

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**“Efecto de la hidroxilación del lípido A en *Salmonella enterica*
serovar Enteritidis sobre la interacción con macrófagos murinos y
la virulencia *in vivo*”**

**Proyecto de tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al Grado Académico
de Magíster en Bioquímica, área de especialización en Bioquímica Toxicológica y
Diagnóstico Molecular y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:**

FERNANDO ANDRÉS AMAYA INZUNZA

Directores de Tesis

Dr. Sergio Aníbal Álvarez Armijo

Dr. Carlos Alberto Santiviago Cid

SANTIAGO - CHILE

2018

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato:

FERNANDO ANDRÉS AMAYA INZUNZA

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de especialización en Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico Molecular y al título de Bioquímico, en el examen público rendido el día

_____.

Directores de Tesis:

Dr. Sergio A. Álvarez

Dr. Carlos A. Santiviago

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Dante Miranda (Presidente)

Dra. Daniela Seelenfreund

Dra. Denisse Bravo

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a mi familia por su apoyo incondicional. En particular a mi padre Fernando por la sabiduría de todas sus enseñanzas, a mi madre Juana por todo su amor y preocupación, y a mi hermana Marlene por ser un ejemplo de perseverancia para mí.

A los amigos que son escasos, pero muy íntimos y confiables. Agradezco a Marcela, Felipe y Bayron, quienes además de mi familia, son mi cuerda de seguridad para enfrentar la vida. En especial Bayron, cuya compañía me ha aliviado en circunstancias difíciles. También agradezco a Christopher “Quezada” y a Víctor “Aballai”, por haber tenido la fortuna de acumular tantos recuerdos agradables, que reviven en cada una de nuestras infrecuentes reuniones. A Sebastián por ser un amigo entrañable en el barrio desde los últimos años de infancia a la fecha. Asimismo, agradecer a Matilde por las esporádicas, pero profundas conversaciones en persona o a distancia.

Agradezco a Begoña por ayudarme a flexibilizar mi actitud frente a muchos aspectos de la vida, permitiéndome disfrutar más de cada vivencia. También por todos los momentos a su lado, los buenos y malos, así como por la oportunidad de compartir con Ariadne.

Agradecer a la Dra. Sandra Ampuero por guiar con paciencia y dedicación mi primera aproximación real a un laboratorio de investigación, sin olvidar la imprescindible alegría y ayuda de la Sra. Dina. A la Dra. Inés Contreras quien con afecto y rigurosidad contribuyó a consolidar mi pasión por la Microbiología, al permitirme trabajar en su laboratorio y más aún, hacerlo bajo la extraordinaria tutela del Dr. Carlos Blondel, a quien agradezco por todo lo aprendido.

A la Dra. Daniela Seelenfreund, a la Dra. Denisse Bravo y al Dr. Dante Mirante, quienes como comisión académica aportaron activamente al desarrollo de esta tesis, siempre con una intención constructiva, destacando por su compromiso con el éxito del trabajo.

A mis directores de tesis, el Dr. Sergio Álvarez y el Dr. Carlos Santiviago, en quienes siempre encontré apoyo como estudiante y como persona, brindándome todas las facilidades para mi formación e incluso más importante, para desenvolverme cómodamente durante mi estancia en el laboratorio.

A los miembros pasados y actuales del laboratorio de Microbiología, quienes establecen un entorno muy distendido y acogedor, manteniendo una dinámica comparable a la de una familia. Agradecer a Kamo por estar ahí para resolver cualquier problema, actuando de forma muy fraternal como una hermana mayor. A Pali por ser una jefa implícita, siempre

preocupada por el bienestar de los demás, ayudando ante la menor señal de dificultad. A Andrea por su valiosa voluntad de estar disponible para colaborar con todos, pese a lo ocupada que esté, siendo la eficiencia encarnada. A Ítalo por ser el compadre ideal, trabajando mucho sin ignorar cualquier ocasión para iniciar una broma o continuar la que otro ha empezado. A Bea por toda la entretención que ofrece su deslumbrante ingenio para bromear, sumado a que es la mejor defensora que una persona puede tener ante una disputa con carácter de broma. A Jimmy por la simpatía que irradia su comportamiento amable, estando siempre predispuesto a respaldar cualquier idea. A Héctor por toda la diversión de verlo esmerarse en ocultar su evidente gentileza detrás de una falsa amargura, que lo hace quejarse por todo. A Morgan por su sinceridad y naturalidad, compartiendo con todos su muy entretenida visión de la vida. En general, a todos por sus buenos deseos y ayuda.

En cuanto a los integrantes que -ya no están en el laboratorio, mencionar a Sebastián con quien se podía entablar una interesante discusión en cualquier situación y sobre cualquier tema. A Pipe por ser quien me entrenó en muchos de los métodos empleados en esta tesis, además de vivir constantemente en un chiste estando a su lado. A RAET de quien también recibí capacitación, generando una sinergia para trabajar y para bromear sobre hechos ridículamente irónicos.

A la Dra. Helene Andrews-Polymenis y a todos los miembros de su grupo en la *Texas A & M University*, Lydia, Marissa, Jyotsana, Chris y Max, quienes me acogieron con una hospitalidad propia de una familia durante una pasantía en su laboratorio, en la que aprendí mucho y disfruté de la magnífica calidad humana de todos.

Agradecer a todos mis compañeros de generación de la carrera de Bioquímica, sintiéndome perpetuamente privilegiado por pertenecer a un conjunto de personas tan maravillosas, que por sobre todo constituyen la mayor recompensa de todos estos años de esfuerzo.

¡Muchas gracias a todos!

“Dios es causa y efecto, es efecto y causa. El hombre es sólo efecto de una causa que no entiende.”

(Fernando Amaya Becerra)

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología “Rafael Virgilio A”, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Sergio A. Álvarez y el Dr. Carlos A. Santiviago.

El trabajo de tesis contó con financiamiento de los proyectos FONDECYT 1130225, 1140754 y 1171844 y las becas CONICYT para estudios de Doctorado Nacional folio 21140692 y de Magíster Nacional folio 22151395. La pasantía realizada en el laboratorio de la Dra. Helene Andrews-Polymeris (Department of Microbial Pathogenesis and Immunology, College of Medicine. Health Science Center, Texas A&M University. Bryan, Texas. USA) se financió mediante una beca Ayudas para Estadías Cortas de Investigación, otorgada por el Departamento de Postgrado y Postítulo de la Vicerrectoría de Asuntos Académicos de la Universidad de Chile, convocatoria 2016-2017.

PUBLICACIONES

Oetiker, N., Norambuena, R., Martínez-Bussenius, C., Navarro, C. A., **Amaya, F.**, Álvarez, S. A., Paradela, A. & Jerez, C. A. (2018). Possible role of envelope components in the extreme copper resistance of the biomining *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Genes*. **9** (7): 347. DOI: 10.3390/genes9070347.

Fernández, P. A., Velásquez, F., Garcias-Papayani, H., **Amaya, F. A.**, Ortega, J., Gómez, S., Santiviago, C. A. & Álvarez, S. A. (2018). Fnr and ArcA regulate lipid A hydroxylation in *Salmonella* Enteritidis by controlling *lpxO* expression in response to oxygen availability. *Front. Microbiol.* **9**: 1220. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01220.

Espinoza, R., Silva-Valenzuela, C., **Amaya, F.**, Urrutia, Í., Contreras, I. & Santiviago, C. (2017). Differential roles for pathogenicity islands SPI-13 and SPI-8 in the interaction of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhi with murine and human macrophages. *Biol Res.* **50** (1):5. DOI: 10.1186/s40659-017-0109-8.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS INTERNACIONALES

Fernández, P., Velásquez, F., Ortega, J., Silva, C. A., Garcias-Papayani, H., **Amaya, F.**, Santiviago, C. A. & Álvarez, S. A. **Changes in lipid a hydroxylation and *lpxO* expression are regulated by the global regulator FNR in *Salmonella* Enteritidis.** 7th Congress of European Microbiologists. Valencia, España. 09 al 13 de Julio, 2017.

Amaya, F., Fernández, P., Velásquez, F., Hermoso M. A., Santiviago C. A. & Álvarez, S. A. ***Salmonella* Enteritidis requires lipid a hydroxylation for intracellular survival in murine macrophages and for reduction of IL-6 secretion in response to infection.** 117th ASM Microbe Meeting. New Orleans, Louisiana, USA. 01 al 05 de Junio, 2017.

Fernández, P., Velásquez, F., Silva, C. A., Garcias-Papayani-Papayani, H., **Amaya, F.**, Santiviago, C. A. & Álvarez, S. A. **El factor transcripcional ArcA participa en la regulación oxígeno-dependiente de las modificaciones covalentes del lípido A en**

Salmonella Enteritidis. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología. Rosario, Argentina. 26 al 30 de Septiembre 2016.

Fernandez, P., Silva, C. A., Velásquez, F., **Amaya, F.**, Garcias-Papayani, H., Santiviago, C. A. & Álvarez, S. A. **Changes in expression of genes involved in O-antigen chain length regulation and lipid A covalent modification are regulated by FNR in *Salmonella Enteritidis***. 116th ASM General Meeting. Boston, Massachusetts, USA. 16 al 20 de Junio, 2016.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS NACIONALES

Amaya, F., Fernández, P., Garcias-Papayani, H., Velásquez, F., Bowden, C., Gupta, J., Talamantes, M., Bogomolnaya, L., Andrews-Polymenis, H., Santiviago, C. A. & Álvarez S. A. **The hydroxylation level of lipid A is critical for the interaction of *Salmonella Enteritidis* with murine macrophages and its ability to colonize the murine host**. XXXIX Congreso Chileno de Microbiología. La Serena, Chile. 14 al 17 de noviembre, 2017.

Fernández, P., Velásquez, F., Ortega, J., Garcias-Papayani, H., **Amaya, F.**, Silva, C. A., Santiviago, C. A & Álvarez, S. A. **FNR and ArcA regulate lipid A hydroxylation in *Salmonella Enteritidis* by controlling *lpxO* expression in response to oxygen availability**. XXXIX Congreso Chileno de Microbiología. La Serena, Chile. 14 al 17 de Noviembre 2017.

Sabag, A., Labra, B., Valenzuela, C., **Amaya, F.**, Porwollik, S., McClelland, M., Álvarez, S. A. & Santiviago, C. A. **High-throughput identification of genes required for intracellular survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in murine macrophages and *Dictyostelium discoideum***. XXXIX Congreso Chileno de Microbiología. La Serena, Chile. 14 al 17 de Noviembre 2017.

Garcias-Papayani, H., Fernández, P., **Amaya, F.**, Santiviago, C. A., Bravo, D. & Álvarez, S. A. **Impact of iron availability and medium acidity on lipid A structure in *Helicobacter pylori***. XXXIX Congreso Chileno de Microbiología. La Serena, Chile. 14 al 17 de noviembre, 2017.

Norambuena, R., Vargas, M. J., **Amaya, F.**, Álvarez, S. & Jerez, C. A. **Effect of copper on the quality and quantity of the lipopolysaccharide from *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains ATCC23270 and ATCC53993 grown in the presence of the metal.** XXXIX Congreso Chileno de Microbiología. La Serena, Chile. 14 al 17 de Noviembre 2017.

Amaya, F., Fernández, P., Velásquez, F., Santiviago, C. A. & Álvarez, S. A. **La hidroxilación del lípido A de *Salmonella* Enteritidis favorece la supervivencia intracelular y reduce la respuesta inflamatoria en macrófagos murinos.** XXXVIII Congreso Chileno de Microbiología. Valdivia, Chile. 22 al 25 de noviembre, 2016.

Fernández P., Silva, C. A., Velásquez, F., **Amaya, F.**, Garcias-Papayani, H., Santiviago, C. A. & Alvarez, S. A. **La expresión de los determinantes del largo de cadena del antígeno O es regulada por FNR y ArcA en *Salmonella* Enteritidis.** XXXVIII Congreso Chileno de Microbiología. Valdivia, Chile. 22 al 25 de noviembre, 2016.

Velásquez, F., **Amaya, F.**, Silva, C. A., Santiviago, C. A. & Álvarez, S. A. **Los factores transcripcionales ArcA y Fnr participan en la modulación la estructura del lípido a de *Salmonella* Enteritidis.** XXXVII Congreso Chileno de Microbiología. La Serena, Chile. 01 al 04 de Diciembre, 2015.

