofloxacino. En *S. Typhi*, cambios en la expresión del RNA no codificante MicF, ha sido relacionado a cambios en la susceptibilidad antimicrobiana ¹⁴⁸. Consecuentemente, la delección de *micF* en *Salmonella* y *E. coli* incrementa, mientras que la sobreexpresión disminuye la susceptibilidad a antimicrobianos tales como cefalosporinas y norfloxacino ¹⁴⁹.

El nivel de expresión de *ompC* fue menor en la mutante *glnA*. Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas. Asimismo, estudiamos si los cambios en la expresión de *ompC* son regulados por el nivel de expresión de *glnA* usando la mutante inducible *glnA^{TD}*. No se observó cambios de expresión de *ompC* atribuibles a cambios en la expresión de *glnA*. Respecto al patrón de expresión de porinas, los resultados sugieren que los cambios en la expresión de *glnA* sólo afectan la expresión de *ompF* y no de *ompC* en *S. Typhi*. Cambios que afectan solo a una porina en particular, ya

han sido reportados en *S. Typhi*, por ejemplo, cambios en la osmolaridad sólo afectan la expresión de *ompF* mientras que los niveles de *ompC* permanecen constantes ^{108,150}.

Junto con lo anterior y vía ensayos de expresión de RT-qPCR, se midió el nivel de expresión relativa de los genes que pertenecen al sistema de dos componentes *envZ-ompR*. Este sistema comprende el sensor kinasa unido a la membrana EnvZ que monitorea cambios en la osmolaridad ambiental y transmite la información al factor de transcripción citoplasmático OmpR a través de reacciones de fosforilación y desfosforilación, y así regular el nivel de síntesis de OmpF y OmpC ¹⁰⁸.

En *E. coli* el nivel de fosforilación de OmpR es crítico para su interacción con el DNA de regiones regulatorias de *ompC* y *ompF*. Altos niveles de OmpR fosforilado (OmpR-P) activan la expresión de *ompC* pero reprimen la expresión de *ompF*, mientras que bajos niveles de OmpR-P pueden activar la expresión de *ompF*, pero no incrementan la transcripción de *ompC* ¹⁵¹. Estudios de mutantes nulas de *ompR* en *S. Typhi* han mostrado una disminución de ambas porinas ^{109,152,153}. Nuestros resultados muestran que no hubo cambios significativos en la expresión de estos dos genes en la mutante *glnA* respecto la cepa silvestre.

En bacterias Gram negativo, la concentración celular de quinolonas es regulada por las acciones opuestas de la entrada por difusión y salida mediada por bombas de expulsión. Las bombas de expulsión de múltiples antibacterianos, especialmente aquellas que pertenecen a la familia RND, se encuentran involucradas entre los mecanismos de resistencia a quinolonas en *Salmonella* ^{97,138,140}.

Uno de estos sistemas de multirresistencia a antibióticos mejor caracterizados en *Salmonella* es complejo tripartito AcrAB-TolC, que confiere resistencia a una amplia variedad de compuestos, incluyendo quinolonas ^{112,154}

Con el objeto de evaluar si el cambio en la susceptibilidad observada podría deberse a una disminución de la salida del antibiótico mediada por bombas de expulsión, medimos la expresión de los genes *acrB*, *tolC* que forman parte del complejo tripartito AcrAB TolC y algunos reguladores transcripcionales de estas proteínas como *marA*, *marR* y *ramA*.

MarA es un factor de transcripción que regula positivamente bombas de expulsión y negativamente la permeabilidad de la membrana. MarA produce resistencia intrínseca a múltiple a antibióticos, principalmente por regular positivamente la expresión de *acrB* y *tolC* y por regular positivamente *micF*, un RNA antisentido que regula negativamente la traducción de *ompF* ¹⁵⁵.

RamA es otro activador transcripcional que influye la expresión de *acrAB*. RamA es regulada por RamR, que es un represor de la familia TetR. La expresión de *ramA* es reprimida y así RamA es producida a un nivel relativamente bajo. Tras la exposición a un inductor la transcripción de RamA es desreprimida. RamA se une corriente arriba de sus genes blanco y activa la transcripción de genes de su regulón que incluyen *acrAB* y *tolC*. Se ha encontrado que cuando se sobreexpresa *ramA* baja la producción de la porina OmpF; sin embargo, si esta sobreexpresión es mayor, se activa el gen *ompF* ¹⁵⁶.

De los análisis de expresión relativa por RT-pPCR, no se encontró que estos genes estuvieran diferencialmente expresados (Figura 19). Además, estos resultados son concordantes por el hallazgo en la mutante *glnA* que no mostró cambios en el halo de inhibición a acriflavina respecto la cepa silvestre (18 mm para ambas cepas, Tabla 7).

Todos estos resultados sugieren que el complejo tripartito formado por la bomba de expulsión AcrB, la proteína transmembrana AcrA y el canal de membrana externa TolC se encuentra sin cambios en la mutante *glnA* respecto la cepa silvestre y que el cambio en la susceptibilidad observada no se debe aparentemente a una disminución de la salida del antimicrobiano, al menos de su sistema mejor caracterizado. Junto con ello, estos resultados refuerzan la hipótesis del cambio en la susceptibilidad a quinolonas en la mutante *glnA de S. Typhi* se debe a cambios en la porina OmpF, favoreciendo la entrada de ciprofloxacino a la célula bacteriana.

Como una estrategia para profundizar en el mecanismo por el que la mutante *glnA* aumenta la susceptibilidad a quinolonas, se realizó una extracción de RNA total para el análisis global de los transcriptomas de la mutante *glnA* y la cepa WT en fase de crecimiento exponencial. Se encontró que la delección de *glnA* provoca cambios globales en la expresión de genes, modulando cambios en la expresión de reguladores globales asociados a virulencia, provocando represión y por otra parte aumentando la expresión de genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno.

Entre los genes con cambios en su expresión se encuentran los genes que codifican para proteínas de invasión del sistema de secreción tipo III, encontrándose reprimidos. El T3SS transloca proteínas efectoras en la célula del hospedero y media la invasión celular.

Los genes de la SPI-1, son esenciales para la invasión de las células del hospedero. La principal proteína reguladora del T3SS es HilA, cuya expresión es mediada por un número de factores ambientales importantes para la supervivencia celular, reflejando las complejas condiciones en el lumen intestinal que debe enfrentar *Salmonella* ³⁰. Se ha determinado que HilA codifica para un regulador que activa los promotores para los genes *inv* y *spa*, *sip* (*Salmonella invasion protein*) y *org* (*oxigen-regulated gene*), todos ellos reprimidos en la mutante en estudio. Dentro de los reguladores de HilA que se encontraron reprimidos en la mutante *glnA* están *hilC* y *hilD*. Los productos de estos genes son reguladores que se asocian a la RNA polimerasa para incrementar la transcripción de los genes *hila*, *orgA* y *prg*.

Destaca también la represión de reguladores transcripcionales conocidos (*invF*, *hilC*, *sprB*) e hipotéticos (*STY2996* y *STY4515*), todos ellos pertenecen a reguladores transcripcionales de la familia AraC. Distintos reguladores que pertenecen a esta familia están involucrados en el metabolismo del carbono y en respuesta a estrés ambiental, así como también en la regulación de factores de virulencia ¹⁵⁷. En *S. Typhi* se ha encontrado mutaciones en reguladores de esta familia asociado a alta resistencia a fluoroquinolonas, lo que según los autores le otorgaría ventaja en su respuesta al estrés ambiental ¹⁵⁸.

Existen datos que señalan interacciones complejas que modulan motilidad, utilización del nitrógeno, respuesta al estrés y muchas otras funciones celulares que involucran interacciones entre factores sigma tales como RpoN, FliA y RpoS ¹⁵⁹. Estos dos últimos se encontraron diferencialmente expresados en la mutante *glnA*.

El gen *glnK* forma un operón junto con el gen *amtB*. El transportador de ión amonio AmtB conduce el ión amonio a través de la membrana citoplasmática y funciona como sensor para el amonio extracelular. Esta proteína es expresada sólo si no hay o hay muy poco amonio disponible en el ambiente y es regulada por el *pool* de glutamina interna vía inhibición por retroalimentación ¹¹⁸. Ambos genes se encontraron sobreexpresados en la mutante *glnA*.

Como se mencionó anteriormente, *S. Typhimurium* aparentemente percibe la limitación de nitrógeno externa como una limitación interna de glutamina ¹²². Una consecuencia del crecimiento en condiciones limitantes de nitrógeno es la activación de los genes bajo el control de la proteína C regulatoria del nitrógeno NtrC. Los genes activados por NtrC incluyen transportador de amonio AmtB, GS, codificada por *glnA* y permeasas de aminoácidos. NtrC también activa la transcripción de los genes que codifican las proteínas regulatorias *glnL* (*ntrB*), *glnG* (*ntrC*), *glnK* y *nac*. En la mutante *glnA* se comprobó la sobreexpresión de *glnL* y *glnG*. El producto del gen *glnG* activa la transcripción de los genes dependientes de σ^{54} ¹¹⁸.

En *E. coli*, resultados previos con ensayos en microarreglos, indican que *ompF* está bajo el control del sistema de dos componentes NtrBC ¹¹³. En enterobacterias, este sistema se

encuentra corriente abajo del gen *glnA* y está involucrado en la respuesta al crecimiento en condiciones limitantes de nitrógeno ¹⁶⁰.

La delección de *glnA* incrementa la expresión de los genes *glnL* y *glnG*, 12,0 y 8,0 veces, respectivamente comparado con la cepa silvestre, indicando que *glnA* regula negativamente la expresión de *glnL* y *glnG* a través de la mantención de los niveles de glutamina. La delección de *glnA* revela una regulación positiva de NtrBC sobre la expresión de *ompF*. Esta vía de regulación podría estar detrás del mecanismo de susceptibilidad incrementada a ciprofloxacino en las mutantes nulas en *glnA*. Ensayos de susceptibilidad con la mutante *glnG* mostraron aumento de la resistencia a ciprofloxacino, mientras que la delección de *glnL* no tiene efecto en la resistencia a ciprofloxacino. Es plausible que mientras la sobreexpresión de GlnG se correlaciona con susceptibilidad, la delección produzca resistencia. Sin embargo, la correlación de la activación del sistema de dos componentes NtrBC y la expresión de *ompF*, necesita ser validado.

La escasez de nutrientes aumenta la capacidad de captura de estos al mejorar la permeabilidad de la membrana externa e inducir sistemas de transporte de alta afinidad en la membrana citoplasmática. Se encontró que hubo un cambio en la expresión de permeasas, al menos 14 genes conocidos e hipotéticos tuvieron una expresión aumentada y están involucrados en el transporte de aminoácidos y azúcares.

La regulación de mecanismos de MDR que incluyen cambios en el perfil de expresión de bombas de expulsión, porinas y expresión de genes de virulencia muestra considerable solapamiento, y se ha postulado que estos mecanismos son dependientes de la

concentración de estos reguladores y de la sensibilidad de los promotores afectados ¹⁵⁶, interacciones de circuitos genéticos que es posible visualizar en la mutante *glnA*.

Aparentemente, el fenotipo observado que lleva al aumento en el nivel de la porina OmpF, se debe a cambios de distintos sistemas más que a la alteración de un único sistema. En la presente tesis de doctorado se presenta evidencia de dos vías que podrían explicar el fenotipo encontrado.

8.4 Glutamina sintetasa como potencial blanco para aumentar la susceptibilidad a quinolonas en *S. Typhi*.

Las GS de eucariontes comparten menos del 20% de la secuencia aminoacídica con las enzimas bacterianas. Las comparaciones son difíciles porque las enzimas bacterianas son dodecaméricas a diferencia de las eucarióticas que son deca-méricas. Cuando los dominios catalíticos de las GS bacterianas y las GS eucariontes son alineadas, se ha encontrado que hay diferencias en los dominios N-terminal de la misma subunidad. Sin embargo, las arquitecturas de los sitios activos son sorprendentemente similares, y donde intervienen los inhibidores de GS utilizados ^{128,161,162}. Así, una nueva generación de inhibidores de GS está siendo exploradas para la búsqueda de inhibidores con toxicidad selectiva hacia GS procariontes ¹²⁸.

Las estrategias de combinaciones de fármacos son congruentes con el mejor entendimiento de que la mayoría de los antibióticos más exitosos parecen interactuar con más de un blanco ⁴⁵. Además, estas estrategias se alinean con la visión del resistoma y de red metabólica que poseen las bacterias para sobrevivir a la perturbación ocasionada por

un antibiótico. No obstante, esta estrategia ha recibido poca atención de la industria farmacéutica. Por otra parte, el enfoque moderno del descubrimiento basado en nuevos blancos busca abrumadoramente lograr una exquisita selectividad para minimizar la toxicidad que podría surgir de la poca selectividad de un potencial fármaco.

La búsqueda de fármacos coadyuvantes ofrece ventajas como el potencial de disminuir la concentración de antibiótico que es necesaria para alcanzar el efecto terapéutico, lo cual también por otra parte puede disminuir potenciales efectos adversos del antimicrobiano. Desde otro punto de vista, esta estrategia de combinación puede extender la vida útil de antibacterianos en uso, y debido a que el uso de estos fármacos son familiares para los clínicos, podrían minimizarse las barreras para su incorporación en la práctica clínica.

Sin embargo, la estrategia de combinación también presenta desafíos. Estos incluyen la necesidad para emparejar la farmacología y eficacia de cada componente de la combinación. La resistencia también es una preocupación, como lo es para cualquier antimicrobiano. El potencial de interacciones fármaco-fármaco inesperadas, también se debe examinar a fondo. Sin embargo, las terapias basadas en múltiples fármacos, están bien establecidas para la terapia del cáncer, VIH, tuberculosis e infecciones bacterianas con combinaciones de antibióticos β -lactámicos e inhibidores de β -lactamasas y por lo tanto, ofrecen una alternativa al descubrimiento tradicional de los antibióticos en la era de la resistencia ³⁶.

La búsqueda de estrategias que busquen aumentar la expresión de porinas es una materia que recién ha comenzado a ser explorada. Un estudio donde se utilizó una estrategia de hiperporinación de la membrana externa de *E. coli*, describió el incremento de la recaptura de antibióticos, llevando a cambios en la susceptibilidad ¹⁶³. Posteriormente, esta estrategia se expandió a otras especies Gram negativo tales como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Burkholderia spp.*, siendo bien tolerada y mostrando cambios de aumento en la susceptibilidad a distintos antimicrobianos, incluidas algunas quinolonas ¹⁶⁴.

Para finalizar, la exploración y entendimiento de las redes genéticas que lleven al aumento de la porina OmpF, podría ser una propuesta interesante para el encuentro y desarrollo de nuevos quimioterapéuticos que actúen aumentando la entrada de los antimicrobianos. Esta estrategia ofrecería ventajas para el desarrollo de fármacos coadyuvantes en el tratamiento de las enfermedades infecciosas de *S. Typhi*.

Los resultados de esta Tesis de Doctorado incrementan nuestro conocimiento acerca de cómo a través del *screening* fenotípico se puede identificar nuevos genes cuya inactivación tenga potencial de intervención farmacológica. Se caracterizó la inactivación gen *glnA* de *S. Typhi*, que lleva al aumento en la susceptibilidad a ciprofloxacino, revelando la complejidad de su regulación, e identificando parte de los mecanismos involucrados en el cambio en la susceptibilidad observada, contribuyendo así desde las Ciencias Farmacéuticas a la búsqueda y encuentro de posibles blancos farmacológicos

para el diseño futuro de fármacos que los interfieran y que potencien el efecto de los escasos antimicrobianos existentes.

9 CONCLUSIONES

Los resultados de la presente Tesis nos llevan a concluir:

- El *screening* fenotípico identificó nuevos genes cuya inactivación aumentó la susceptibilidad a antimicrobianos en *S. Typhi*, entre ellos *glnA*.
- La mutante *glnA* es más susceptible a ciprofloxacino que la cepa silvestre.
- El aumento de la susceptibilidad a ciprofloxacino en la mutante *glnA* ocurre a través del aumento de la de la porina OmpF, posiblemente mediado por la represión de MicF.
- El aumento de *ompF* puede deberse a un incremento de *glnG*, su delección aumentó la resistencia a ciprofloxacino

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Parkhill, J., Dougan, G. & James, K. D. Parkhill J, Dougan G, James KD, et al Complete genome sequence of a multiple drug resistant Salmonella enterica serovar Typhi CT18. *Nature* **413**, 848–852 (2001).
2. Tatarvarthy, A., Luna, V. A. & Amuso, P. T. How multidrug resistance in typhoid fever affects treatment options. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1323**, 76–90 (2014).
3. Deksissa, T. & Gebremedhin, E. Z. A cross-sectional study of enteric fever among febrile patients at Ambo hospital: Prevalence, risk factors, comparison of Widal test and stool culture and antimicrobials susceptibility pattern of isolates. *BMC Infect. Dis.* **19**, 288 (2019).
4. Doughari, J. H. & Nggada, H. P. *Retrospective study on the antibiotic resistant pattern of Salmonella typhi from some clinical samples. African Journal of Microbiology Research* (2007).
5. US Dept. of Health and Human Services. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. *Centers Dis. Control Prev.* 114 (2013). doi:CS239559-B
6. CDC. *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Centers for Disease Control and Prevention* (2019).
7. Su, L. H. & Chiu, C. H. Salmonella: Clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Medical Journal* **30**, 210–219 (2007).
8. Zhang, S. *et al.* Salmonella Serotype Determination Utilizing High-Throughput Genome Sequencing Data. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 1685–1692 (2015).
9. Parry, C. M., Hien, T. T., Dougan, G., White, N. J. & Farrar, J. J. Typhoid Fever. *N. Engl. J. Med.* **347**, 1770–1782 (2002).
10. Dougan, G. & Baker, S. *Salmonella enterica* Serovar Typhi and the Pathogenesis of Typhoid Fever. *Annu. Rev. Microbiol.* **68**, 317–336 (2014).
11. WHO. *The Immunological Basis for Immunization Series Salmonella enterica serovar Typhi (typhoid) vaccines.* (2011).
12. Deng, W. *et al.* Comparative genomics of Salmonella enterica serovar Typhi strains Ty2 and CT18. *J. Bacteriol.* **185**, 2330–7 (2003).
13. Holt, K. E. *et al.* Pseudogene accumulation in the evolutionary histories of Salmonella enterica serovars Paratyphi A and Typhi. *BMC Genomics* **10**, 36 (2009).
14. Baddam, R., Kumar, N., Shaik, S., Lankapalli, A. K. & Ahmed, N. Genome dynamics and evolution of Salmonella Typhi strains from the typhoid-endemic zones. *Sci. Rep.* **4**, 7457 (2014).
15. ISP. *Boletín Vigilancia de Laboratorio. Salmonella.* (2016).
16. Judd, M. C. & Mintz, E. D. Typhoid & Paratyphoid Fever - Chapter 3 - 2018 Yellow Book | Travelers' Health | CDC. (2017). Available at:

<https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/typhoid-and-paratyphoid-fever>. (Accessed: 22nd August 2019)

17. Cabello, F. Typhoid fever in Chile. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **99**, 1649–1650 (2018).
18. Karkey, A. *et al.* The Ecological Dynamics of Fecal Contamination and Salmonella Typhi and Salmonella Paratyphi A in Municipal Kathmandu Drinking Water. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004346 (2016).
19. Rodríguez-Martínez, J. M. *et al.* Plasmid-mediated quinolone resistance: Two decades on. *Drug Resist. Updat.* **29**, 13–29 (2016).
20. Harish, B., Geetha, V., Yugendran, T. & Srinivasan, R. Plasmid-mediated quinolone resistance in typhoidal Salmonellae: A preliminary report from South India. *Indian J. Med. Microbiol.* **32**, 31 (2014).
21. Hassing, R.-J. *et al.* Analysis of mechanisms involved in reduced susceptibility to ciprofloxacin in Salmonella enterica serotypes Typhi and Paratyphi A isolates from travellers to Southeast Asia. *Int. J. Antimicrob. Agents* **37**, 240–243 (2011).
22. Chiou, C.-S., Alam, M., Kuo, J.-C., Liu, Y.-Y. & Wang, P.-J. Chromosome-mediated multidrug resistance in Salmonella enterica serovar Typhi. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 721–3 (2015).
23. Kumar, M. *et al.* Structure Based In Silico Analysis of Quinolone Resistance in Clinical Isolates of Salmonella Typhi from India. *PLoS One* **10**, e0126560 (2015).
24. Park, E. The phylogeography and incidence of multi-drug resistant typhoid fever in sub-Saharan Africa. *Nat. Commun.* **9**, 1–10 (2018).
25. Frieden, T. *Antibiotic Resistance Threats in the United States. CDC Report* (2013). doi:CS239559-B
26. Public Health Agency of Canada. *Canadian Antimicrobial Resistance Surveillance System (CARSS): Update 2018*. (2018).
27. Threlfall, E. J. *et al.* Trends in antimicrobial drug resistance in Salmonella enterica serotypes Typhi and Paratyphi A isolated in Europe, 1999-2001. *Int. J. Antimicrob. Agents* **22**, 487–91 (2003).
28. Baltazar, M. *et al.* Multidrug-resistant Salmonella enterica serotype Typhi, Gulf of Guinea Region, Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 655–9 (2015).
29. Wain, J., Hendriksen, R. S., Mikoleit, M. L., Keddy, K. H. & Ochiai, R. L. Typhoid fever. *Lancet (London, England)* **385**, 1136–45 (2015).
30. Kaur, J. & Jain, S. K. Role of antigens and virulence factors of Salmonella enterica serovar Typhi in its pathogenesis. *Microbiol. Res.* **167**, 199–210 (2012).
31. Klemm, E. J. *et al.* Emergence of an Extensively Drug-Resistant Salmonella enterica Serovar Typhi Clone Harboring a Promiscuous Plasmid Encoding Resistance to Fluoroquinolones and Third-Generation Cephalosporins. *MBio* **9**, (2018).

32. Johnson, R., Mylona, E. & Frankel, G. Typhoidal Salmonella: Distinctive virulence factors and pathogenesis. *Cell. Microbiol.* **20**, (2018).
33. Jackson, N., Czaplowski, L. & Piddock, L. J. V. Discovery and development of new antibacterial drugs: learning from experience? *J. Antimicrob. Chemother.* **73**, 1452–1459 (2018).
34. Silver, L. L. Challenges of Antibacterial Discovery. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**, 71–109 (2011).
35. Ribeiro da Cunha, B. R. da, Fonseca, L. P. & Calado, C. R. C. Antibiotic Discovery: Where Have We Come from, Where Do We Go? *Antibiotics* **8**, 45 (2019).
36. Brown, E. D. & Wright, G. D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature* **529**, 336–343 (2016).
37. Ren, G. *et al.* Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *Int. J. Antimicrob. Agents* **33**, 587–590 (2009).
38. Davies, J. & Davies, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 417–433 (2010).
39. Lewis, K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 371–387 (2013).
40. Silver, L. L. The Antibiotic Future. in 31–67 (2017). doi:10.1007/7355_2017_24
41. Cottarel, G. & Wierzbowski, J. Combination drugs, an emerging option for antibacterial therapy. *Trends Biotechnol.* **25**, 547–555 (2007).
42. Breidenstein, E. B. M., Khaira, B. K., Wiegand, I., Overhage, J. & Hancock, R. E. W. Complex ciprofloxacin resistome revealed by screening a *Pseudomonas aeruginosa* mutant library for altered susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 4486–91 (2008).
43. Fajardo, A. *et al.* The Neglected Intrinsic Resistome of Bacterial Pathogens. *PLoS One* **3**, e1619 (2008).
44. Liu, A. *et al.* Antibiotic sensitivity profiles determined with an *Escherichia coli* gene knockout collection: Generating an antibiotic bar code. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 1393–1403 (2010).
45. Silver, L. L. Rational Approaches to Antibacterial Discovery: Pre-Genomic Directed and Phenotypic Screening. in *Antibiotic Discovery and Development* 33–75 (Springer US, 2012). doi:10.1007/978-1-4614-1400-1_2
46. Lewis, K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 371–387 (2013).
47. Zheng, W., Sun, W. & Simeonov, A. Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases. *Br. J. Pharmacol.* **175**, 181–191 (2018).
48. Belenky, P. *et al.* Bactericidal Antibiotics Induce Toxic Metabolic Perturbations that Lead to Cellular Damage. *Cell Rep.* **13**, 968–980 (2015).
49. Baquero, F. & Martínez, J.-L. Interventions on Metabolism: Making Antibiotic-

- Susceptible Bacteria. *MBio* **8**, (2017).
50. Lin, X., Kang, L., Li, H. & Peng, X. Fluctuation of multiple metabolic pathways is required for *Escherichia coli* in response to chlortetracycline stress. *Mol. BioSyst.* **10**, 901–908 (2014).
 51. Kotz, J. Phenotypic screening, take two. *Sci. Exch.* **5**, 380–380 (2012).
 52. White, R. J. The Early History of Antibiotic Discovery: Empiricism Ruled. in *Antibiotic Discovery and Development* 3–31 (Springer US, 2012). doi:10.1007/978-1-4614-1400-1_1
 53. Meredith, T. C., Wang, H., Beaulieu, P., Gründling, A. & Roemer, T. Harnessing the power of transposon mutagenesis for antibacterial target identification and evaluation. *Mob. Genet. Elements* **2**, 171–178 (2012).
 54. Serina, S. *et al.* Scanning the *Escherichia coli* chromosome by random transposon mutagenesis and multiple phenotypic screening. *Res. Microbiol.* **155**, 692–701 (2004).
 55. McLeod, S. M., Dougherty, T. J. & Pucci, M. J. Novel antibacterial targets/identification of new targets by comparative genomics. in *Antibiotic Discovery and Development* **9781461414**, 881–900 (Springer US, 2012).
 56. Hu, Y. & Coates, A. R. M. Transposon mutagenesis identifies genes which control antimicrobial drug tolerance in stationary-phase *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **243**, 117–124 (2005).
 57. Payne, D. J., Gwynn, M. N., Holmes, D. J. & Pompliano, D. L. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 29–40 (2007).
 58. Cottarel, G. & Wierzbowski, J. Combination drugs, an emerging option for antibacterial therapy. *Trends Biotechnol.* **25**, 547–555 (2007).
 59. Armbruster, C. E. *et al.* Genome-wide transposon mutagenesis of *Proteus mirabilis*: Essential genes, fitness factors for catheter-associated urinary tract infection, and the impact of polymicrobial infection on fitness requirements. *PLoS Pathog.* **13**, (2017).
 60. Goryshin, I. Y., Jendrisak, J., Hoffman, L. M., Meis, R. & Reznikoff, W. S. Insertional transposon mutagenesis by electroporation of released Tn5 transposition complexes. *Nat. Biotechnol.* **18**, 97–100 (2000).
 61. Kirby, J. R. In Vivo Mutagenesis Using EZ-Tn5TM. in 17–21 (2007). doi:10.1016/S0076-6879(06)21003-6
 62. Barquist, L., Boinett, C. J. & Cain, A. K. Approaches to querying bacterial genomes with transposon-insertion sequencing. *RNA Biol.* **10**, 1161–1169 (2013).
 63. Langridge, G. C. *et al.* Simultaneous assay of every *Salmonella* Typhi gene using one million transposon mutants. *Genome Res.* **19**, 2308–16 (2009).
 64. Saroj, S. D., Clemmer, K. M., Bonomo, R. A. & Rather, P. N. Novel mechanism for fluoroquinolone resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*