ÍNDICE GENERAL

Índice General	IX
Índice de Tablas y Figuras	XII
Abreviaturas	XIV
Resumen	XVII
Abstract	XIX
1.- Introducción	1
1.1.- Generalidades sobre la infección por <i>Salmonella</i>	1
1.2.- Adaptación de <i>Salmonella</i> a distintos microambientes durante su ciclo infectivo	2
1.3.- Estructura y biosíntesis del lipopolisacárido en <i>Salmonella</i>	4
1.4.- Modificación del lipopolisacárido y su repercusión sobre la patogénesis de <i>Salmonella</i>	5
1.5.- Modificación del lípido A por la enzima LpxO	8
2.- Hipótesis	11
3.- Objetivo General	12
4.- Objetivos Específicos	12
5.- Materiales y Métodos	13
5.1.- Reactivos	13
5.2.- Cepas bacterianas	14
5.3.- Plasmidios.....	14
5.4.- Partidores	16
5.5.- Medios y condiciones de cultivo bacteriano	16
5.6.- Líneas celulares eucariontes	16
5.7.- Medios y condiciones de cultivo de células eucariontes	17
5.8.- Extracción de DNA genómico bacteriano	17
5.9.- Construcción de mutantes de <i>S. Enteritidis</i> NCTC13349 por el método <i>Red-swap</i> ...	17
5.9.1.- Extracción DNA plasmidial	18
5.9.2.- Obtención de productos de PCR para mutagénesis	18
5.9.3.- Preparación de bacterias electrocompetentes y transformación bacteriana	19
5.9.4.- Mutagénesis por intercambio alélico de productos de PCR.....	19
5.9.5.- Comprobación de las colonias mutantes por PCR	20
5.9.6.- Eliminación del <i>cassette</i> de resistencia a antibiótico	20

5.10.- Transducción de los alelos mutantes en <i>S. Enteritidis</i> NCTC13349.....	21
5.10.1.- Preparación del lisado de partículas transductoras.....	21
5.10.2.- Transducción.....	22
5.10.3.- Comprobación y selección de transductantes.....	22
5.11.- Complementación en <i>trans</i> de la mutante $\Delta lpxO$ de <i>S. Enteritidis</i> NCTC13349.....	23
5.12.- Extracción de LPS y purificación de lípido A de <i>S. Enteritidis</i> NCTC13349.....	24
5.13.- Análisis de las preparaciones de LPS y lípido A mediante electroforesis.....	25
5.14.- Análisis estructural del lípido A de cepas derivadas de <i>S. Enteritidis</i> NCTC13349 por espectrometría de masas.....	26
5.15.- Internalización y supervivencia intracelular de cepas derivadas <i>S. Enteritidis</i> NCTC13349 en macrófagos RAW264.7.....	27
5.16.- Secreción de IL-6 por macrófagos RAW264.7 desafiados con cepas derivadas <i>S. Enteritidis</i> NCTC13349.....	29
5.16.1.- Infección de macrófagos RAW264.7 con cepas derivadas <i>S. Enteritidis</i> NCTC13349.....	30
5.16.2.- Cuantificación de IL-6 por inmunoensayo tipo ELISA.....	30
5.17.- Colonización intestinal y sistémica de <i>S. Enteritidis</i> NCTC13349 <i>in vivo</i> en un modelo murino.....	31
5.17.1.- Declaración ética.....	31
5.17.2.- Animales.....	32
5.17.3.- Infección simple de ratones C57BL/6 por vía oral.....	32
5.18.- Estabilidad del vector pBAD-TOPO en ausencia del marcador de selección.....	33
5.19.- Cinética de crecimiento de <i>S. Enteritidis</i> NCTC13349 <i>in vitro</i>	34
5.20.- Análisis estadísticos y expresión de resultados.....	34
6.- Resultados.....	35
6.1.- Caracterización estructural del lípido A de <i>S. Enteritidis</i> mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.....	35
6.2.- Efecto de la hidroxilación del lípido A sobre la internalización y supervivencia intracelular de <i>S. Enteritidis</i> en macrófagos murinos.....	37
6.3.- La delección del gen <i>lpxO</i> incrementa la secreción de IL-6 en macrófagos murinos infectados con <i>S. Enteritidis</i>	39
6.4.- La hidroxilación del lípido A afecta la capacidad de colonización intestinal y sistémica de <i>S. Enteritidis</i> en un modelo murino.....	40

6.5.- La mutante $\Delta lpxO$ de <i>S. Enteritidis</i> complementada en <i>trans</i> sufre una selección negativa durante la infección en ratones C57BL/6.....	42
6.6.- La hidroxilación del lípido A altera la cinética de crecimiento, pero no la biomasa total de <i>S. Enteritidis in vitro</i>	45
7.- Discusión	47
7.1.- Perfil de especies de lípido A determinado por los genes <i>lpxO</i> y <i>visP</i> en <i>S. Enteritidis</i>	47
7.2.- Influencia de la hidroxilación del lípido A sobre la interacción de <i>S. Enteritidis</i> con macrófagos murinos.....	49
7.3.- Impacto de la hidroxilación del lípido A sobre la inmunogenicidad de <i>S. Enteritidis in vitro</i>	50
7.4.- Participación de la hidroxilación del lípido A sobre la colonización intestinal y sistémica de <i>S. Enteritidis</i> en un modelo murino	52
7.5.- Selección negativa de la mutante $\Delta lpxO$ de <i>S. Enteritidis</i> complementada en <i>trans</i> durante la infección <i>in vivo</i> y la alteración de su cinética de crecimiento <i>in vitro</i>	53
7.6.- Hidroxilación del lípido A en el marco de la infección por <i>Salmonella</i>	55
7.7.- Perspectivas finales	57
8.- Conclusiones	59
9.- Bibliografía	61

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1.	Cepas bacterianas.....	15
Tabla 2.	Listado de plasmidios	15
Tabla 3.	Oligonucleótidos partidores para PCR y mutagénesis.....	16
Tabla 4.	Líneas celulares eucariontes	17

FIGURAS

Figura 1.	Microambientes a los que <i>Salmonella</i> está expuesta durante su ciclo infectivo	3
Figura 2.	Estructura canónica del lípido A-Kdo ₂ de <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella</i>	4
Figura 3.	Remodelación de la estructura del lípido A-Kdo ₂ de <i>Salmonella</i>	8
Figura 4.	Reacción de hidroxilación catalizada por la enzima LpxO sobre el lípido A de <i>Salmonella</i>	10
Figura 5.	Extracción de LPS y purificación de lípido A	25
Figura 6.	Preparación de muestras de lípido A para espectrometría de masas MALDI-TOF.....	27
Figura 7.	Ensayo de protección a gentamicina de macrófagos RAW264.7 infectados con <i>S. Enteritidis</i> NCTC13349.....	28
Figura 8.	Ensayo de infección oral de ratones C57BL/6 con <i>S. Enteritidis</i> NCTC13349	32
Figura 9.	Caracterización de la estructura del lípido A de <i>S. Enteritidis</i> mediante espectrometría de masas MALDI-TOF	36
Figura 10.	Efecto de la hidroxilación del lípido A sobre la internalización y supervivencia intracelular de <i>S. Enteritidis</i> en macrófagos murinos	38
Figura 11.	Efecto de la delección del gen <i>lpxO</i> sobre la secreción de IL-6 en macrófagos murinos infectados con <i>S. Enteritidis</i>	40
Figura 12.	Efecto de la hidroxilación del lípido A sobre la colonización intestinal y sistémica de <i>S. Enteritidis</i> en un modelo murino.....	41

Figura 13.	Pérdida del plasmidio pBAD:: <i>lpxO</i> durante la infección de ratones C57BL76 con la mutante Δ <i>lpxO</i> de <i>S. Enteritidis</i> complementada en <i>trans</i>	44
Figura 14.	Efecto de la hidroxilación del lípido A sobre la cinética de crecimiento de <i>S. Enteritidis in vitro</i>	46
Figura 15.	Posible rol de la hidroxilación del lípido A en la colonización intestinal y diseminación sistémica de <i>Salmonella</i>	56

ABREVIATURAS

AgO:	Antígeno O
Amp:	Ampicilina
Amp ^R :	Resistencia a ampicilina
APS:	Persulfato de amonio
Cam:	Cloranfenicol
CAMPs:	Péptidos catiónicos antimicrobianos
Cam ^R :	Resistencia a cloranfenicol
Carb:	Carbenicilina
dATP:	Desoxiadenosina trifosfato
DC:	Células dendríticas
dCTP:	Desoxicitosina trifosfato
dGTP:	Desoxiguanidina trifosfato
DHB:	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico
DMEM:	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DOC:	Desoxicolato
dTTP:	Desoxitimidina trifosfato
EBU:	Azul de Evans-Uranina.
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA:	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima
EtOH:	Etanol
FBS:	Suero Fetal Bovino
g:	Aceleración gravitacional
GlcN:	Glucosamina
Gm:	Gentamicina
h:	Horas
IgA:	Inmunoglobulina A
IL-1 β :	Interleuquina 1 β
IL-6:	Interleuquina 6
iNOS:	Óxido nítrico sintasa inducible
Kan:	Kanamicina

Kan ^R :	Resistencia a kanamicina
Kb:	Kilobases
Kdo:	Ácido 3-desoxi-D-mano-oct-2-ulopiranosónico
L-Ara4N:	Aminoarabinosa
LB:	Luria-Bertani
LBP:	Proteína de unión a LPS
LPS:	Lipopolisacárido
m/Z:	Cociente masa/carga
MALDI-TOF:	Ionización/desorción láser asistida por matriz-tiempo de vuelo
MAMPs:	Patrones moleculares asociados a microorganismos
MD2:	Factor de diferenciación mieloide 2
MetOH:	Metanol
min:	Minutos
MLN:	Nodos linfáticos mesentéricos
MOI:	Multiplicidad de infección
NF- κ B:	Factor nuclear kappa B
OD _{600nm} :	Densidad óptica a 600 nanómetros
OH:	Hidroxilo
Pb:	Pares de bases
PBS:	Tampón fosfato salino
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
pEtN:	Fosfoetanolamina
PMN:	Polimorfonucleares
pO ₂ :	Presión parcial de oxígeno
PP:	Placas de Peyer
ROS:	Especies reactivas de oxígeno/nitrógeno
SDS:	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida- dodecilsulfato de sodio
seg:	Segundos
SPI:	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i>
Str:	Estreptomina
T3SS:	Sistema de secreción tipo III
TAE:	Tris base-acetato-EDTA

TCA:	Ácidos tricarboxílicos
TEMED:	Tetrametiletildiamina
TLR4:	Receptor tipo “Toll” 4
TNF- α :	Factor de necrosis tumoral α
UFC:	Unidades formadoras de colonias
v/v:	Volumen/volumen
VisP:	Proteína periplasmática asociada al estrés y virulencia

RESUMEN

El lipopolisacárido (LPS) es un glicolípido complejo y componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram negativo, que no sólo desempeña una importante función estructural, sino que también constituye la primera interfase de interacción y adaptación al ambiente. En bacterias patógenas, el LPS actúa como un factor de virulencia preponderante. Su estructura, compuesta por el antígeno O, el *core* de oligosacáridos y el lípido A, es modificada en virtud de los diferentes microambientes que la bacteria enfrenta durante la infección en un hospedero. La presencia y remodelación del LPS son fundamentales en los procesos de adhesión y colonización de tejidos e invasión de células del hospedero, así como en la evasión y resistencia ante sus mecanismos de inmunidad. La mayoría de las modificaciones del LPS con un impacto conocido sobre la virulencia ocurren en el lípido A, dominio hidrofóbico que lo mantiene unido a la membrana y que también es su principal motivo bioactivo, actuando como un potente inductor de la respuesta inmune. Las variaciones en la composición del lípido A están orientadas a reducir la susceptibilidad bacteriana a agentes antimicrobianos y/o a modular la toxicidad de la molécula, alterando su reconocimiento como ligando del Receptor Tipo “Toll” 4.

En *Salmonella*, LpxO es una dioxigenasa codificada por el gen *lpxO*, la cual cataliza la hidroxilación del lípido A. Mutantes de *Salmonella* Typhimurium con una delección de *lpxO* manifiestan un fenotipo atenuado *in vitro* en macrófagos murinos e *in vivo* en ratones. Además, en este serovar la actividad catalítica de LpxO es inhibida por la proteína VisP, en cuya ausencia aumenta la hidroxilación del lípido A. La delección del gen *visP* también produce una atenuación de *S. Typhimurium*. Por otro lado, en *Klebsiella pneumoniae* se ha descrito que la hidroxilación del lípido A media la resistencia a péptidos bactericidas y mitiga la respuesta inmune de macrófagos murinos. En *Salmonella* las propiedades inflamatorias del lípido A hidroxilado aún no han sido exploradas.

El objetivo de esta tesis fue caracterizar la influencia de la hidroxilación del lípido A sobre la virulencia de *Salmonella* Enteritidis, una enterobacteria patógena Gram negativo de gran relevancia para la salud pública y la industria alimentaria, al ser actualmente el agente etiológico más prevalente de la salmonelosis transmitida por alimentos en el mundo. Para esto, se generaron mutantes de *S. Enteritidis* por delección del gen *visP* o *lpxO*, siendo este último también sobreexpresado por complementación en *trans*. El lípido A purificado desde la cepa silvestre y las mutantes se caracterizó estructuralmente mediante espectrometría de masas

MALDI-TOF. También, se evaluó la interacción *in vitro* de cada cepa con macrófagos murinos, así como su capacidad para colonizar *in vivo* el intestino, tejidos linfoides subyacentes y órganos internos durante una infección simple en ratones.

En la cepa silvestre de *S. Enteritidis*, se encontró que coexisten especies de lípido A hidroxilado y no hidroxilado en una distribución y proporción definida. Por su parte, la delección de *lpxO* produjo sólo especies de lípido A carentes de hidroxilación, mientras que la sobreexpresión del gen produjo sólo especies de lípido A hidroxiladas. Tanto la delección como la sobreexpresión de *lpxO* condujeron a una mayor fagocitosis, pero menor supervivencia intracelular de la bacteria en macrófagos murinos y provocaron que también sufriera graves defectos en la colonización intestinal y sistémica en ratones. La mutante que carece del gen *lpxO* indujo una mayor secreción de IL-6 por parte de macrófagos, indicio de que la modificación podría tener un efecto modulador sobre el potencial inmunogénico del lípido A como endotoxina. Por otro lado, la delección del gen *visP* no causó ningún cambio en la hidroxilación del lípido A de *S. Enteritidis*, ni tampoco alteró la secreción de la citoquina pro-inflamatoria.