- 56**, 4955–7 (2012).
65. Xu, J. *et al.* The *pqqC* gene is essential for antifungal activity of *Pseudomonas kilonensis* JX22 against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *FEMS Microbiol. Lett.* **353**, 98–105 (2014).
 66. Niu, X.-N. *et al.* Complete sequence and detailed analysis of the first indigenous plasmid from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *BMC Microbiol.* **15**, 233 (2015).
 67. Mandal, R. K. & Kwon, Y. M. Global screening of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genes for desiccation survival. *Front. Microbiol.* (2017). doi:10.3389/fmicb.2017.01723
 68. Goryshin, I. Y. & Reznikoff, W. S. Tn 5 *in Vitro* Transposition. *J. Biol. Chem.* **273**, 7367–7374 (1998).
 69. Valenzuela, C. *et al.* Draft Genome Sequence of *Salmonella enterica* Serovar Typhi Strain STH2370. *Genome Announc.* **2**, (2014).
 70. Green, M. R. (Michael R., Sambrook, J. & Sambrook, J. *Molecular cloning : a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012).
 71. Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 6640–5 (2000).
 72. CLSI. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard*. CLSI (2012). doi:M02-A11
 73. Andrews, J. M. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 8). *J. Antimicrob. Chemother.* (2009). doi:10.1093/jac/dkp244
 74. Hudzicki, J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol Author Information. *Am. Soc. Microbiol.* 1–13 (2012).
 75. CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard- Ninth Edition* **32**, (2012).
 76. Andrews, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**, 5–16 (2001).
 77. Wiegand, I., Hilpert, K. & Hancock, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* **3**, 163–175 (2008).
 78. Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O. & Balaban, N. Q. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 320–330 (2016).
 79. Jepson, A. K., Schwarz-Linek, J., Ryan, L., Ryadnov, M. G. & Poon, W. C. K. What Is the ‘Minimum Inhibitory Concentration’ (MIC) of Pexiganan Acting on *Escherichia*

- coli?—A Cautionary Case Study. in 33–48 (2016). doi:10.1007/978-3-319-32189-9_4
80. Maloy, S. Experimental techniques in bacterial genetics. (1990).
 81. Thierauf, A., Perez, G. & Maloy, and S. Generalized Transduction. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **501**, 267–286 (Methods Mol Biol, 2009).
 82. Lobos, S. R. & Mora, G. C. Alteration in the electrophoretic mobility of OmpC due to variations in the ammonium persulfate concentration in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* **12**, 448–450 (1991).
 83. Neuhoff, V., Stamm, R. & Eibl, H. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis* **6**, 427–448 (1985).
 84. Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. & Ehrhardt, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255–262 (1988).
 85. Gallo-Oller, G., Ordoñez, R. & Dotor, J. A new background subtraction method for Western blot densitometry band quantification through image analysis software. *Journal of Immunological Methods* **457**, 1–5 (2018).
 86. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, 45e – 45 (2001).
 87. Dahiya, S. *et al.* Multiple locus sequence typing of Salmonella Typhi, isolated in north India - a preliminary study. *Indian J. Med. Res.* **137**, 957–62 (2013).
 88. Kidgell, C. *et al.* Salmonella typhi, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Infect. Genet. Evol.* **2**, 39–45 (2002).
 89. Fazlara, A., Ekhtelat, M. & Chamran, S. The Disinfectant Effects of Benzalkonium Chloride on Some Important Foodborne Pathogens. (2012).
 90. Rowe, R., Sheskey, P. & Quinn, M. *Handbook-of-Pharmaceutical-Excipients 6th Edition.* (Pharmaceutical Press, 2009).
 91. Baidamshina, D. R. *et al.* Targeting microbial biofilms using Ficin, a nonspecific plant protease. *Sci. Rep.* **7**, 46068 (2017).
 92. Ebrahimi, A., Arvaneh, Z., Mahzounieh, M. & Lotfalian, S. Antibiotic Resistance Induction by Benzalkonium Chloride Exposure in Nosocomial Pathogens. *Int. J. Infect.* **4**, (2016).
 93. Zhu, L., Elguindi, J., Rensing, C. & Ravishankar, S. Antimicrobial activity of different copper alloy surfaces against copper resistant and sensitive Salmonella enterica. *Food Microbiol.* **30**, 303–310 (2012).
 94. CLSI. *M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement.* (2015).

95. Yethon, J. A., Vinogradov, E., Perry, M. B. & Whitfield, C. Mutation of the lipopolysaccharide core glycosyltransferase encoded by *waaG* destabilizes the outer membrane of *Escherichia coli* by interfering with core phosphorylation. *J. Bacteriol.* **182**, 5620–3 (2000).
96. Linkevicius, M., Sandegren, L. & Andersson, D. I. Mechanisms and fitness costs of tigecycline resistance in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 2809–2819 (2013).
97. Blair, J. M. A. *et al.* AcrB drug-binding pocket substitution confers clinically relevant resistance and altered substrate specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 3511–3516 (2015).
98. Chung, T. W., Jin, U. H. & Kim, C. H. *Salmonella typhimurium* LPS confers its resistance to antibacterial agents of baicalin of *Scutellaria baicalensis* George and novobiocin: Complementation of the *rfaE* gene required for ADP-L-glycero-D-mannoheptose biosynthesis of lipopolysaccharide. *J. Microbiol. Biotechnol.* (2003).
99. Gagarinova, A. & Emili, A. Genome-scale genetic manipulation methods for exploring bacterial molecular biology. *Mol. Biosyst.* **8**, 1626 (2012).
100. Baker, S. J. Molecular characterisation of *Salmonella typhi* PhoP/Q regulated genes / by Sarah Jane Baker. (2000).
101. Ferreira, M. & Gameiro, P. The journal of membrane biology. *J. Membr. Biol.* **248**, 125–136 (2015).
102. Sousa, C. F. *et al.* The binding of free and copper-complexed fluoroquinolones to OmpF porins: an experimental and molecular docking study. *RSC Adv.* **7**, 10009–10019 (2017).
103. Hidalgo, A. A., Villagra, N. A., Jerez, S. A., Fuentes, J. A. & Mora, G. C. A conditionally lethal mutant of *Salmonella Typhimurium* induces a protective response in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **470**, 313–318 (2016).
104. Carroll, P., Muttucumaru, D. G. N. & Parish, T. Use of a Tetracycline-Inducible System for Conditional Expression in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3077–3084 (2005).
105. Chopra, I. & Roberts, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 232–260 (2001).
106. Bochner, B. R., Huang, H. C., Schieven, G. L. & Ames, B. N. Positive selection for loss of tetracycline resistance. *J. Bacteriol.* **143**, 926–33 (1980).
107. Morillon, A. Non-coding RNA, Its History and Discovery Timeline. in *Long Non-coding RNA* 1–24 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/b978-1-78548-265-6.50001-0
108. Oropeza, R. & Calva, E. The cysteine 354 and 277 residues of *Salmonella enterica* serovar Typhi EnvZ are determinants of autophosphorylation and OmpR phosphorylation. *FEMS Microbiol. Lett.* (2009). doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01502.x
109. Malickbasha, M., Arunachalam, R., Senthilkumar, B., Rajasekarapandian, M. & Annadurai, G. Effect of *ompR* gene mutation in expression of *ompC* and *ompF* of

- Salmonella typhi*. *Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci.* **2**, 157–162 (2010).
110. Piddock, L. J. V. Understanding the basis of antibiotic resistance: a platform for drug discovery. *Microbiology* **160**, 2366–2373 (2014).
 111. Fàbrega, A., Ballesté-Delpierre, C. & Vila, J. Differential impact of *ramRA* mutations on both *ramA* transcription and decreased antimicrobial susceptibility in *Salmonella* Typhimurium. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, 617–624 (2016).
 112. Baugh, S. & Piddock, S. Salmonella Efflux Pumps. in *Microbial Efflux Pumps: Current Research* (eds. Yu, E., Zhang, Q. & Brown, M.) 259 (Caister Academic Press, 2013).
 113. Zimmer, D. P. *et al.* Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: Scavenging as a defense against nitrogen limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 14674–14679 (2000).
 114. Wong, Y.-C. *et al.* Candidate Essential Genes in *Burkholderia cenocepacia* J2315 Identified by Genome-Wide TraDIS. *Front. Microbiol.* **7**, 1288 (2016).
 115. Santiviago, C. A. *et al.* Analysis of Pools of Targeted *Salmonella* Deletion Mutants Identifies Novel Genes Affecting Fitness during Competitive Infection in Mice. *PLoS Pathog.* **5**, e1000477 (2009).
 116. Turnbull, A. L. & Surette, M. G. L-Cysteine is required for induced antibiotic resistance in actively swarming *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology* **154**, 3410–3419 (2008).
 117. González-Soltero, R., García-Cañas, A., Mohedano, R. B., Mendoza-Chamizo, B. & Botello, E. El papel de la reparación de roturas de doble cadena de ADN en *Escherichia coli*: Discovery Service para SiBUACH Universidad Austral de Chile. *Rev. Española Quimioter.* **28**, 139–144 (2015).
 118. van Heeswijk, W. C., Westerhoff, H. V. & Boogerd, F. C. Nitrogen Assimilation in *Escherichia coli*: Putting Molecular Data into a Systems Perspective. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **77**, 628–695 (2013).
 119. Obergfell, K. P., Schaub, R. E., Priniski, L. L., Dillard, J. P. & Seifert, H. S. The low-molecular-mass, penicillin-binding proteins DacB and DacC combine to modify peptidoglycan cross-linking and allow stable Type IV pilus expression in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol. Microbiol.* **109**, 135–149 (2018).
 120. Berlicki, L. Inhibitors of Glutamine Synthetase and their Potential Application in Medicine. *Mini-Reviews Med. Chem.* **8**, 869–878 (2008).
 121. Lobritz, M. A. *et al.* Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 8173–8180 (2015).
 122. Ikeda, T. P., Shauger, A. E. & Kustu, S. *Salmonella typhimurium* apparently perceives external nitrogen limitation as internal glutamine limitation. *J. Mol. Biol.* **259**, 589–607 (1996).
 123. Switzer, A., Brown, D. R. & Wigneshweraraj, S. New insights into the adaptive transcriptional response to nitrogen starvation in *Escherichia coli*. *Biochem. Soc. Trans.*