El efecto que la hidroxilación tuvo sobre la respuesta inflamatoria de macrófagos es de particular interés, pues a la fecha es la primera y única evidencia que existe dentro del género *Salmonella* referida a que esta modificación podría influir sobre la inmunogenicidad del lípido A. En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que debe existir un adecuado balance en la hidroxilación del lípido A de *S. Enteritidis*, tal como ocurre en cepa silvestre, para que la modificación contribuya a la virulencia de la bacteria.

ABSTRACT

Effect of lipid A hydroxylation on the interaction of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with murine macrophages and its virulence *in vivo*

The lipopolysaccharide (LPS) is a complex glycolipid and a major component of outer membrane of Gram negative bacteria. It fulfills an important structural function and also constitutes the first interface for interaction and adaptation to the environment. In pathogenic bacteria, LPS acts as a preponderant virulence factor in pathogenesis. Its structure, composed by O antigen, core oligosaccharide and lipid A, is modified in response to different microenvironments faced by the bacterium during infection. The presence and remodeling of LPS is essential in several processes, such as adhesion and colonization of tissues, invasion of host cells, and evasion and resistance of host immunity. Most LPS modifications with a known impact on virulence occur in lipid A, a hydrophobic domain that keeps LPS linked to membrane and also corresponds to its main bioactive moiety, acting as a strong inducer of the immune response. Variations in lipid A composition are oriented to decrease the bacterial susceptibility to antimicrobial agents and/or to modulate the toxicity of this molecule, altering its recognition by Toll-like Receptor 4 (TLR4).

In *Salmonella*, LpxO is a dioxygenase encoded by the *lpxO* gene, which catalyzes the hydroxylation of lipid A. Mutants of *Salmonella* Typhimurium with a deletion of *lpxO* show an attenuated phenotype *in vitro* in murine macrophages and *in vivo* in mice. Moreover, in this serovar the catalytic activity of LpxO is inhibited by VisP protein, whose absence results in increased lipid A hydroxylation. The deletion of *visP* also results in attenuation of *S. Typhimurium*. In addition, it has been described that lipid A hydroxylation in *Klebsiella pneumoniae* mediates the resistance to bactericide peptides and decreases the immune response of murine macrophages. In *Salmonella*, the inflammatory properties of hydroxylated lipid A have not yet been explored.

The aim of this thesis was to characterize the influence that lipid A hydroxylation has on virulence of *Salmonella* Enteritidis, a Gram negative pathogenic enterobacterium relevant to public health and food industry, because it is the most prevalent etiologic agent of food-borne salmonellosis in the world. To this end, mutant strains of *S. Enteritidis* were constructed by deletion of *visP* or *lpxO*, being this latter gene also overexpressed by *trans* complementation. Lipid A purified from the wild-type strain and mutants was structurally

characterized through MALDI-TOF mass spectrometry. The *in vitro* interaction of each strain with murine macrophages was also evaluated, as well as its ability to colonize *in vivo* the intestine, underlying lymphoid tissues and internal organs during murine infection.

In the wild-type strain of *S. Enteritidis* we found that non-hydroxylated and hydroxylated lipid A species coexist in a defined distribution and proportion. The deletion of *lpxO* produced a lipid A lacking hydroxylation, whereas overexpression of this gene resulted in a fully hydroxylated lipid A. Both deletion and overexpression of *lpxO* led to increased phagocytosis, but lower intracellular survival of the bacterium in murine macrophages, and caused severe defects in the intestinal and systemic colonization in mice. The mutant lacking *lpxO* gene also induced high levels of IL-6 secretion by macrophages, suggesting that hydroxylation has a modulatory effect on the immunogenic potential of lipid A as endotoxin. In other hand, the deletion of *visP* gene did not cause any change in lipid A hydroxylation of *S. Enteritidis*, or alterations in the secretion of the pro-inflammatory cytokine.

The effect of hydroxylation on the inflammatory response of murine macrophages is particularly interesting, because this is the first and only evidence within the *Salmonella* genus indicating that this modification could influence lipid A immunogenicity. Overall, the results obtained suggest that there must be an adequate balance in the hydroxylation of lipid A of *S. Enteritidis*, as in the case of the wild-type strain, so that this modification contributes to virulence of the bacterium.

1.-INTRODUCCIÓN

1.1.- Generalidades sobre la infección por *Salmonella*

El género *Salmonella* comprende a bacilos Gram negativo que se comportan como patógenos intracelulares facultativos (McQuiston *et al.*, 2008). Los miembros del género están agrupados en dos especies: *Salmonella bongori* (*S. bongori*) y *Salmonella enterica* (*S. enterica*). A su vez, *S. enterica* se divide en las subespecies *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIa), *houtenae* (IV) e *indica* (VI). En conjunto, ambas especies de *Salmonella* pueden ser serotipificadas en más de 2,500 serovares de acuerdo a la diversidad de sus antígenos somáticos (O) y flagelares (H) (Brenner *et al.*, 2000; Fierer & Guiney, 2001). El serovar Enteritidis de *S. enterica* subespecie *enterica* (*S. Enteritidis*) puede infectar a un amplio rango de hospederos, incluyendo aves, roedores y humanos (Galán, 1996), produciendo una infección sistémica similar a la fiebre tifoidea en ratones y polluelos, mientras que en humanos causa una gastroenteritis auto-limitada caracterizada por diarrea, náuseas, vómitos, fiebre y dolor abdominal (Santos *et al.*, 2001). En los últimos años, *S. Enteritidis* ha surgido como el principal agente etiológico de la salmonelosis transmitida por alimentos en el mundo, desplazando a *S. enterica* subespecie *enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) (Guard-Petter, 2001).

Los mecanismos involucrados en la patogenicidad de *S. Enteritidis* no son completamente entendidos; sin embargo, se presume su semejanza con los de *S. Typhimurium* pues comparten muchos factores de virulencia, desarrollando ambas un cuadro clínico similar de colitis en humanos y de enfermedad sistémica en ratones (Silva *et al.*, 2012a). La infección comienza por la ingestión de alimentos o agua contaminados con la bacteria, la cual sobrevive al pH ácido durante su tránsito a través del estómago hacia el íleon (García-del Portillo *et al.*, 1993). Aquí, *Salmonella* penetra el epitelio intestinal escapando de sales biliares, enzimas digestivas, inmunoglobulinas A (IgA) secretadas y péptidos catiónicos antimicrobianos (CAMPs) presentes en el lumen del intestino (Prouty *et al.*, 2004; Michetti *et al.*, 1992; Selsted *et al.*, 1992). El acceso de la bacteria a la submucosa ocurre a través de las células M en las placas de Peyer (Jones *et al.*, 1994), de fagocitos CD18 positivos (Vazquez-Torres *et al.*, 1999) o de células epiteliales no fagocíticas. En este último caso, *Salmonella* induce su propia endocitosis mediante proteínas efectoras, las cuales son translocadas hacia el citoplasma de la célula hospedero por un sistema de secreción tipo III (T3SS) codificado en la

isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI-1). Ya en el subepitelio, *Salmonella* es fagocitada por células fagocíticas profesionales como macrófagos y células dendríticas residentes en las placas de Peyer (Vazquez-Torres *et al.*, 1999). En el caso de *S. Enteritidis* o *S. Typhimurium* en humanos, el reconocimiento de la bacteria por los macrófagos induce una respuesta inflamatoria con secreción de citoquinas pro-inflamatorias e infiltración de leucocitos polimorfonucleares (McCormick *et al.*, 1995), limitando la infección al intestino. Por otro lado, cuando *S. Enteritidis* o *S. Typhimurium* infectan a un hospedero murino y cuando *S. enterica* subespecie *enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) infecta a humanos, la bacteria es capaz de sobrevivir y proliferar en el interior de los macrófagos por acción de proteínas secretadas por un segundo T3SS codificado en la SPI-2 (Ochman *et al.*, 1996; Shea *et al.*, 1996; Hensel *et al.*, 1998), pudiendo diseminarse hacia los nódulos linfáticos mesentéricos, el bazo y el hígado (Vazquez-Torres *et al.*, 1999), así como también hacia la médula ósea y la vesícula biliar, donde *Salmonella* puede persistir (Wain *et al.*, 2001; Sinnott & Teall, 1987).

1.2.- Adaptación de *Salmonella* a distintos microambientes durante su ciclo infectivo

Conforme progresa la infección de *Salmonella* en un hospedero, la bacteria se enfrenta a diferentes microambientes estresantes (**Fig. 1**). Aquellos más importantes durante su ciclo infectivo son: (i) un pH ácido en el estómago (Garcia-del Portillo *et al.*, 1993); (ii) una baja presión parcial de oxígeno, una alta osmolaridad y la presencia de sales biliares, CAMPs, IgA y de la microbiota comensal en el intestino (He *et al.*, 1999; Jennewein *et al.*, 2015; Rychlik & Barrow, 2005; Prouty *et al.*, 2004; Michetti *et al.*, 1992; Selsted *et al.*, 1992; Hurley *et al.*, 2014); así como (iii) una baja disponibilidad de nutrientes, una baja concentración de cationes divalentes, pH ligeramente ácido y la presencia de CAMPs y especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) en el interior de los macrófagos (Alpuche-Aranda *et al.*, 1992; Blanc-Potard & Groisman, 1997; Bader *et al.*, 2003; Vazquez-Torres & Fang, 2001). Todas estas condiciones no sólo son obstáculos que *Salmonella* debe superar para establecer una infección efectiva, sino que además constituyen señales ambientales que, a través de cambios en la expresión génica de la bacteria, inducen una serie de respuestas fisiológicas, como por ejemplo la adaptación de su metabolismo, producción de factores de virulencia y la remodelación de su envoltura (Shen & Fang, 2012; Fàbrega & Vila, 2013).

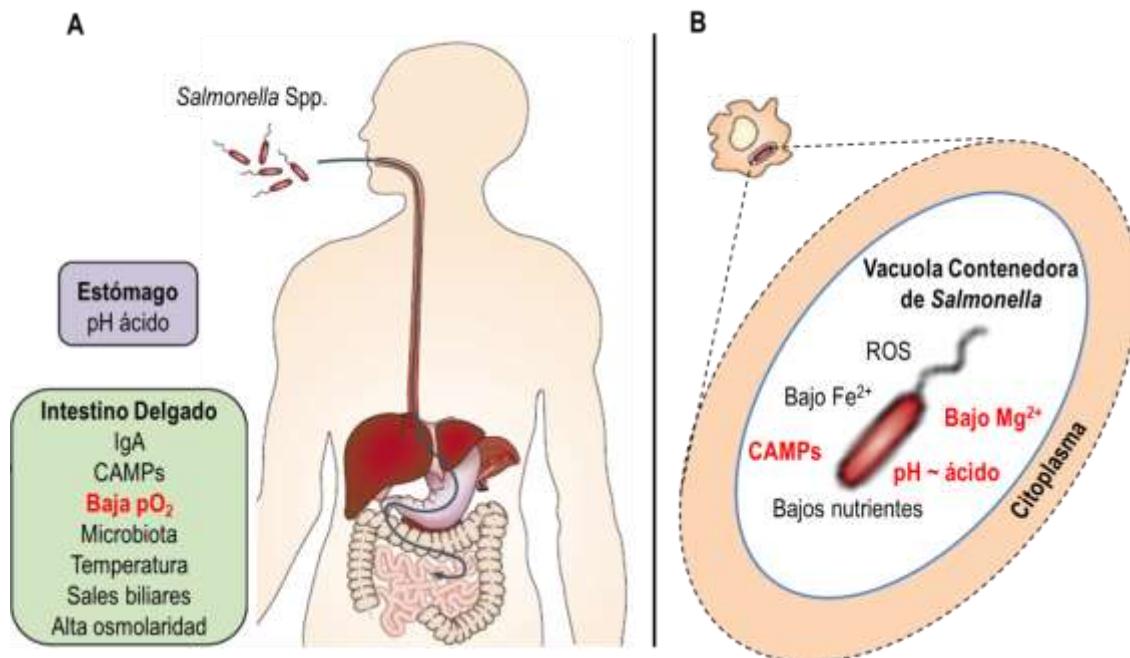


Figura 1. Microambientes a los que *Salmonella* está expuesta durante su ciclo infeccioso. (A) Condiciones que la bacteria debe enfrentar extracelularmente a lo largo de su tránsito a través del tracto gastrointestinal de su hospedero. En rojo se destaca la presión parcial de oxígeno como factor que controla la hidroxilación del lípido A. **(B)** Condiciones que *Salmonella* debe enfrentar intracelularmente luego de ser fagocitada por macrófagos. En rojo se destacan los factores que inducen las modificaciones del lípido A dependientes de la regulación del sistema de dos componentes PhoP-PhoQ. IgA: inmunoglobulina A; CAMPs: péptidos catiónicos antimicrobianos; pO_2 : presión parcial de oxígeno; ROS: especies reactivas de oxígeno/nitrógeno. Adaptado de Haraga *et al.*, 2008 y Hébrard *et al.*, 2011.

Al igual que en toda bacteria Gram negativo, la envoltura de *Salmonella* consiste en una membrana plasmática o interna, un espacio periplasmático en el que está ubicada la pared celular bacteriana y una membrana externa asimétrica (Silhavy *et al.*, 2010). El componente predominante de la cara exterior de la membrana externa es el lipopolisacárido (LPS), constituyendo entre un 75 - 90% de su superficie (Molinaro *et al.*, 2014; Giuliani *et al.*, 2010). El LPS es un glicolípido complejo de carácter anfipático que desempeña una función tanto estructural como de interacción y adaptación al entorno (Raetz *et al.*, 2002). El LPS, a través de la modificación de su composición, puede conferir resistencia contra moléculas hidrofílicas como CAMPs (Rosenfeld & Shai, 2006). Además, dada su localización, actúa como la principal interfase mediante la cual la bacteria interactúa con las células de su hospedero, siendo de importancia crítica en procesos como adhesión, colonización y activación de los mecanismos de inmunidad innata y adaptativa. Esto, ya que el LPS, junto con ser uno de los patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs) más conservados, es también un potente y abundante inmunógeno (Alexander *et al.*, 2001; Molinaro *et al.*, 2014; Raetz *et al.*,

1991; Raetz, 1993; Raetz *et al.*, 2007). En resumen, el LPS es uno de los determinantes de virulencia más relevantes en infecciones por bacterias Gram negativo.

1.3.- Estructura y biosíntesis del lipopolisacárido en *Salmonella*

El LPS es una macromolécula cuya estructura consta de tres dominios enlazados covalentemente: el lípido A, el *core* de oligosacáridos y el antígeno O (AgO) (Raetz & Whitfield, 2002; Nikaido, 2003; Raetz *et al.*, 2007). El lípido A es el componente hidrofóbico que ancla al LPS en la cara externa de la membrana externa. Su estructura canónica consiste en un disacárido de glucosamina (GlcN) difosforilado y sustituido con cuatro cadenas de ácidos grasos, dos de las cuales tienen una cadena acilo como sustituyente (Raetz & Whitfield, 2002). El esqueleto de GlcN del lípido A está glicosilado con dos residuos de ácido 3-desoxi-D-mano-oct-2-ulopiranosónico (Kdo), que son las primeras azúcares que integran el *core* en bacterias entéricas (Fig. 2A). A diferencia del lípido A y del *core* de oligosacáridos, el AgO es un polisacárido modular con una estructura altamente variable entre bacterias Gram negativo. La composición del módulo del AgO, así como su número de repeticiones y por ende la longitud de cadena del antígeno, varían ampliamente, incluso dentro de una misma especie bacteriana (Raetz & Whitfield, 2002).

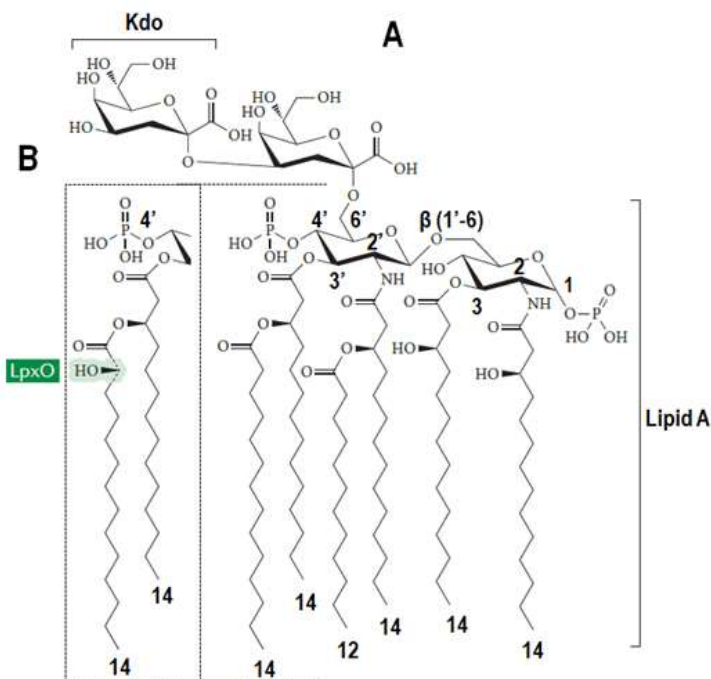


Figura 2. Estructura canónica del lípido A-Kdo₂ de *Escherichia coli* y *Salmonella*. (A) El lípido A está compuesto por dos residuos de glucosamina (GlcN) enlazados en un disacárido β 1'-6, cuyas posiciones 1 y 4' están fosforiladas. Las posiciones 2, 3, 2' y 3' del esqueleto de GlcN soportan acilaciones primarias de grupos R-3-hidroxiiristoil (3-OH-C₁₄). Las cadenas 3-OH-C₁₄ de las posiciones 2' y 3', están a su vez respectivamente sustituidas con los grupos laurato (C₁₂) y miristato (C₁₄), como acilaciones secundarias. Finalmente, el lípido A está glicosilado en la posición 6' del esqueleto de GlcN con dos residuos de ácido 3-desoxi-D-mano-oct-2-ulopiranosónico (Kdo), los cuales son las primeras de las 8-15 azúcares que comúnmente integran el *core* de enterobacterias (Raetz & Whitfield, 2002). (B) El carbono 2 de la cadena secundaria 3' del

lípido A es hidroxilado por la enzima LpxO, generando el motivo 2-hidroxiiristato (Gibbons *et al.*, 2000; Gibbons *et al.*, 2005; Gibbons *et al.*, 2008). A diferencia de *Salmonella*, el lípido A de *E. coli* no sufre esta hidroxilación ya que el gen *lpxO* está ausente en el genoma de la bacteria (Gibbons *et al.*, 2000). Adaptado de Needham & Trent, 2013.

A pesar que el LPS está localizado sobre la superficie bacteriana, su ruta biosintética comienza en el citoplasma a través de un proceso complejo que demanda la participación de muchas enzimas y proteínas estructurales codificadas por más de 50 genes, las que participan en reacciones de síntesis, exportación y ensamblaje (Raetz & Whitfield, 2002; Samuel & Reeves, 2003). Nueve de estos genes, con una expresión conservada en enterobacterias, codifican enzimas que operan secuencialmente en la biosíntesis del lípido A-Kdo₂, la cual transcurre en el citoplasma y sobre la cara interior de la membrana plasmática (Raetz & Whitfield, 2002; Wang & Quinn, 2010; Valvano, 2015). La síntesis del LPS prosigue con la adición sucesiva de azúcares sobre el lípido A-Kdo₂ por acción de una serie de glicosiltransferasas asociadas a membranas, hasta generar el lípido A-core (Roncero & Casadaban, 1992; Schnaitman & Klena, 1993; Wang & Quinn, 2010). La molécula de LPS se completa en el periplasma, donde el AgO ya polimerizado (Woodward *et al.*, 2010) es ligado al lípido A-core (Whitfield *et al.*, 1997; Abeyrathne *et al.*, 2005). El LPS naciente anclado sobre la cara exterior de la membrana interna es movilizado hacia la cara interior de la membrana externa, desde donde es translocado hacia la cara externa (Bos *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2006; Sperandeo *et al.*, 2007; Sperandeo *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2008; Ruiz *et al.* 2008). Por lo tanto, el LPS está directamente expuesto al medio ambiente, lo que sumado a su gran abundancia y a su calidad de factor de virulencia y MAMP, lo convierte en un elemento fundamental en la interacción patógeno-hospedero. De esta forma, la modificación de su estructura en respuesta a los distintos ambientes que *Salmonella* enfrenta durante su ciclo infectivo es preponderante para la patogénesis de la bacteria.

1.4.- Modificación del lipopolisacárido y su repercusión sobre la patogénesis de *Salmonella*

Además de la gran cantidad de genes que codifican proteínas participantes en la síntesis y transporte del LPS, también existen algunos que codifican proteínas encargadas de la modificación de su estructura, favoreciendo la adaptación de la bacteria a su entorno (Wang & Quinn, 2010). Como ya se mencionó, al interior de su hospedero *Salmonella* debe soportar un pH extremadamente ácido en el estómago; una alta osmolaridad, baja tensión de oxígeno y la presencia de agentes bacteriolíticos en el intestino; y un bajo pH y escasez de cationes divalentes dentro de los macrófagos. También debe evadir y/o resistir los mecanismos inmunitarios durante su diseminación sistémica (Haraga *et al.*, 2008; Hèbrard *et al.*, 2011). La

remodelación estructural del LPS constituye una de las estrategias que la bacteria emplea para sortear dichos desafíos en cada etapa de la infección.

El AgO y la región *core* están involucrados en muchos de los aspectos en que el LPS contribuye a la infección de *Salmonella*. En *S. Typhimurium*, el AgO tiene influencia sobre la colonización intestinal (Nevola *et al.*, 1985), la virulencia en el modelo murino (Miller *et al.*, 1989; Murray *et al.*, 2003) y la resistencia a la actividad citotóxica de neutrófilos humanos (Okamura & Spitznagel, 1982). También el AgO proporciona, de acuerdo a su densidad y longitud de cadena, resistencia a la lisis medida por el sistema del complemento en muchos serovares de *Salmonella* (Grossman *et al.*, 1987; Murray *et al.*, 2003; Murray *et al.*, 2005; Murray *et al.*, 2006; Bravo *et al.*, 2008), ya sea impidiendo su activación por la vía clásica al cubrir el lípido A-*core* (Clas & Loos, 1981) o activando la vía alternativa lejos de la superficie celular, lo que previene la inserción del complejo de ataque de membrana en la membrana externa (Joiner *et al.*, 1982a; Joiner *et al.*, 1982b; Joiner *et al.*, 1986). Puntualizando, en los serovares Typhi, Typhimurium y Enteritidis, la distribución del largo de cadena del OAg es clave para resistir la acción lítica del complemento (Bravo *et al.*, 2008). Las propiedades del AgO pueden ser afectadas por modificaciones covalentes, como ocurre en *S. Typhimurium*, donde la glicosilación del AgO puede potenciar la permanencia de la bacteria en el intestino (Bogomolnaya *et al.*, 2008) y su acetilación evitar su reconocimiento por inmunoglobulinas (Kim & Slauch, 1999). A pesar que el AgO y el *core* sufren muchas transformaciones, la mayoría de las modificaciones del LPS conocidas por alterar la virulencia se producen en el lípido A (**Fig. 3**).

El lípido A, llamado también endotoxina por sus efectos patológicos sobre mamíferos, es el principal componente bioactivo del LPS (Galanos *et al.*, 1985), siendo el motivo mínimo requerido para la activación del Receptor Tipo “Toll” 4 (TLR4), integrante de la familia de receptores TLR que reconocen diferentes MAMPs (Molinero *et al.*, 2014). La vía de señalización del TLR4 conduce a la expresión de muchos genes que codifican efectores inflamatorios mediante la translocación del factor transcripcional NF- κ B al núcleo. Estos genes incluyen los que codifican citoquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleuquina 6 (IL-6) (Takeuchi & Akira, 2010) y la interleuquina 1 β (IL-1 β) (Dinarello, 1991). IL-6 es una citoquina pleiotrópica que, además de sus propiedades pro-inflamatorias canónicas, tiene funciones anti-inflamatorias y regenerativas (Scheller *et al.*, 2011). Es principalmente secretada por macrófagos (monocitos) y en una etapa temprana de la respuesta inmune estimula a macrófagos, neutrófilos y algunos tipos de células T a través de la

unión a un receptor de membrana. En una etapa tardía, la señalización se expande a múltiples tipos celulares, incluyendo algunos no inmunes como células endoteliales, mediante la unión a una versión soluble de su receptor (Rose-John, 2017). En sinergismo con TNF- α e IL-1 β , IL-6 promueve el reclutamiento de neutrófilos hacia tejidos infectados, como característicamente ocurre en el intestino durante la infección por *Salmonella* (McCormick *et al.*, 1995; Scheller *et al.*, 2011).

La opsonización, la lisis por el complemento, la síntesis y secreción de quimioquinas y CAMPs, la inducción de moléculas de adhesión, la migración de células inmunes al sitio de infección y la fagocitosis de microorganismos con su consiguiente degradación en el fagosoma, también son procesos inducidos por la cascada de señalización del TLR4 (Ernst *et al.*, 2001). Todos estos eventos son parte de una respuesta inmunológica orientada a la eliminación del patógeno; sin embargo, ante la circulación de una gran cantidad de LPS se puede producir una reacción inflamatoria exacerbada capaz de causar la muerte del hospedero por shock séptico (Freudenberg *et al.*, 2001; Liu & Malik, 2006).

Como ligando del TLR4, el lípido A puede desarrollar una respuesta agonista o antagonista dependiendo estrictamente de su estructura (Akashi *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 2008; Ohto *et al.*, 2012), en términos del número y distribución de cadenas acilo, el patrón de fosforilación y la presencia de sustituyentes cargados o neutros sobre los fosfatos terminales (Brandenburg, *et al.*, 1993; Seydel *et al.*, 2000).