- 46**, 1721–1728 (2018).
124. Martinez, J. L. & Baquero, F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1771–7 (2000).
 125. Bhargava, P. & Collins, J. J. Boosting bacterial metabolism to combat antibiotic resistance. *Cell Metab.* **21**, 154–155 (2015).
 126. Ryan, E. T. *et al.* Development of a DeltaglnA balanced lethal plasmid system for expression of heterologous antigens by attenuated vaccine vector strains of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* **68**, 221–6 (2000).
 127. Harth, G. & Horwitz, M. A. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase as a novel antibiotic strategy against tuberculosis: Demonstration of efficacy in vivo. *Infect. Immun.* **71**, 456–464 (2003).
 128. Moreira, C., Ramos, M. & Fernandes, P. Glutamine Synthetase Drugability beyond Its Active Site: Exploring Oligomerization Interfaces and Pockets. *Molecules* **21**, 1028 (2016).
 129. Gustafson, J., Strassle, A., Hachler, H., Kayser, F. H. & Berger-Bachi, B. The femC locus of *Staphylococcus aureus* required for methicillin resistance includes the glutamine synthetase operon. *J. Bacteriol.* **176**, 1460–1467 (1994).
 130. Lima, T. B. *et al.* Bacterial resistance mechanism: what proteomics can elucidate. *FASEB J.* **27**, 1291–1303 (2013).
 131. El Khoury, J. Y., Boucher, N., Bergeron, M. G., Leprohon, P. & Ouellette, M. Penicillin induces alterations in glutamine metabolism in *Streptococcus pneumoniae*. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
 132. Cui, W.-Q. *et al.* Discovery of Potential Anti-infective Therapy Targeting Glutamine Synthetase in *Staphylococcus xylosum*. *Front. Chem.* **7**, (2019).
 133. Madhuranayaki, T. & Krishnaswamy, S. Protein engineering of yellow fluorescent protein insertion in outer membrane protein OmpF from *Salmonella typhi*. *ISABB J. Biotechnol. Bioinforma.* **1**, 10–14 (2011).
 134. Toro, C. S., Lobos, S. R., Calderon, I., Rodriguez, M. & Mora, G. C. Clinical isolate of a porinless *Salmonella typhi* resistant to high levels of chloramphenicol. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 1715–1719 (1990).
 135. Kishii, R. & Takei, M. Relationship between the expression of ompF and quinolone resistance in *Escherichia coli*. *J. Infect. Chemother.* **15**, 361–366 (2009).
 136. Karczmarczyk, M., Martins, M., Quinn, T., Leonard, N. & Fanning, S. Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Food-Producing Animals. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 7113–7120 (2011).
 137. Aldred, K. J., Kerns, R. J. & Osheroff, N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* **53**, 1565–74 (2014).
 138. Li, X.-Z., Plésiat, P. & Nikaido, H. The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic

- Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **28**, 337–418 (2015).
139. Vidovic, S., An, R. & Rendahl, A. Molecular and Physiological Characterization of Fluoroquinolone-Highly Resistant Salmonella Enteritidis Strains. *Front. Microbiol.* **10**, 729 (2019).
 140. Rushdy, A. A. *et al.* Contribution of different mechanisms to the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of Salmonella enterica. *Brazilian J. Infect. Dis.* **17**, 431–437 (2013).
 141. Ballesté-Delpierre, C. *et al.* Attenuation of in vitro host-pathogen interactions in quinolone-resistant Salmonella typhi mutants. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, 111–122 (2016).
 142. Xie, X. *et al.* RpoE is a Putative Antibiotic Resistance Regulator of Salmonella enteric Serovar Typhi. *Curr. Microbiol.* **72**, 457–464 (2016).
 143. Wolter, D. J., Black, J. A., Lister, P. D. & Hanson, N. D. Multiple genotypic changes in hypersusceptible strains of Pseudomonas aeruginosa isolated from cystic fibrosis patients do not always correlate with the phenotype. *J. Antimicrob. Chemother.* **64**, 294–300 (2009).
 144. Webber, M. A. *et al.* Quinolone-resistant gyrase mutants demonstrate decreased susceptibility to triclosan. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 2755–2763 (2017).
 145. Nikaido, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 593–656 (2003).
 146. Ferenci, T. & Liu, X. An analysis of multifactorial influences on the transcriptional control of ompF and ompC porin expression under nutrient limitation. *Microbiology* **147**, 2981–2989 (2001).
 147. Liu, X. & Ferenci, T. Regulation of porin-mediated outer membrane permeability by nutrient limitation in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **180**, 3917–22 (1998).
 148. Walawalkar, Y. D. & Nayak, V. Role of Bile in Regulating Small RNAs in Salmonella typhi A Factor for Chronic Infection within Gallbladder? *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* **4**, 183–197 (2015).
 149. Kim, T., Bak, G., Lee, J. & Kim, K. sun. Systematic analysis of the role of bacterial Hfq-interacting sRNAs in the response to antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **70**, 1659–1668 (2014).
 150. Martínez-Flores, I., Cano, R., Bustamante, V. H., Calva, E. & Puente, J. L. The ompB operon partially determines differential expression of OmpC in Salmonella typhi and Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **181**, 556–62 (1999).
 151. Feng, X., Oropeza, R., Walthers, D. & Kenney, L. J. OmpR Phosphorylation and Its Role in Signaling and Pathogenesis This two-component system response regulator modulates multiple systems, including virulence factors and fimbriae. *ASM News* **69**, 390–395 (2003).
 152. Pickard, D. *et al.* Characterization of defined ompR mutants of Salmonella typhi: ompR

- is involved in the regulation of Vi polysaccharide expression. *Infect. Immun.* **62**, 3984–93 (1994).
153. Senthilkumar, B., Anbarasu, K., Senbagam, D. & Rajasekarapandian, M. Induction of deletion mutation on ompR gene of Salmonella enterica serovar Typhi isolates from asymptomatic typhoid carriers to evolve attenuated strains for vaccine development. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **7**, 933–939 (2014).
 154. Villagra, N. A., Hidalgo, A. A., Santiviago, C. A., Saavedra, C. P. & Mora, G. C. SmvA, and not AcrB, is the major efflux pump for acriflavine and related compounds in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**, 1273–1276 (2008).
 155. Ruiz, C. & Levy, S. B. Many Chromosomal Genes Modulate MarA-Mediated Multidrug Resistance in Escherichia coli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 2125–2134 (2010).
 156. Bailey, A. M. *et al.* RamA, a member of the AraC/XylS family, influences both virulence and efflux in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* **192**, 1607–16 (2010).
 157. Egan, S. M. Growing Repertoire of AraC/XylS Activators. *J. Bacteriol.* **184**, 5529–5532 (2002).
 158. Matono, T. *et al.* Emergence of Resistance Mutations in Salmonella enterica Serovar Typhi Against Fluoroquinolones. *Open forum Infect. Dis.* **4**, ofx230 (2017).
 159. Dong, T., Yu, R. & Schellhorn, H. Antagonistic regulation of motility and transcriptome expression by RpoN and RpoS in Escherichia coli. *Mol. Microbiol.* **79**, 375–386 (2011).
 160. Bhagirath, A. Y. *et al.* Two component regulatory systems and antibiotic resistance in gram-negative pathogens. *International Journal of Molecular Sciences* (2019). doi:10.3390/ijms20071781
 161. Eisenberg, D., Gill, H. S., Pfluegl, G. M. & Rotstein, S. H. Structure-function relationships of glutamine synthetases. *Biochim. Biophys. Acta* **1477**, 122–45 (2000).
 162. Krajewski, W. W. *et al.* Crystal Structures of Mammalian Glutamine Synthetases Illustrate Substrate-Induced Conformational Changes and Provide Opportunities for Drug and Herbicide Design. *J. Mol. Biol.* **375**, 217–228 (2008).
 163. Krishnamoorthy, G. *et al.* Breaking the permeability barrier of Escherichia coli by controlled Hyperporination of the outer membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 7372–7381 (2016).
 164. Krishnamoorthy, G. *et al.* Synergy between Active Efflux and Outer Membrane Diffusion Defines Rules of Antibiotic Permeation into Gram-Negative Bacteria. *MBio* **8**, (2017).

11. ANEXOS

Anexo 1. Valores de eficiencia de reacción de RT-qPCR de los partidores basada en la pendiente de una curva estándar.

Gen	Pendiente (m)	Factor de amplificación	Eficiencia $10^{(-1/m)}-1$
<i>acrB</i>	-3,4179	1,96	96,16
<i>dnaN</i>	-3,1228	2	109,4
<i>envZ</i>	-3,3895	1,97	97,26
<i>fis</i>	-3,3509	1,99	98,8
<i>glnG</i>	-3,2867	2,01	101,49
<i>glnL</i>	-3,3336	2	100
<i>lon</i>	-3,3569	1,99	98,56
<i>marA</i>	-3,539	1,92	91,68
<i>ompC</i>	-3,2875	2,01	101,46
<i>ompF</i>	-3,2342	2	103,8
<i>ompR</i>	-3,2925	2,01	101,25
<i>tolC</i>	-3,5391	1,92	91,67

Anexo 2. Valores transcripcionales de genes reprimidos en la mutante *glnA* comparada a la cepa WT STH2370. El cambio de veces indica la razón entre los niveles de expresión en STH2370 y *glnA*.

Locus	Gen	Descripción funcional	RNA Seq Cambio de veces <i>glnA</i> /2370
AA09_04930	<i>fliC</i>	Flagelina	-597,21
AA09_06890	<i>flgE</i>	Proteína del gancho flagelar FlgE	-134,72
AA09_22550	<i>sopE</i>	Proteína de secreción tipo III SopE	-191,39
AA09_04920	<i>fliA</i>	Factor sigma de biosíntesis flagelar	-185,73
AA09_06885	<i>flgD</i>	Proteína FlgD de formación del gancho flagelar	-131,82
AA09_19710	<i>invA</i>	Proteína del T3SS InvA	-47,50
AA09_19585	<i>prgJ</i>	Proteína PrgJ del complejo aguja del T3SS	-50,50
AA09_06455	<i>sopB</i>	Inositol fosfato fosfatasa SopB	-84,26
AA09_06895	<i>flgF</i>	Proteína FlgF parte del cuerpo basal flagelar	-80,88
AA09_19725	<i>invF</i>	Regulador transcripcional invF	-86,21
AA09_06900	<i>flgG</i>	Proteína FlgG del cuerpo basal flagelar	-80,06
AA09_19720	<i>invG</i>	Proteína InvG	-88,22
AA09_10045	<i>fliF</i>	Proteína FliF del anillo MS flagelar	-95,84
AA09_19715	<i>invE</i>	Proteína InvE del T3SS	-75,13
AA09_19580	<i>prgK</i>	Proteína PrgK	-32,04
AA09_19555	<i>sprB</i>	Regulador transcripcional SprB	-64,40
AA09_19595	<i>prgH</i>	Proteína PrgH del complejo aguja del T3SS	-56,08
AA09_04935	<i>fliD</i>	Proteína FliD asociada al gancho flagelar	-59,09
AA09_09950	<i>glnA</i>	Glutamina sintetasa	-298,73
AA09_19690	<i>spaN</i>	Proteína SpaN de presentación de antígeno	-27,55
AA09_10050	<i>fliG</i>	Proteína FliG de cambio de giro del motor flagelar	-39,29
AA09_19590	<i>prgI</i>	Proteína PrgI del complejo aguja del T3SS	-51,17
AA09_19700	<i>spaI</i>	ATP sintasa SpaL	-31,31
AA09_04915	<i>fliZ</i>	Proteína FliZ regulador de biosíntesis flagelar	-124,55
AA09_10070	<i>fliK</i>	Proteína FliK del gancho flagelar	-31,48
AA09_06875	<i>flgB</i>	Proteína FlgB de biosíntesis flagelar	-104,93
AA09_06880	<i>flgC</i>	Proteína FlgC del cuerpo basal flagelar	-126,38
AA09_10055	<i>fliH</i>	Proteína H de ensamble flagelar	-42,36
AA09_06905	<i>flgH</i>	Proteína FlgH del anillo L del cuerpo basal flagelar	-52,51
AA09_19705	<i>spaK</i>	Chaperona SpaK del T3SS	-34,32
AA09_19685	<i>spaO</i>	Proteína SpaO del T3SS	-25,76
AA09_10080	<i>fliM</i>	Proteína FliM de cambio de giro del motor flagelar	-28,13
AA09_04725	<i>cheZ</i>	Proteína CheZ de quimiotaxis	-23,78
AA09_19605	<i>iagA</i>	Regulador de proteína de invasión IagA o HilA.	-49,67
AA09_10060	<i>fliL</i>	ATP sintasa	-39,90
AA09_19695	<i>spaM</i>	Proteína SpaM del T3SS	-45,87
AA09_06920	<i>flgK</i>	Proteína FlgK asociada al gancho flagelar	-40,99
AA09_04735	<i>cheB</i>	Proteína CheB de quimiotaxis	-50,29
AA09_04745	<i>tar</i>	Proteína metilaceptora de quimiotaxis	-74,04

AA09_04730	<i>cheY</i>	Proteína CheY de quimiotaxis	-29,16
AA09_06450	<i>sigE</i>	Chaperona SigE del T3SS	-50,77
AA09_19655	<i>sipB</i>	Proteína efectora SipB SPI-1	-14,99
AA09_04740	<i>cheR</i>	Proteína CheR de quimiotaxis	-26,11
AA09_04945	<i>fliT</i>	Proteína FliT de biosíntesis flagelar	-30,44
AA09_19660	<i>sicA</i>	Chaperona SicA	-18,33
AA09_06910	<i>flgI</i>	Proteína FlgI del anillo P del cuerpo basal flagelar	-25,10
AA09_04760	<i>cheA</i>	Proteína CheA de quimiotaxis	-24,91
AA09_22120	<i>STY4515</i>	Familia del regulador transcripcional AraC	-71,08
AA09_19575	<i>orgAa</i>	Proteína OrgA de invasión	-15,61
AA09_04940	<i>fliS</i>	Proteína FliS de biosíntesis flagelar	-45,51
AA09_06915	<i>flgJ</i>	Proteína FlgJ de ensamble flagelar	-30,15
AA09_19560	<i>sprA</i> o <i>hilC</i> o <i>sirC</i>	Regulador transcripcional de la familia AraC	-25,60
AA09_10065	<i>fliJ</i>	Chaperona de biosíntesis flagelar	-47,74
AA09_19680	<i>spaP</i>	Proteína del T3SS	-21,66
AA09_10075	<i>fliL</i>	Proteína FliL del cuerpo basal flagelar	-22,20
AA09_04715	<i>flhA</i>	Proteína FlhA de biosíntesis flagelar	-17,47
AA09_17960	<i>STY3309</i>	Proteína hipotética de quimiotaxis	-38,71
AA09_18370	<i>cheM</i>	Proteína CheM de quimiotaxis	-29,10
AA09_10085	<i>fliN</i>	flagellar motor switch protein FliN	-58,00
AA09_19610	<i>iagB</i>	Proteína IagB de invasión	-32,68
AA09_10090	<i>fliO</i>	Proteína FliO de biosíntesis flagelar	-25,37
AA09_01045	<i>yhjH</i>	Fosfodiesterasa di-GMP cíclico	-38,00
AA09_05910	<i>srfB</i>	Factor de virulencia SrfB	-16,52
AA09_21700	<i>lamB</i>	Maltoporina	-14,97
AA09_05915	<i>srfA</i>	ssrAB activated protein	-20,18
AA09_04755	<i>cheW</i>	Proteína CheW de quimiotaxis. Homóloga a CheW de <i>S. Typhimurium</i>	-24,49
AA09_19600	<i>STY2996</i>	Regulador transcripcional de la familia AraC	-13,92
AA09_18375	<i>aer</i> o <i>air</i>	Receptor aerotaxis	-13,56
AA09_17560	<i>STY1893</i>	Proteína hipotética	-29,87
AA09_06870	<i>flgA</i>	Proteína FlgA del anillo P del cuerpo basal flagelar	-19,23
AA09_10095	<i>flip</i>	Proteína Flip de biosíntesis flagelar	-13,93
AA09_19650	<i>sipC</i>	Proteína SipC efectora de la SPI-1	-12,77
AA09_19645	<i>sipD</i>	Proteína SipD de invasión celular	-11,19
AA09_04765	<i>motB</i>	Proteína MotB del motor flagelar	-20,50
AA09_06925	<i>flgL</i>	Proteína FlgL asociada al gancho flagelar	-14,94
AA09_04720	<i>flhB</i>	Proteína FlhB de biosíntesis flagelar	-19,02
AA09_10040	<i>fliE</i>	Proteína FliE del cuerpo basal flagelar	-40,98
AA09_06440	<i>pipB</i>	Proteína PipB efectora	-25,01
AA09_04770	<i>motA</i>	Proteína MotA del motor flagelar	-16,64
AA09_19665	<i>spaS</i>	Proteína SpaS del T3SS	-13,65
AA09_19670	<i>spaR</i>	Proteína SpaR del T3SS	-14,93
AA09_21705	<i>malM</i>	Proteína MalM operón maltosa	-8,27
AA09_01235	<i>STY4234</i>	Proteína aceptora de metilo de quimiotaxis	-10,75
AA09_19730	<i>invH</i>	Proteína de invasión	-12,62
AA09_08845	<i>STY2545</i>	Proteína CheV de quimiotaxis	-13,51