Algunas bacterias patógenas pueden remodelar su lípido A (**Fig. 3**), incorporando, removiendo o modificando sus grupos fosfato y/o cadenas acilo para producir variantes alternativas que permitan superar los mecanismos inmunológicos del hospedero, como CAMPs o la respuesta inflamatoria activada por el TLR4 (Wang & Quinn, 2010). En *Salmonella* no existen ortólogos conocidos de *lpxE* o *lpxF* de *Francisella* ni de otros genes que codifiquen enzimas que puedan escindir los fosfatos del lípido A (Kong *et al.*, 2012); no obstante, hay enzimas como ArnT o EptA que pueden modificarlos, aminorando la susceptibilidad a CAMPs (Gunn *et al.*, 1998; Trent *et al.*, 2001a; Lee *et al.*, 2004). *Salmonella* también dispone de las enzimas PagP y PagL, que modulan el agonismo del lípido A sobre el TLR4 a través de la incorporación o eliminación de algunas de sus cadenas de ácidos grasos, respectivamente (Trent *et al.*, 2001b; Kawasaki *et al.*, 2004; Kawasaki *et al.*, 2005). La expresión de los genes que codifican muchas de las enzimas implicadas en la modificación del lípido A es controlada por los sistemas de dos componentes PmrA-PmrB y/o PhoP-PhoQ, que están asociados a la regulación de la virulencia bacteriana, entre otras funciones (Miller *et al.*,

1989; Gunn *et al.*, 2000; Gunn, 2008). Estos sistemas se activan en ambientes con una baja concentración de cationes divalentes y pH ligeramente ácido, condiciones a las que típicamente la bacteria está expuesta durante la etapa intracelular de la infección (Alpuche-Aranda *et al.*, 1992; Soncini *et al.*, 1996; Wösten *et al.*, 2000; Needham & Trent, 2013). Por otra parte, hay enzimas que participan en la remodelación del lípido A cuyos genes no son regulados por PhoP-PhoQ o PmrA-PmrB, como LpxR y LpxO. LpxR escinde dos sustituyentes acilos del lípido A, lo que reduce su capacidad de activar el TLR4 (Reynolds *et al.*, 2006; Kawano *et al.*, 2010). Por su parte, LpxO hidroxila una de las cadenas acilo del lípido A (Gibbons *et al.*, 2000; Gibbons *et al.*, 2008). Esta hidroxilación se ha vinculado a una disminución de la permeabilidad de la membrana (Nikaido, 2003; Murata *et al.*, 2007), pero su posible repercusión sobre la interacción del lípido A con el TLR4 no ha sido reportada.

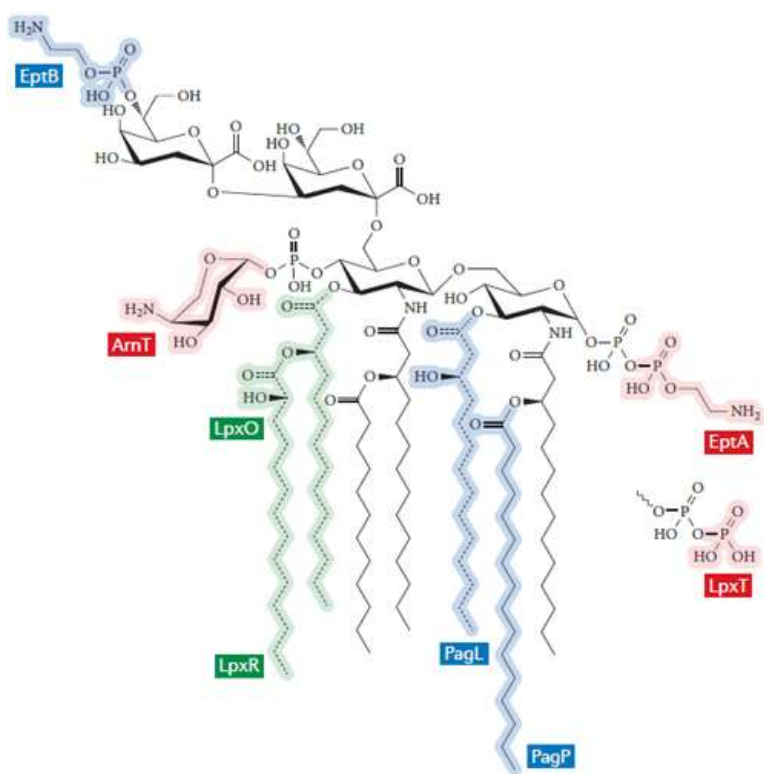


Figura 3. Remodelación de la estructura del lípido A-Kdo₂ de *Salmonella*. En color, se destacan las distintas modificaciones covalentes que puede sufrir el lípido A de *Salmonella* junto con las enzimas que catalizan cada una de ellas. PagL y LpxR remueven respectivamente las acilaciones de las posiciones 3 y 3', mientras que PagP incorpora un grupo palmitato en la posición 2 como una cadena secundaria. La enzima ArnT transfiere un motivo aminoarabinosa (L-Ara4N) al fosfato 4', mientras que el fosfato 1 puede ser fosforilado por LpxT o modificado con un motivo fosfoetanolamina (pEtN) por EptA. El segundo residuo de Kdo también puede recibir un grupo pEtN, pero por acción de la enzima EptB. El carbono 2 de la cadena acilo secundaria de la posición 3' es hidroxilado por la enzima LpxO, formando así el motivo 2-hidroxiiristato. Algunas de las enzimas son controladas por los sistemas de dos

componentes PmrA-PmrB (rojo) o PhoP-PhoQ (azul), mientras que otras son independientes de la regulación de ambos sistemas (verde) Adaptado de Needham & Trent, 2013.

1.5.- Modificación del lípido A por la enzima LpxO

En muchas bacterias Gram negativo, como algunas especies de los géneros *Salmonella*, *Klebsiella*, *Bordetella*, *Pseudomonas* y *Legionella*, entre otros, el lípido A contiene cadenas 2-hidroxiaciladas (Gibbons *et al.*, 2000). En todas estas especies bacterianas existe uno o más

ortólogos del gen *lpxO*, que codifica una proteína de 302 aminoácidos con regiones hidrofóbicas en sus extremos N- y C-terminal, las cuales constituyen dos dominios de transmembrana hipotéticos (Gibbons *et al.*, 2008). LpxO se ubica en la superficie citoplasmática de la membrana interna (Doerrler *et al.*, 2004; Gibbons *et al.*, 2008) y utiliza oxígeno diatómico (O₂) como sustrato y Fe²⁺ y α -cetoglutarato como cofactores para catalizar la hidroxilación del carbono 2 de la cadena secundaria 3'-miristato del lípido A, transformándola en el grupo 2-hidroximiristato (**Fig. 4**) (Gibbons *et al.*, 2000; Gibbons *et al.*, 2008). La presencia de 2-hidroximiristato en el lípido A se ha relacionado con una menor permeabilidad de la membrana externa frente a iones orgánicos (como el anión etidio), lo que se atribuye a la facilidad para establecer enlaces por puente de hidrógeno entre los grupos hidroxilo (OH) (Nikaido, 2003; Murata *et al.*, 2007).

A diferencia de muchas de las otras modificaciones del lípido A, la síntesis de 2-hidroximiristato es independiente del control transcripcional de los sistemas PhoP-PhoQ y PmrA-PmrB. Si bien la expresión de *lpxO* es inducida por una versión de PhoP constitutivamente activa (alelo *pho-24*), una versión equivalente de PmrA no tiene el mismo efecto. Además, en mutantes nulas para *phoP* o *pmrA*, la transcripción del gen *lpxO* permanece en niveles silvestres, siendo suficiente para mantener la biosíntesis de 2-hidroximiristato (Gibbons *et al.*, 2005). Es probable que la inducción de *lpxO* observada en presencia del alelo *pho-24* sea indirecta, pues análisis bioinformáticos no revelan secuencias hipotéticas de unión a PhoP en la región promotora del gen *lpxO* (Fernández *et al.*, 2018). Por otra parte, la hidroxilación del lípido A es dependiente de la disponibilidad de oxígeno, teniendo en aerobiosis una abundancia predominante que decae significativamente en anaerobiosis; sin embargo, la modificación sólo se pierde por completo cuando *lpxO* es deletado (Δ *lpxO*) (Gibbons *et al.*, 2000; Gibbons *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2018). El efecto de la carencia de O₂ sobre la hidroxilación del lípido A trasciende a la simple disponibilidad de éste como sustrato de LpxO, pues los reguladores globales de respuesta a oxígeno Fnr y ArcA se unen a cajas en el promotor de *lpxO*, ejerciendo un control transcripcional directo sobre la expresión del gen en *S. Enteritidis* (Fernández *et al.*, 2018).

En otro nivel de regulación, se ha descrito una proteína periplasmática llamada VisP (*Virulence and Stress-related Periplasmatic Protein*), codificada por el gen *visP* (formalmente *ygiW*), la cual interactúa físicamente con LpxO inhibiendo su catálisis enzimática en *S. Typhimurium*. La delección del gen *visP* en *S. Typhimurium* produce un aumento significativo en la hidroxilación del lípido A, afectando la resistencia a agentes estresores y la

virulencia de la bacteria (Moreira *et al.*, 2013). La mutante $\Delta visP$ de *S. Typhimurium* presenta una menor supervivencia intracelular en macrófagos murinos J774 en comparación a la mutante $\Delta lpxO$ y la mutante doble $\Delta visP \Delta lpxO$, las que igualmente tienen una supervivencia menor respecto a la cepa silvestre. Asimismo, la mutante $\Delta visP$ resulta atenuada tanto en el modelo de colitis como en el de infección sistémica en ratones BALB/c, lo que en menor grado también sucede con la mutante $\Delta lpxO$ y con la mutante doble $\Delta visP \Delta lpxO$ (Moreira *et al.*, 2013). Esta evidencia sugiere que el exceso o la deficiencia de lípido A hidroxilado en referencia al fenotipo silvestre, es perjudicial para la virulencia de *S. Typhimurium* en su interacción con el hospedero. Aunque la supervivencia de las mutantes dentro de macrófagos fue investigada, no se evaluó el potencial que las variantes de lípido A (con y sin 2-hidroximiristato) tienen como endotoxina sobre la activación del TLR4. Al respecto, en *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) se ha observado que la modificación catalizada por LpxO media la resistencia a CAMPs y reduce la respuesta inflamatoria de macrófagos murinos estimulada por el TLR4, ya que mutantes $\Delta lpxO$ inducen una mayor activación de NF- κ B e intensifican la liberación de TNF- α (Llobet *et al.*, 2015). Este último fenómeno no ha sido estudiado en *Salmonella*.

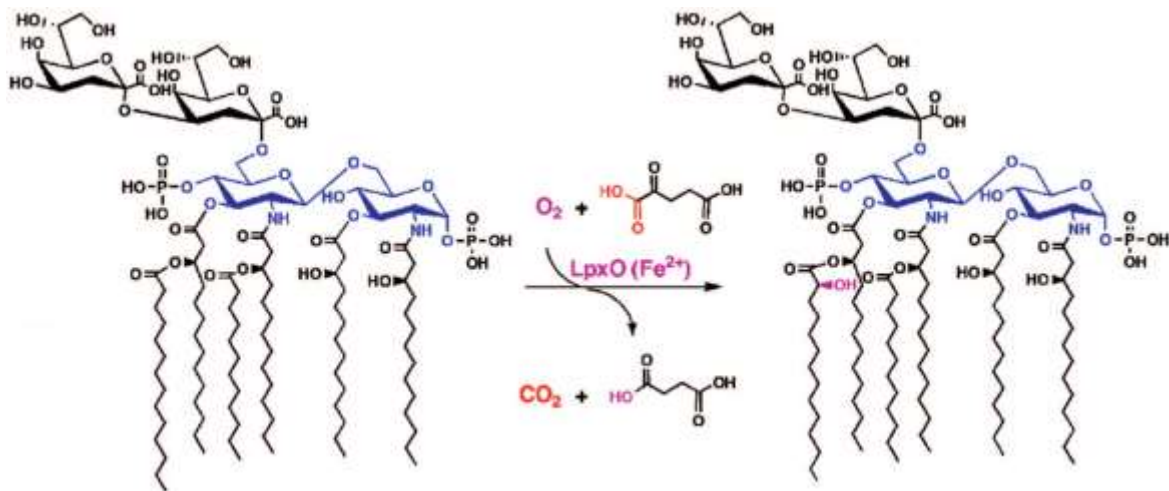


Figura 4. Reacción de hidroxilación catalizada por la enzima LpxO sobre el lípido A de *Salmonella*. Se muestran el sustrato y cofactores empleados por la enzima LpxO para hidroxilar al lípido A en una de sus cadenas acilo, así como los productos derivados de la reacción (ver Sección 1.5).

2.- HIPÓTESIS

El lipopolisacárido es el principal componente de la cara extracelular de la membrana externa en bacterias Gram negativo y corresponde a un importante factor de virulencia. La estructura del LPS, que consta del antígeno O, el *core* de oligosacáridos y el lípido A, es remodelada en virtud de los diferentes microambientes que la bacteria debe enfrentar durante la infección, permitiendo la evasión y/o resistencia a las defensas inmunes del hospedero. Particularmente, la modificación del lípido A por acción de un conjunto de enzimas proporciona resistencia a CAMPs y disminuye la respuesta inflamatoria mediada por la activación del TLR4. La enzima LpxO cataliza la hidroxilación de una de las cadenas acilo del lípido A, produciendo el sustituyente 2-hidroxi-4-cetona. En *S. Typhimurium*, donde la actividad enzimática de LpxO es controlada por la proteína VisP, la falta o exceso de lípido A hidroxilado en relación a la cepa silvestre causa una menor supervivencia intracelular en macrófagos murinos y una atenuación de la bacteria *in vivo*, ya sea en un modelo de colitis o de infección sistémica en ratones. Adicionalmente, la hidroxilación también podría tener un efecto en el agonismo del lípido A sobre el TLR4, como ocurre con otras modificaciones en sus cadenas de ácidos grasos. En ese sentido, recientemente se ha reportado que cepas de *K. pneumoniae* con un lípido A no hidroxilado experimentan una susceptibilidad exacerbada hacia CAMPs e inducen una mayor activación del TLR4. El potencial inflamatorio que tiene el lípido A, dependiendo de su grado de hidroxilación, se ha descrito para *K. pneumoniae*, donde mutantes con un lípido A sin hidroxilar estimulan una respuesta inflamatoria acentuada *in vitro* e *in vivo* en un modelo murino. Sin embargo, hasta la fecha este fenómeno todavía no se ha estudiado en el género *Salmonella*. En base a los antecedentes mencionados, se formula la siguiente hipótesis:

“La modificación covalente 2-hidroxi-4-cetona del lípido A de *Salmonella* Enteritidis favorece la internalización y supervivencia intracelular e induce una menor secreción de citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos murinos, conduciendo a una mayor virulencia de la bacteria *in vivo* en ratones”

3.- OBJETIVO GENERAL

Determinar que el motivo 2-hidroximiristato del lípido A contribuye a la virulencia de *Salmonella* Enteritidis durante la infección en ratones, al favorecer su internalización y supervivencia intracelular en macrófagos murinos, junto con mitigar la secreción de citoquinas pro-inflamatorias inducida por la bacteria.