AA09_21500	<i>STY1783</i>	Proteína de membrana externa hipotética	-7,64
AA09_21685	<i>malF</i>	Proteína-malF de membrana transportador maltosa	-6,46
AA09_04815	<i>STY2142</i>	lipoproteína hipotética	-18,78
AA09_21690	<i>malE</i>	Proteína de unión a sustrato del transportador ABC de azúcar	-7,30
AA09_04710	<i>flhE</i>	Proteína FlhE del flagelo	-18,58
AA09_18050	<i>STY3329</i>	Proteína hipotética	-7,49
AA09_20080	<i>ygcZ</i>	Transportador de glucarato	-7,17
AA09_18545	<i>garD</i>	Galactarato dehidrogenasa	-9,05
AA09_06445	<i>Sin anotación</i>	Proteína hipotética de membrana interna. Similar a STM14_1235	-29,83
AA09_19640	<i>sipA</i>	Proteína SipA efectora de la SPI- 1	-6,26
AA09_06865	<i>flgM</i>	Factor anti-sigma 28 FlgM	-18,72
AA09_05905	<i>srfC</i>	Proteína SrfC efector de virulencia	-5,43
AA09_19675	<i>spaQ</i>	Proteína SpaQ del T3SS	-17,06
AA09_06735	<i>STY1183</i>	Proteína hipotética	-17,87
AA09_18045	<i>STY3328</i>	Proteína hipotética	-7,57
AA09_18040	<i>Sin anotación</i>	RNA helicasa hipotética. Similar a STM14_3820 que codifica para una proteína tipo helicasa de RNA dependiente de ATP	-9,35
AA09_06860	<i>flgN</i>	Chaperona FlgN de la síntesis del flagelo	-11,00
AA09_10035	<i>STY2175</i>	Proteína hipotética ribosomal 50S	-23,44
AA09_18535	<i>garR</i>	Tartronato semialdehído reductasa	-8,30
AA09_18530	<i>gutD</i>	Glicerato kinasa	-7,12
AA09_21695	<i>ugpC</i>	Proteína de unión a ATP del transportador ABC glicerol-3-fosfato	-9,29
AA09_19390	<i>srlA</i>	Subunidad IIC del transportador de sorbitol PTS	-9,05
AA09_18540	<i>garL</i>	Alfa-dehidro-beta-deoxi-D-glucarato aldolasa	-7,32
AA09_19405	<i>STY2956</i>	Sorbitol-6-fosfato dehidrogenasa	-7,91
AA09_19635	<i>iacP</i>	Proteína acil transportadora	-10,83
AA09_19625	<i>sicP</i>	Chaperona SicP	-9,11
AA09_22115	<i>STY4514</i>	Proteína hipotética de la familia regulatoria GerE	-14,40
AA09_00615	<i>STY4099</i>	Racemasa hipotética MdlA	-8,16
AA09_19395	<i>srlE</i>	Subunidad IIB del transportador de sorbitol PTS	-6,62
AA09_19400	<i>srlB</i>	Subunidad IIA del transportador de sorbitol PTS	-8,61
AA09_19630	<i>STY3003</i>	Proteína hipotética	-7,14
AA09_20075	<i>ygcY</i>	Glucarato deshidratasa 2 probable	-5,01
AA09_13320	<i>asnA</i>	Asparagina sintetasa AsnA	-5,83
AA09_06655	<i>STY1168</i>	Proteína hipotética de membrana	-7,61
AA09_04890	<i>sdiA</i>	Regulador transcripcional SdiA de la división celular	-4,70
AA09_18980	<i>nanA</i>	N-acetylneuraminato liasa	-4,55
AA09_20070	<i>ygcX</i>	Glucarato deshidratasa 1 probable	-4,52
AA09_22035	<i>adiY</i>	Regulador transcripcional de la familia AraC hipotético	-3,97
AA09_23495	<i>STY1076</i>	Proteína hipotética efectora del T3SS	-3,48
AA09_10100	<i>fliQ</i>	Proteína FliQ de biosíntesis flagelar	-4,31
AA09_06650	<i>STY1167</i>	Ácido N-acetylneuramínico mutarotasa hipotética. Ortóloga de <i>Yjht</i> de <i>E. coli</i>	-5,67
AA09_04705	<i>STY2120</i>	Familia glicosil hidrolasa 88 hipotética	-3,81
AA09_06665	<i>STY1170</i>	Oxidoreductasa hipotética	-6,65
AA09_14830	<i>STY1814</i>	Proteína hipotética	-5,13

AA09_19565	<i>STY2989</i>	Proteína OrgC efectora del T3SS	-3,04
AA09_06660	<i>STY1169</i>	Transportador ácido siálico hipotética	-4,82
AA09_03865	<i>yaeG</i>	Regulador transcripcional de la familia CdaR hipotético	-3,28
AA09_15520	<i>pyrB</i>	Subunidad catalítica aspartato carbamoiltransferasa	-3,28
AA09_19570	<i>orgaB</i>	Proteína OrgB de invasión	-2,76
AA09_17955	<i>uxaC</i>	Glucuronato isomerasa	-2,80
AA09_10180	<i>cspB</i>	Proteína de shock frío	-4,90
AA09_10105	<i>fliR</i>	Proteína FliR biosíntesis flagelar	-4,07
AA09_00860	<i>cspA</i>	Proteína de shock de frío	-4,23
AA09_14825	<i>STY1813</i>	Nucleósido trifosfato pirofosfohidrolasa	-3,81
AA09_19550	<i>sitD</i>	Proteína SitD de membrana interna	-3,12
AA09_21680	<i>malG</i>	Permeasa del transportador de maltosa	-2,81
AA09_01080	<i>STY4199</i>	Proteína hipotética de membrana	-3,99
AA09_06935	<i>tnpA</i>	Transposasa IS200	-3,53
AA09_16995	<i>tnpA</i>	Transposasa IS200	-3,53
AA09_11510	<i>STY4630</i>	Proteína hipotética	-2,44
AA09_12720	<i>STY3677</i>	Proteína principal de la cápside	-4,03
AA09_00440	<i>pyrE</i>	Orotato fosforibosiltransferasa	-2,83
AA09_15955	<i>cstA</i>	Proteína CstA de hambruna al carbón	-3,09
AA09_02840	<i>modB</i>	Permeasa transportador ABC molibdato	-2,65
AA09_22105	<i>STY4511</i>	Proteína hipotética de membrana	-3,38
AA09_11755	<i>int</i>	Integrasa	-3,18
AA09_11610	<i>yjhP</i>	Proteína hipotética	-2,41
AA09_20065	<i>STY3097</i>	Glicerato kinasa	-2,68
AA09_11630	<i>vexB</i>	Proteína de membrana interna VexB exportadora polisacárido Vi	-2,22
AA09_01135	<i>STY4211</i>	Transportador MFS hipotético	-2,45
AA09_02390	<i>nagE</i>	Subunidad II del transportador ABC de N-acetilglucosamina	-2,16
AA09_02845	<i>modC</i>	Proteína de unión a ATP del transportador ABC de molibdato	-2,53
AA09_07255	<i>rpmE2</i>	Proteína hipotética ribosomal 50S L31	-5,05
AA09_19615	<i>stpA</i>	Tirosina fosfatasa	-3,17
AA09_22110	<i>STY4512</i>	Proteína hipotética	-5,61
AA09_13980	<i>gcvH</i>	Proteína H del sistema de clivaje de glicina	-2,03
AA09_11505	<i>STY4629</i>	Proteína hipotética	
AA09_18365	<i>STY3393</i>	Regulador transcripcional de la familia PadR hipotético. Ortólogo de YQJI de <i>E.coli</i>	-2,56
AA09_18975	<i>nanT</i>	Transportador de ácido siálico hipotético	-2,62
AA09_02835	<i>modA</i>	Proteína de unión de sustrato transportador ABC de molibdeno	-2,53
AA09_06180	<i>hyaD2</i>	Proteasas de maduración de hidrogenasa 1	-2,98
AA09_02400	<i>ybkM</i>	Chitoporina hipotética	-2,37
AA09_21575	<i>aceA</i>	Isocitrato liasa	-4,11
AA09_11555	<i>STY4639</i>	Proteína hipotética	-4,78
AA09_15515	<i>pyrI</i>	Subunidad regulatoria aspartato carbamoiltransferasa	-2,52
AA09_21735	<i>dinF</i>	Proteína de membrana inducible por daño al DNA hipotética	-2,15
AA09_06645	<i>STY1166</i>	N-acetilmanosamina-6-fosfato 2-epimerasa hipotética	-3,20
AA09_17950	<i>uxuB</i>	D-manonato oxidorreductasa	-2,42

AA09_10505	<i>phsB</i>	Subunidad B de polisulfida reductasa	-3,39
AA09_22540	<i>STY4607</i>	Proteína de cubiertade la cola	-2,88
AA09_12715	<i>STY3676</i>	Proteína hipotética de la cápside	-3,58
AA09_15685	<i>ATC04-20950</i>	Proteína de iniciación de la septación	-2,79
AA09_12580	<i>ilvC</i>	Cetol-ácido reductoisomerasa	-3,81
AA09_11620	<i>vexD</i>	Proteína de membrana interna VexD exportadora polisacárido Vi	-2,05

Anexo 3. Valores transcripcionales de genes sobreexpresados en la mutante *glnA* comparada a la cepa WT STH2370. El cambio de veces indica la razón entre los niveles de expresión en STH2370 y *glnA*.

Locus	Gen	Descripción Funcional	Cambio de veces <i>glnA</i> /STH2370	
			RNA-Seq	RT-qPCR
AA09_07230	<i>amtB</i>	Transportador de amonio probable	242	
AA09_07225	<i>glnK</i>	Proteína PII reguladora del nitrógeno	344	
AA09_09975	Sin anotación	Proteína hipotética	12	
AA09_03070	<i>glnH</i>	Proteína periplásmica de unión de glutamina	12	
AA09_03065	<i>glnP</i>	Permeasa del transportador ABC de glutamina	8	
AA09_13300	<i>rbsD</i>	Proteína RbsD transportadora de ribosa de alta afinidad	9	
AA09_20285	<i>asr</i>	Proteína de respuesta al estrés putativa. Ortóloga de <i>asr</i> de <i>E. coli</i>	11	
AA09_17410	<i>STY1854</i>	Proteína hipotética	7	
AA09_22655	<i>STY0893</i>	Proteína BssR regulatoria de formación de <i>biofilm</i>	5	
AA09_03060	<i>glnQ</i>	Proteína de unión ATP del transportador ABC de glutamina	5	
AA09_09955	<i>glnL</i>	Proteína NR(II) reguladora del nitrógeno	8	11
AA09_17490	<i>STY1871</i>	Proteína de choque térmico putativa	4	
AA09_09960	<i>glnG</i>	Regulador transcripcional GlnG	4,5	5,4
AA09_21880	<i>STY4465</i>	Glutación S-transferasa putativo	3,93	
AA09_09590	<i>STY3796</i>	Transportador putativo ABC de azúcar	3,44	
AA09_04385	<i>STY1982</i>	Proteína hipotética	6,75	
AA09_08280	<i>fadE</i>	Acil-CoA deshidrogenasa	24,55	
AA09_22650	<i>rimO</i>	Proteína ribosomal S12 metiltiottransferasa ribosomal protein S12 methylthiottransferase	2,83	
AA09_19845	<i>rpoS</i>	Factor sigma de la RNA polimerasa RpoS	2,70	
AA09_21640	<i>STY4415</i>	Transportador putativo de azúcar PTS	3,27	
AA09_02075	<i>ybdR</i>	Alcohol deshidrogenasa hipotética dependiente de Zinc	3,43	
AA09_03125	<i>citF2</i>	Citrato liasa subunidad alfa	5,56	
AA09_07235	<i>tesB</i>	Acil-CoA tioesterasa II	2,83	
AA09_03120	<i>citE2</i>	Citrato liasa cadena beta	5,86	
AA09_09050	<i>argT</i>	Proteína de unión de sustrato transportador ABC de lisina/arginina/ornitina	4,22	
AA09_09045	<i>hisJ</i>	Proteína periplásmica de unión a histidina	5,55	
AA09_06005	<i>narU</i>	Proteína 2 de extrusión de nitrito	3,97	
AA09_06820	<i>pyrC</i>	Dihidroorotasa	2,62	
AA09_10935	<i>fbaB</i>	Fructosa -bisfosfato aldolasa	3,94	
AA09_17515	<i>pagC</i>	Proteína de invasión de membrana externa	3,81	
AA09_02105	<i>citF</i>	Citrato liasa sudunidad alfa	5,20	
AA09_20835	<i>ydhE</i>	Proteína hipotética integral de membrana Ortóloga a <i>ydhE</i> de <i>E. coli</i>	2,58	

AA09_20050	<i>relA</i>	GTP pirofosfokinasa	2,43	
AA09_18380	<i>STY3396</i>	Putrescina-2-oxoglutarato aminotransferasa probable	4,00	
AA09_21635	<i>STY4414</i>	Proteína hipotética de biosíntesis de histidina	2,48	
AA09_19850	<i>nlpD</i>	Lipoproteína NlpD	2,51	
AA09_05810	<i>STY1450</i>	Fosfotransferasa putativa	3,39	
AA09_09035	<i>hisM</i>	Permeasa HisM del sistema transportador ABC de histidina/lisina/arginina/ornitina	2,79	
AA09_15300	<i>fis</i>	Proteína de unión al DNA Fis	2,28	1,45
AA09_06710	<i>csgE</i>	Proteína CsgE de ensamblaje curli	4,76	
AA09_09040	<i>hisQ</i>	Permeasa HisQ del sistema transportador ABC de histidina/lisina/arginina/ornitina	2,85	
AA09_02980	<i>ybhO</i>	Cardiolipina sintasa 2 putative	2,79	
AA09_02985	<i>ybhP</i>	Proteína hipotética. Ortóloga de YbhP de <i>E. coli</i>	3,34	
AA09_11035	<i>yehV</i>	Regulador transcripcional putativo de la familia MerR	3,16	
AA09_09585	<i>STY3795</i>	Permeasa putativa del transportador ABC	2,80	
AA09_02125	<i>dpiB</i>	Sensor histidina quinasa DpiB	2,69	
AA09_12345	<i>yigI</i>	Proteína hipotética. Ortóloga de YigI de <i>E. coli</i>	2,44	
AA09_21190	<i>nlpC</i>	Endopeptidasa putativa	2,55	
AA09_03130	<i>citX2</i>	Apo-citrato liasa fosforibosil-defosfo-CoA transferasa	4,05	
AA09_05945	<i>STY1478</i>	Precursor probable del Receptor TonB-dependiente YncD	2,28	
AA09_06705	<i>csgF</i>	Proteína CsgF de ensamble <i>curli</i>	5,58	
AA09_02770	<i>STY0800</i>	Proteína secretada probable. Ortóloga de YBGS de <i>E. coli</i>	3,29	
AA09_08570	<i>aroM</i>	Proteína AroM hipotética	2,41	
AA09_05815	<i>STY1451</i>	Fosfotransferasa putativa. Paróloga de GatB de <i>E.coli</i>	3,63	
AA09_15295	<i>STY3564</i>	tRNA-dihidrouridina sintasa B hipotética	2,13	
AA09_21630	<i>STY4413</i>	Hidrolasa hipotética	2,40	
AA09_22740	<i>potF</i>	Precursor de proteína de unión de sustrato del transportador ABC putrescina/spermidina	2,52	
AA09_11190	<i>galS</i>	Represor mgL y factor de ultra inducción de galactosa	2,84	
AA09_10555	<i>hisB</i>	Imidazol glicerol-fosfato deshidratasa	2,27	
AA09_10560	<i>hisH</i>	Imidazol glicerol fosfato sintasa	2,22	
AA09_15265	<i>STY3558</i>	Sulfito oxidasa subunidad YedZ putativa	2,06	
AA09_04970	<i>talA</i>	Transaldolasa A	2,12	
AA09_13295	<i>rbsA</i>	Proteína de transporte de ribosa de alta afinidad	2,62	
AA09_00145	<i>uhpT</i>	Proteína de transporte hexosafosfato	2,22	
AA09_19260	<i>nrdI</i>	Proteína estimuladora de ribonucleótido reductasa	4,80	
AA09_04225	<i>fadD</i>	Ácido graso de cadena-CoA ligasa	2,17	
AA09_06070	<i>STY1503</i>	Malto-oligosiltrehalosa trehalohidrolasa putativa	2,47	
AA09_19175	<i>ygaF</i>	Hidroxiglutarato oxidasa putativa	2,42	

AA09_00700	<i>aldB</i>	Aldehído dehidrogenasa B	2,75	
AA09_19170	<i>STY2909</i>	Proteína hipotética. Similar a la proteína Gab de <i>E. coli</i>	2,70	
AA09_09230	<i>fadI</i>	3-cetoacil-CoA tiolasa	2,23	
AA09_17540	<i>cdtB</i>	Proteína tipo toxina putativa	2,67	
AA09_22840	<i>poxB</i>	Piruvato dehidrogenasa	2,61	
AA09_10135	<i>STY2195</i>	Proteína hipotética	2,54	
AA09_14675	<i>bolA</i>	Regulador transcripcional BolA	2,04	
AA09_15120	<i>STY2878</i>	Proteína de secreción tipo I de la familia HlyD putativa	2,65	
AA09_16910	<i>galD</i>	Transportador D-galactosa	2,12	
AA09_20825	<i>cfa</i>	Ciclopropano-graso-acil-fosfolípido sintas	2,36	
AA09_09270	<i>STY2629</i>	Aciltransferasa de modificación del lipolisacárido putativa	2,46	
AA09_22990	<i>ycaD</i>	Transportador MFS probable	2,51	
AA09_06765	<i>STY1189</i>	Lipoproteína putativa	2,25	
AA09_10550	<i>hisC</i>	Histidinol-fosfato aminotransferasa	2,27	
AA09_09030	<i>hisP</i>	Proteína de unión a ATP del transportador de histidina	2,47	
AA09_06040	<i>STY1496</i>	Proteína de modulación dependiente del biofilm hipotética	3,95	
AA09_06770	<i>msyB</i>	Proteína ácida MsyB, supresor multicopia de SecY	2,10	
AA09_13115	<i>pirB</i>	orotidina 5'-fosfato decarboxilasa	2,11	
AA09_02130	<i>dpiA</i>	Regulador transcripcional Cria	2,43	
AA09_10130	<i>STY2194</i>	Diguanilato ciclasa putativa	2,2	