4.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar si la modificación 2-hidroximiristato del lípido A de *Salmonella* Enteritidis tiene un efecto sobre la internalización y supervivencia intracelular de la bacteria en macrófagos murinos.

La internalización y supervivencia intracelular de *S. Enteritidis* en macrófagos murinos RAW264.7, se evaluará mediante un ensayo de protección a gentamicina con la cepa silvestre, la mutante $\Delta lpxO$ y la mutante complementada en *trans*, realizando un recuento bacteriano a distintos tiempos de infección.

2. Determinar cómo impacta el motivo 2-hidroximiristato sobre la capacidad del lípido A de *Salmonella* Enteritidis para estimular la secreción de citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos murinos.

La inmunogenicidad del lípido A de *S. Enteritidis* se estudiará en función de la secreción de IL-6 como marcador pro-inflamatorio en el sobrenadante de cultivo de macrófagos murinos RAW264.7 infectados con la cepa silvestre y las mutantes $\Delta visP$ y $\Delta lpxO$. IL-6 induce el reclutamiento e infiltración de PMN, un evento característico de la gastroenteritis causada por *Salmonella* (McCormick *et al.*, 1995).

3. Evaluar si la modificación 2-hidroximiristato del lípido A ejerce una influencia sobre la virulencia de *Salmonella* Enteritidis *in vivo* en un modelo murino de infección.

La virulencia de *S. Enteritidis in vivo*, en función de su capacidad para colonizar el intestino y órganos internos (bazo e hígado), se medirá a través de la recuperación de la bacteria desde dichos tejidos en un ensayo de infección simple en un modelo murino de colitis, desarrollado en ratones C57BL/6 tratados con estreptomicina e inoculados por vía oral con la cepa silvestre, la mutante $\Delta lpxO$ y la mutante complementada en *trans*.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Reactivos

A continuación se señalan los proveedores y los insumos adquiridos desde cada uno para el desarrollo de esta tesis.

BIOTIUM (CA, EEUU): Tinción fluorescente para ácido nucleicos GelRed™.

Becton, Dickinson and Company (MD, EEUU): Bacto-Agar.

Biological Industries (CT, EEUU): Mezcla tripsina-EDTA 10x y suero fetal bovino (FBS).

Corning Inc. (NY, EEUU): Medio DMEM 1x y tampón fosfato salino (PBS) 1x.

Difco Laboratories (MI, EEUU): Triptona y extracto de levadura.

IDT (IO, EEUU): Oligonucleótidos partidores para PCR y mutagénesis.

Invitrogen Life Technologies (CA, EEUU): DNA polimerasa *Taq*, acrilamida, N, N'-metilenbisacrilamida ultrapura, agarosa ultrapura, TRIzol y proteinasa K.

Gibco (NY, EEUU): Colorante azul de tripán.

Merck (NJ, EEUU): Cloruro de sodio (NaCl), sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \times 7H_2O$), ácido cítrico monohidratado, acetato de sodio ($NaCH_3COO$), fosfato de amonio y sodio tetrahidratado ($NH_4NaHPO_4 \times 4H_2O$), glucosa, cloroformo ($CHCl_3$), cloruro de potasio (KCl), cloruro de magnesio hexahidratado ($MgCl_2 \times 6H_2O$), glicerol, ácido clorhídrico fumante (HCl), isopropanol, ácido acético glacial (CH_3COOH), meta-peryodato de sodio ($NaIO_4$), hidróxido de sodio (NaOH), amoníaco 25% (NH_3), nitrato de plata ($AgNO_3$), formaldehído, etanol absoluto, fosfato monoácido de potasio trihidratado ($K_2HPO_4 \times 3H_2O$), metanol, solución amortiguadora TAE 50x y filtros Millipore de 0,22 μm .

New England Biolabs (Ipswich, MA, EEUU): Estándares de peso molecular de DNA de 100 pb y 1 Kb para electroforesis de ácidos nucleicos.

Promega (WI, EEUU): “*GoTaq Green Master Mix*”, desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) para PCR.

Qiagen (CA, EEUU): El sistema comercial para purificación de productos de PCR “*QIAquick PCR Purification Kit*” y el sistema comercial para extracción de DNA plasmidial “*QIAprep Spin Miniprep kit*”.

R&D Systems Inc. (MN, EEUU): El sistema comercial “*Mouse IL-6 DuoSet® ELISA*”, microplacas de 96 pocillos y solución de sustrato para inmunoensayo con detección enzimática.

Sigma Chemical Co. (MO, EEUU): kanamicina (Kan), ampicilina (Amp), gentamicina (Gm), arabinosa, azul de bromofenol, xilencianol, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ribonucleasa A y sistema comercial de extracción de DNA genómico “*GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit*”.

US Biological (Swampscott, MA, EEUU): Dodecilsulfato de sodio (SDS), Tris base y tricina.

Thermo Scientific (HyClone). (IL, EEUU): Solución antibiótica/antimicótica 100x y los sistemas comerciales para clonamiento “*pBAD TOPO™ TA Expression Kit*” y “*One Shot™ TOP10 Chemically Competent E. coli*”.

5.2.- Cepas bacterianas

Todas las cepas bacterianas utilizadas durante el desarrollo de esta tesis se resumen en la **Tabla 1**.

5.3.- Plasmidios

Los distintos plasmidios usados durante el desarrollo de esta tesis se señalan a continuación (**Tabla 2**).

Tabla 1. Cepas bacterianas.

Salmonella enterica serovar Typhi		
Cepa	Genotipo/Fenotipo Relevante	Origen
STH2370	Cepa silvestre	Stock laboratorio
Salmonella enterica serovar Enteritidis		
Cepa	Genotipo/Fenotipo Relevante	Origen
NCTC13349	Cepa silvestre	Stock laboratorio
$\Delta lpxO$	$\Delta lpxO::FRT$	Este trabajo
pBAD-TOPO	pBAD-TOPO (Amp ^R). Cepa silvestre transformada con el vector vacío.	Este trabajo
$\Delta lpxO/pBAD-TOPO$	$\Delta lpxO::FRT/pBAD-TOPO$ (Amp ^R). Cepa $\Delta lpxO$ transformada con el vector vacío.	Este trabajo
$\Delta lpxO/pBAD::lpxO$	$\Delta lpxO::FRT/pBAD::lpxO$ (Amp ^R). Cepa $\Delta lpxO$ transformada con el gen <i>lpxO</i> silvestre de S. Enteritidis NCTC 13349, clonado en el vector pBAD-TOPO.	Este trabajo
$\Delta phoN$	$\Delta phoN::aph$ (Kan ^R)	Este trabajo
$\Delta lpxO \Delta phoN$	$\Delta lpxO::FRT \Delta phoN::aph$ (Kan ^R)	Este trabajo
$\Delta phoN/pBAD-TOPO$	$\Delta phoN::aph$ (Kan ^R)/pBAD-TOPO (Amp ^R)	Este trabajo
$\Delta lpxO \Delta phoN/pBAD-TOPO$	$\Delta lpxO::FRT \Delta phoN::aph$ (Kan ^R)/pBAD-TOPO (Amp ^R)	Este trabajo
$\Delta lpxO \Delta phoN/pBAD::lpxO$	$\Delta lpxO::FRT \Delta phoN::aph$ (Kan ^R)/pBAD::lpxO (Amp ^R)	Este trabajo
$\Delta visP$	$\Delta visP::FRT$	Este trabajo
Escherichia coli		
Cepa	Genotipo/Fenotipo Relevante	Origen
BW25113/pKD46	$\Delta(araD-araB)567 \Delta lacZ4787 lacI p-4000(lacIQ) \lambda-poS396(Am) rph-1 \Delta(rhaD-rhaB)568 rrmB-3 hsdR514/pKD46$. Cepa portadora del plasmidio pKD46	Stock laboratorio
DH5 α /pCP20	F-phi80 <i>lacZM15 endA recA hsdR(r_K m_K κ) supE thi gyrA relA $\Delta(lacZYA-argF)U169/pCP20$. Cepa portadora del plasmidio pCP20</i>	Stock laboratorio
DH5 α λ <i>pir</i> /pCLF4	<i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA relA1 $\Delta(lac-argF)U169 deoR$ phi80 $\Delta(lac)M15 \lambda$ <i>pir</i>/pCLF4</i> . Cepa portadora del plasmidio pCLF4	Stock laboratorio

Tabla 2. Listado de plasmidios.

Plasmidio	Descripción	Origen
pKD46	<i>bla P_{BAD} gam bet exo oriRpSC101(TS)</i> , Amp ^R (GenBank AY048746)	Datsenko & Wanner, 2000
pCP20	<i>bla cat cl857 I_{PR} flp pSC101 oriTS</i> , Amp ^R , Cam ^R	Datsenko & Wanner, 2000
pCLF4	<i>bla FRT aph FRT PS1 PS2 oriR6K</i> , Amp ^R , Kan ^R , promotor T7 (GenBank EU629214)	Santiviago <i>et al.</i> , 2009
pBAD-TOPO	Vector comercial de expresión, Amp ^R	Thermo Scientific
pBAD::lpxO	Vector pBAD-TOPO con el gen silvestre <i>lpxO</i> de S. Enteritidis NCTC13349 clonado, Amp ^R	Este trabajo

5.4.- Partidores

Los oligonucleótidos partidores empleados para PCR y mutagénesis durante el desarrollo de tesis se presentan a continuación (**Tabla 3**).

Tabla 3. Oligonucleótidos partidores para PCR y mutagénesis.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Origen
lpxOH1P1	AAGGACAGTGACGTTATGTTTCGCAGCAATCATTATCGGTAGTGCAGGCTGGAGCTGCTTC	Fernández
lpxOH2P2	TACCGCGGCCCGGCTTCAGAGGAGGCTGAAAAGGATTATCCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>et al.</i> , 2018
lpxO Out5	TTTCATCTCCATCATGCCAA	Fernández
lpxO Out3	CGGATGGATAGACTCAAGGC	<i>et al.</i> , 2018
visPH1P1	TTACGGATTCACCTTTACGAATCTGTTTTACGTCGATTTTCGGTGCAGGCTGGAGCTGCTTC	Este
visPH2P2	ATGAAAAAATTAGCTGCAATCGTTGCCGTTATGGCACTGTCCATATGAATATCCTCCTTAG	trabajo
visPOUT-F	CGCTCCAGACGGTAAACTGC	Este
visPOUT-R	CGCAGGCGATGTACAGAAAA	trabajo
pBAD-FP	ATGCCATAGCATTTCATCC	Thermo
pBAD-RP	CCTGATACAGATTAATC	Scientific

Los segmentos subrayados en la secuencia de algunos partidores corresponden a las secuencias que hibridan con las regiones P1 y P2 presentes en el plasmidio pCLF4.

5.5.- Medios y condiciones de cultivo bacteriano

Las cepas bacterianas se propagaron rutinariamente a 37°C en medio Luria-Bertani (LB; extracto de levadura 10 g/L, triptona 5 g/L, NaCl 10 g/L), suplementado con Bacto-Agar 15 g/L como gelificante. Los inóculos para los distintos ensayos experimentales se prepararon en caldo LB y se incubaron con agitación a la misma temperatura. Cuando se requirió, el medio LB se suplementó con los antibióticos ampicilina (Amp; 100 µg/mL) o kanamicina (Kan; 75 µg/mL) para seleccionar y/o propagar bacterias transformantes o mutantes. Los inóculos cuya biomasa se destinó a la extracción de LPS y purificación de lípido A se cultivaron en medio mínimo E (MgSO₄×7H₂O 0,2 g/L, ácido cítrico monohidratado 2 g/L, K₂HPO₄×3H₂O 10 g/L y NaNH₄HPO₄×4H₂O 3,5 g/L) suplementado con glucosa 0,2% e incubados a 37°C con agitación orbital vigorosa, para asegurar su oxigenación.

5.6.- Líneas celulares eucariontes

Las líneas celulares eucariontes utilizadas en esta tesis se especifican a continuación (**Tabla 4**).

Tabla 4. Líneas celulares eucariontes.

Línea Celular	Descripción	Origen
Macrófagos RAW264.7	Línea de macrófagos murinos adherentes, derivada de un tumor inducido por la infección del virus de la Leucemia Murina de Abelson en ratones BALB/c.	European Collection of Cell Cultures (ECACC)

5.7.- Medios y condiciones de cultivo de células eucariontes

Macrófagos murinos RAW264.7 conservados a -80°C se cultivaron inicialmente en botellas de cultivo celular de 25 cm^2 con medio DMEM, suplementado con suero fetal bovino (FBS) 20% y solución antibiótica/antimicótica 1x. Cuando los macrófagos alcanzaron una confluencia de 90–100%, se transfirieron a botellas de cultivo celular de 75 cm^2 , donde se subcultivaron rutinariamente en medio DMEM suplementado con FBS 10% hasta el traspaso N° 25. La incubación de las células se efectuó a 37°C en una atmósfera controlada con una presión parcial de CO_2 de 5% (v/v). El traspaso de los macrófagos se realizó por desprendimiento enzimático mediante un tratamiento de 10 min con tripsina 25% en PBS 1x, previo a lo cual se eliminan las células en suspensión mediante 3 lavados con PBS. La concentración de macrófagos en cultivo se determinó mediante tinción con azul de tripán y recuento en cámara de Neubauer.

5.8.- Extracción de DNA genómico bacteriano

El DNA genómico de *S. Enteritidis* NCTC13349 (**Tabla 1**), se extrajo empleando el sistema comercial “*GenElute Bacterial Genomic DNA Kit*” de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La cepa se cultivó en caldo LB a 37°C con agitación durante 24 h. La elución final del DNA se hizo en $100\ \mu\text{L}$ de H_2O libre de nucleasas y luego se almacenó a -20°C hasta su uso.

5.9.- Construcción de mutantes de *S. Enteritidis* NCTC13349 por el método *Red-swap*

Las mutantes con deleciones en genes específicos derivadas del fondo genético de *S. Enteritidis* NCTC13349 se construyeron mediante el método de intercambio alélico por recombinación homóloga de productos PCR dependiente de la recombinasa Red del fago λ (*Red-Swap*), según lo descrito en la literatura (Datsenko & Wanner, 2000), con ciertas adaptaciones (Santiviago *et al.*, 2009).

5.9.1.- Extracción de DNA plasmidial

Los plasmidios pKD46, pCP20 y pCLF4 (**Tabla 2**), se extrajeron desde sus respectivas cepas portadoras (**Tabla 1**) usando el sistema comercial “*QIAprep Spin Miniprep kit*”, según el protocolo del fabricante. Para ello, las cepas se cultivaron en caldo LB suplementado con Amp (pKD46 y pCP20) o con Kan (pCLF4) e incubaron durante 24 h con agitación a 30°C (pKD46 y pCP20) o 37°C (pCLF4). En la etapa final de la extracción, el DNA plasmidial se eluyó en 50 µL de H₂O libre de nucleasas y luego se almacenó a 4°C hasta su uso.

5.9.2.- Obtención de productos PCR para mutagénesis

Se utilizaron partidores de 60 nucleótidos (nombrados con la notación H1P1 y H2P2) (**Tabla 3**), los cuales en su extremo 5' contienen 40 nucleótidos idénticos a las regiones que flanquean al gen blanco. Por otro lado, en su extremo 3' los partidores tienen 20 nucleótidos que hibridan con el extremo 5' o 3' del *cassette* de resistencia a antibiótico del plasmidio pCLF4. Dentro del *cassette* y flanqueado por los sitios FRT (*Flp recombinase target sequence*) está contenido el gen *aph*, que codifica la enzima aminoglicósido 3' fosfotransferasa que confiere resistencia a Kan. A partir del plasmidio pCLF4 purificado, el *cassette* de resistencia a Kan se amplificó por PCR en las siguientes condiciones:

Mezcla de Reacción PCR			Programa de Termociclador		
Reactivo	Volumen (µL)	Concentración	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Tampón PCR 5x	20	1x	94°C	5 min	1
MgCl ₂ [25 mM]	6	1,5 mM	94°C	30 seg	30
dNTPs 10x [10 mM]	2	0,2 mM	55°C	30 seg	
Partidor H1P1 [10 µM]	1	0,2 µM	72°C	2 min	
Partidor H2P2 [10 µM]	1	0,2 µM	72°C	7 min	1
DNA (pCLF4)	1	-	4°C	∞	-
Taq DNA polimerasa [5 U/µL]	0,5	1,5 U/Rx			
H ₂ O libre de nucleasas	68,5	-			
Volumen final		100 µL			

El fragmento amplificado se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE 1x y tinción con GelRed. La corrida electroforética se efectuó a 100 V durante 30 min. Una vez que se verificó su tamaño (~1500 pb), el amplicón se purificó mediante el sistema comercial “*QIAquick PCR Purification Kit*”, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

5.9.3.- Preparación de bacterias electrocompetentes y transformación bacteriana

Un cultivo de *S. Enteritidis* NCTC13349 (**Tabla 1**), crecido en caldo LB a 37°C con agitación durante 24 h, se subcultivó en dilución 1:100 en 20 mL de caldo LB fresco y se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0,4–0,6. A fin de obtener bacterias electrocompetentes, toda la biomasa del cultivo se sedimentó por centrifugación a 3.420 x g a 4°C durante 10 min y se sometió a 3 lavados consecutivos con 30 mL de glicerol 15% frío, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento cada vez. Finalmente, el sedimento bacteriano se resuspendió en 1 mL de glicerol 15% frío.

S. Enteritidis NCTC13349 se transformó por electroporación con el plasmidio pKD46 (**Tabla 2**), mediante la aplicación de un pulso de 1.8 KV (electroporador “*E. coli Pulser*” BioRad) a una mezcla de 98 µL de la suspensión de bacterias electrocompetentes y 2 µL del plasmidio purificado, la cual previamente se había incubado en hielo durante 5 min. pKD46 es un plasmidio termosensible que tiene los genes que codifican las subunidades de la recombinasa Red del fago λ bajo un promotor inducible por arabinosa (*P_{araBAD}*) (Datsenko & Wanner, 2000).

Inmediatamente después de la electroporación, la suspensión de bacterias se recuperó agregando 900 µL de caldo LB fresco e incubando a 30°C con agitación durante 60 min. Por último, las bacterias se sembraron sobre agar LB suplementado con Amp y se incubaron a 30°C durante 24 h para seleccionar colonias transformantes.

5.9.4.- Mutagénesis por intercambio alélico de productos PCR

Las colonias de *S. Enteritidis* NCTC13349 transformadas con el plasmidio pKD46 se cultivaron en caldo LB suplementado con Amp a 30°C con agitación durante 24 h. Las bacterias se subcultivaron a razón 1:100 en 20 mL de caldo LB fresco suplementado con Amp y se incubaron con agitación a la misma temperatura hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0,4–0,6. En ese momento, se adicionó L-arabinosa a una concentración final de 10 mM para inducir la expresión del sistema de recombinación λ-Red, codificado en el plasmidio. Después de una incubación de 60 min a 30°C con agitación, se prepararon bacterias electrocompetentes (ver **Sección 5.9.3**).

Un volumen de 80 µL de la suspensión de bacterias electrocompetentes se mezcló con 20 µL de producto PCR (Kan^R) purificado. La mezcla se incubó durante 5 min en hielo y

luego la transformación se realizó por electroporación aplicando un pulso de 1.8 KV. Las bacterias se recuperaron inmediatamente en 1 mL de LB fresco incubando a 37°C (temperatura de restricción para el plasmidio pKD46) con agitación durante 60 min. Las colonias mutantes se seleccionaron sembrando en agar LB suplementado con Kan e incubando a 37°C durante 24 h.

5.9.5.- Comprobación de las colonias mutantes por PCR

El reemplazo alélico en cada mutante se verificó mediante PCR de colonias utilizando partidores que hibridan en regiones externas, río arriba y río abajo, respecto del sitio de reemplazo (**Tabla 3**). Como DNA molde, se usó una suspensión de una colonia mutante en 30 µL de H₂O libre de nucleasas estéril. La amplificación se realizó según el siguiente protocolo:

Mezcla de Reacción PCR			Programa de Termociclador		
Reactivo	Volumen (µL)	Concentración	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Tampón PCR 5x	5	1x	94°C	3 min	1
MgCl ₂ [25 mM]	2	2 mM	94°C	30 seg	30
dNTPs 10x [10 mM]	0,5	0,2 mM	55°C	30 seg	
Partidor Out5 [10 µM]	0,5	0,2 µM	72°C	2 min	
Partidor Out3 [10 µM]	0,5	0,2 µM	72°C	10 min	1
DNA (suspensión bacteriana)	1	-	4°C	∞	-
GoTaq DNA polimerasa [5 U/µL]	0,2	1 U/Rx			
H ₂ O libre de nucleasas	15,3	-			
Volumen final		25 µL			

La amplificación del fragmento se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE 1x y tinción de GelRed. La corrida electroforética se efectuó a 100 V durante 30 min.

5.9.6.- Eliminación del *cassette* de resistencia a antibiótico

Las colonias en las que se confirmó el reemplazo alélico, se sometieron a una serie de aislamientos en agar LB en ausencia de Amp y en presencia de Kan a temperatura restrictiva (37°C) para el plasmidio pKD46. En un último aislamiento, las colonias se sembraron paralelamente en agar LB suplementado con Amp y LB sin suplementar, a fin de verificar la pérdida del plasmidio a través de la recuperación de la sensibilidad de las bacterias al antibiótico. Posteriormente, las mutantes se transformaron por electroporación (ver **Sección**

5.9.3) con el plasmidio termosensible pCP20 (**Tabla 2**) que codifica la recombinasa Flp. Esta recombinasa escinde por recombinación el gen de resistencia a antibiótico flanqueado por los sitios FRT, dejando como remanente una copia única del sitio FRT en el cromosoma (Datsenko y Wanner, 2000). Las transformantes se seleccionaron sembrando en agar LB suplementado con Amp e incubación a 30°C durante 24 h. Luego, se escogieron ~30 colonias para incubación a 37°C (temperatura restrictiva para el plasmidio pCP20 que induce la expresión de la recombinasa Flp) en agar LB con y sin Kan, repitiendo el proceso hasta que sólo se presentara crecimiento en el medio sin el antibiótico. La escisión del gen de resistencia a antibiótico se comprobó por PCR de las colonias crecidas en agar LB sin antibiótico, analizando los fragmentos amplificados por electroforesis (ver **Sección 5.9.5**). Finalmente, las mutantes comprobadas por PCR se cultivaron sucesivamente en agar LB suplementado y no suplementado con Amp a 37°C, verificando la pérdida del plasmidio pCP20 al recuperar colonias sensibles al antibiótico.

5.10.- Transducción de alelos mutantes en *S. Enteritidis* NCTC13349

A fin de eliminar cualquier mutación secundaria que pudiera haberse generado durante la mutagénesis, el alelo mutante se movilizó mediante transducción generalizada desde el cromosoma de cada mutante generada hacia el fondo genético silvestre de *S. Enteritidis* NCTC13349 utilizando el bacteriófago P22 HT 105-1 *int*-201 (Maloy, 1990).

5.10.1.- Preparación del lisado de partículas transductoras

Cada cepa mutante se cultivó en caldo LB suplementado con Kan a 37°C durante 24 h. Una mezcla de 200 µL del cultivo bacteriano y 1 mL de caldo de fago P22 (100 mL de caldo LB suplementado con 0,1 mL de un lisado concentrado de fago P22 HT 105-1 *int*-201 y 2 mL de medio mínimo E 50x), se incubó a 37°C con agitación durante 8–16 h para permitir la infección de la cepa dadora. El sobrenadante de cultivo se esterilizó por adición de 100 µL de cloroformo y agitación vigorosa en vórtex, seguido de lo cual se centrifugó a 18.300 x g durante 1 min a temperatura ambiente. Al sobrenadante recuperado se le agregó 50 µL de cloroformo y se almacenó como lisado a 4°C para su uso posterior.

5.10.2.- Transducción

S. Enteritidis NCTC13349 se cultivó en caldo LB a 37°C con agitación durante 24 h. La transducción se realizó mezclando 200 µL del cultivo de la cepa receptora con 20 µL del lisado de fago P22 obtenido a partir de una cepa mutante. La mezcla se incubó a 37°C durante 30 min sin agitación para permitir la adsorción de las partículas transductantes y luego se centrifugó a 18.300 x g. El sedimento se resuspendió en 200 µL de caldo LB fresco y se incubó a 37° con agitación por 20 min para permitir la expresión fenotípica de la resistencia a Kan codificada por el alelo mutante transducido. Las colonias transductantes se seleccionaron sembrando en agar LB suplementado con Kan e incubando a 37°C por 24 h. En las mismas condiciones también se sembraron e incubaron los controles negativos de transducción, uno sin lisado de fago P22 (100 µL del cultivo de la cepa receptora) y otro sin bacterias receptoras (10 µL del lisado P22 más 90 µL de caldo LB).

5.10.3.- Comprobación y selección de transductantes

La correcta movilización del alelo mutante por transducción se comprobó mediante PCR de colonias (ver **Sección 5.9.5**) escogidas aleatoriamente entre los clones resistentes a Kan. Con el propósito de remover la posible contaminación con partículas remanentes del fago P22, las transductantes comprobadas por PCR se aislaron repetidamente en agar EBU (agar LB suplementado con K₂HPO₄ 2.5 g/L, azul de Evans 12.5 mg/L, uranina 25 mg/L y glucosa 2 g/L) suplementado con Kan hasta obtener colonias sin evidencia de lisis a causa de la infección por el fago P22 (colonias blancas). La ausencia del fago P22 en las transductantes aisladas se verificó evaluando su sensibilidad al bacteriófago lítico P22 H5 mediante un ensayo de *cross streaking*. En este ensayo, las colonias a analizar se sembraron cruzando en forma perpendicular una línea trazada con 50 µL de lisado del fago P22 H5 sobre la superficie de una placa de agar EBU suplementado con Kan, la cual fue incubada a 37°C durante 24 h. Finalmente, se seleccionaron y respaldaron aquellas transductantes libres de fago P22, las que fueron identificadas al resultar interrumpido su crecimiento en presencia del fago P22 H5.

5.11.- Complementación en *trans* de la mutante $\Delta lpxO$ de *S. Enteritidis* NCTC13349

Para complementar en *trans* el fenotipo de la mutante $\Delta lpxO$, se usó el sistema comercial “*pBAD TOPOTM TA Expression Kit*”, que incluye el vector de expresión pBAD-TOPO (**Tabla 2**) en el cual se clonó una copia silvestre del gen *lpxO*. El vector pBAD-TOPO confiere resistencia a Amp y contiene el promotor *P_{araBAD}* (inducible por L-arabinosa) río arriba del sitio de clonamiento

El alelo silvestre del gen *lpxO* se amplificó por PCR (ver **Sección 5.9.2**) a partir de DNA genómico de *S. Enteritidis* NCTC13349 (ver **Sección 5.8**). Para la amplificación se usaron los partidores *lpxO* Out5 y *lpxO* Out3 (**Tabla 3**) que hibridan en sitios externos de *lpxO*, incluyendo su región promotora. El fragmento amplificado se confirmó por electroforesis (ver **Sección 5.9.2**), se purificó mediante el sistema “*QIAquick PCR Purification Kit*” y se clonó en pBAD-TOPO de acuerdo con el protocolo del fabricante, generando el plasmidio pBAD::*lpxO* (**Tabla 2**), el cual se usó para transformar una cepa comercial quimiocompetente de *E. coli* (“*One ShotTM TOP10 Chemically Competent E. coli*”), según las indicaciones del fabricante. Las bacterias transformantes se seleccionaron sembrando en agar LB suplementado con Amp e incubando a 37°C durante 24 h, luego de lo cual la presencia del plasmidio en las colonias se verificó por PCR (ver **Sección 5.9.5**). Considerando que el vector pBAD-TOPO es provisto como una molécula lineal, la reacción de ligación durante el clonamiento puede originar plasmidios en que el gen de interés se haya insertado a favor o en contra del sentido del promotor *P_{araBAD}*. La orientación del inserto se determinó por PCR utilizando la pareja de partidores *lpxO* Out5/pBAD-FP (**Tabla 3**), que únicamente produce un amplicón de ~1700 pb si el gen *lpxO* está orientado a favor del promotor inducible. Algunas de las transformantes de *E. coli*, con una amplificación positiva en el PCR de colonia, se cultivaron en caldo LB suplementado con Amp a 37°C durante 24 h para la extracción del plasmidio pBAD::*lpxO* (ver **Sección 5.9.1**).

Para los ensayos de complementación, la mutante $\Delta lpxO$ se transformó por electroporación (ver **Sección 5.9.3**) con el plasmidio pBAD::*lpxO*. Las transformantes se seleccionaron sembrando en agar LB suplementado con Amp e incubando a 37°C por 24 h, a continuación de lo cual las colonias transformantes se confirmaron por PCR (ver **Sección 5.9.5**) empleando los partidores *lpxO* Out5 y pBAD-FP. La cepa silvestre y la mutante $\Delta lpxO$ de *S. Enteritidis* (**Tabla 1**), se transformaron con el vector pBAD-TOPO circularizado vacío para obtener controles de complementación.

5.12.- Extracción de LPS y purificación de lípido A de cepas derivadas de *S. Enteritidis* NCTC13349

El LPS y el lípido A de las diferentes cepas *S. Enteritidis* se obtuvo mediante un procedimiento de purificación de múltiples etapas, adaptado de metodologías descritas en la literatura (Yi & Hackett, 2000; Caroff & Novikov, 2011) (**Fig. 5**).

Las bacterias, cultivadas en caldo LB a 37°C con agitación durante 24 h, se inocularon a razón 1:100 en 50 mL de medio mínimo E suplementado con glucosa 0.2% y se incubaron a 37°C con agitación vigorosa. Cuando el cultivo alcanzó una OD_{600nm} de 0,4–0,6 la biomasa se sedimentó por centrifugación a 3.420 x g a 4°C durante 10 min. El sedimento se lisó por solubilización en TRIzol en 1/25 del volumen de cultivo. El lisado se mezcló vigorosamente por vórtex con 1/4 de volumen de cloroformo (CHCl₃) y se incubó a temperatura ambiente por 15–30 min. La emulsión se centrifugó a 3.420 x g durante 10 min a temperatura ambiente y se recolectó la fase acuosa (capa superior) que retiene los componentes celulares con mayor polaridad, entre ellos el LPS. La fase orgánica se sometió a una reextracción con 1 mL de H₂O ultrapura para recuperar el LPS remanente. La fase acuosa se sublimó por liofilización a -48°C y 0.121 mBar durante 24 h. El producto liofilizado se resuspendió en una solución fría de MgCl₂ 0.375 M en EtOH 95% para facilitar la precipitación del LPS por centrifugación a 3.280 x g a 4°C por 10 min. El precipitado se lavó tres veces con EtOH 95% frío y una vez con EtOH 100% frío, centrifugando a 3.280 x g a 4°C durante 5 min cada vez. El precipitado se secó invirtiendo el tubo durante 1–5 min y después se sometió a la extracción Folch, la cual elimina impurezas de la preparación, como fosfolípidos y SDS residuales, que podrían interferir con la posterior hidrólisis del lípido A. Así, el precipitado seco se resuspendió en 1 mL de una mezcla CHCl₃/MetOH 2:1 (reactivo de Folch) y se centrifugó a 11.000 x g a 4°C durante 5 min, descartando cuidadosamente el sobrenadante. La etapa de extracción anterior se repitió una vez y el precipitado se secó a temperatura ambiente durante 24 h para permitir la volatilización de los residuos de solventes orgánicos.

El precipitado seco, correspondiente a LPS purificado, se separó en dos fracciones; la más pequeña se analizó mediante electroforesis en geles desnaturalantes de poliacrilamida al 12% en sistema amortiguador Tris-tricina (Tris-tricina SDS-PAGE; ver **Sección 5.13**), con el objeto de verificar la integridad del LPS obtenido. La fracción restante de LPS se sometió a una hidrólisis química en medio ácido para escindir el AgO polimérico y el *core* de oligosacáridos, liberando el lípido A. Para esto, el precipitado se resuspendió en acetato de

sodio 10 mM pH 4.5 SDS 1% y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min y luego a 200°C durante 2 h. La solución se liofilizó a -48°C y 0.121 mBar por 24 h. El producto liofilizado se resuspendió en EtOH acidificado (HCl 4 N en EtOH 95% 1:200) y se lavó tres veces con EtOH 95%, centrifugando cada vez a 3.280 x g durante 5 min a 4°C. El sedimento se secó invirtiendo el tubo durante 1–5 min y se sometió a la extracción Bligh-Dyer para remover restos de LPS no hidrolizado, resuspendiendo en una solución de CHCl₃/MetOH/H₂O ultrapura (1:1:0.9) e incubando por 5 min a temperatura ambiente. La fase orgánica (capa inferior), en la que está contenido el lípido A, se recuperó luego de centrifugar a 2.110 x g durante 5 min. Los solventes orgánicos se eliminaron por evaporación a temperatura ambiente durante 24 h, originándose un precipitado de lípido A, en el cual la ausencia de LPS no hidrolizado se analizó cualitativamente mediante Tris-tricina SDS-PAGE (ver **Sección 5.13**).

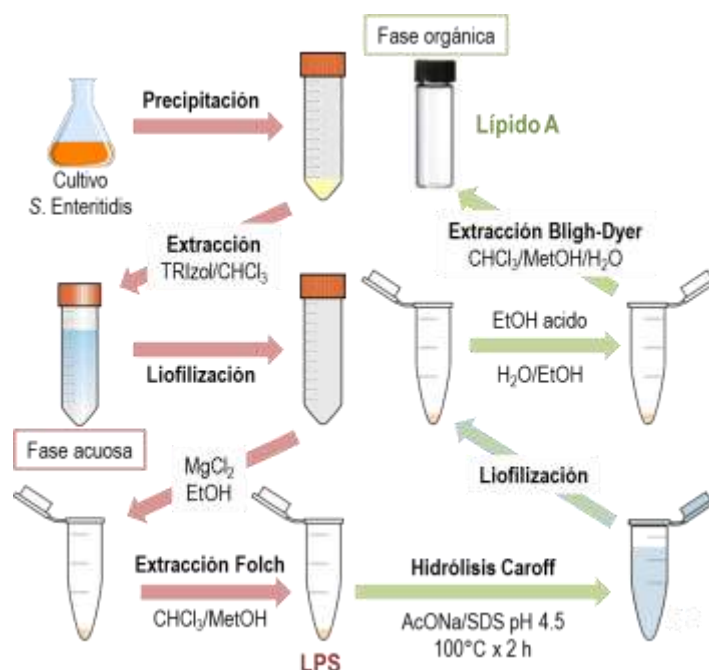


Figura 5. Extracción de LPS y purificación de lípido A. La biomasa de bacterias, obtenida por centrifugación desde los cultivos de *S. Enteritidis*, se sometió a un proceso de extracción fenólica para separar al LPS del resto de los componentes celulares (flechas en rojo). A continuación, el extracto enriquecido en LPS íntegro se hidrolizó químicamente a alta temperatura para remover el AgO y el core de oligosacáridos, obteniendo un extracto purificado de lípido A (flechas en verde) que puede ser analizado mediante espectrometría de masas.

5.13.- Análisis de las preparaciones de LPS y lípido A mediante electroforesis

La integridad de las muestras de LPS y los remanentes de LPS no hidrolizado en las preparaciones de lípido A de *S. Enteritidis* NCTC13349 y sus cepas derivadas, se evaluaron

cualitativamente mediante Tris-tricina SDS-PAGE (Marolda *et al.*, 2006). El gel resolutivo se preparó mezclando 1250 μL de una solución de acrilamida 49,5%/bisacrilamida 6%, 1660 μL de *Gel Buffer* (Tris 3,0 M; SDS 0,3%; pH 8.45), 520 μL de glicerol, 1560 μL de H_2O ultrapura, 100 μL de APS 10% y 6 μL de TEMED. La mezcla del gel resolutivo se cargó entre vidrios con una separación de 0,75 mm y se cubrió con isopropanol. Una vez polimerizado el gel resolutivo, se retiró el isopropanol y se cargó la mezcla del gel concentrador, preparada con 250 μL de una solución de acrilamida 49.5%/bisacrilamida 3%, 775 μL de *Gel Buffer*, 2100 μL de H_2O ultrapura, 75 μL de APS 10% y 6 μL de TEMED. Para la electroforesis se utilizó una cámara electroforética Bio-Rad, la cual se llenó con suficiente solución amortiguadora anódica (Tris-HCl 0,2 M; pH 8,90) y catódica (Tris-HCl 0,1 M; Tricina 0,1 M; SDS 0,1%; pH 8,25). La electroforesis se realizó a 50 V durante ~50 min durante la migración de la muestras en el gel concentrador, aumentando luego a 150 V durante ~90 min cuando las muestras ingresaron al gel resolutivo. En cada carril del gel se cargó un volumen de 1–5 μL de una solución de extractos puros de LPS o lípido A solubilizados en tampón de lisis (SDS 2%, β -mercaptoetanol 4%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002% en Tris 1 M; pH 6,80).

Los geles se revelaron mediante una adaptación de un método de tinción con plata descrito en la literatura (Tsai & Frasch, 1982). El gel se fijó por inmersión en una solución de EtOH 40% y ácido acético glacial 5% durante 24 h. A continuación, el gel se oxidó por incubación con agitación durante 10 min en una solución de NaIO_4 0.7%, EtOH absoluto 40% y ácido acético glacial 5%. Se realizaron tres lavados con abundante H_2O destilada durante 10 min con agitación y luego el gel se tiñó incubando durante 15 min en una solución de 1 g de AgNO_3 ; 2,8 mL de NaOH 0,1 M y ~2 ml NH_4OH 25% en un volumen de 150 mL de H_2O destilada. Nuevamente, el gel se lavó tres veces con abundante H_2O destilada durante 10 min con agitación y luego se reveló durante ~2 min (o hasta que las bandas adquieran la intensidad deseada) en una solución compuesta por 12,5 mg de ácido cítrico y 125 μL de formaldehído en 250 mL de H_2O destilada. La reacción de revelado se detuvo por dilución con al menos tres lavados de 5 min con H_2O destilada.

5.14.- Análisis estructural del lípido A de cepas derivadas de *S. Enteritidis* NCTC13349 por espectrometría de masas

La distribución de especies de lípido A en las cepas derivadas de *S. Enteritidis* NCTC13349 (**Tabla 1**) se determinó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF en un

equipo Microflex (Bruker Daltonics Inc.) en modalidad de ion negativo con detección por reflexión. Como programa controlador del espectrómetro se utilizó “flexControl 3.0” (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). El espectro final de cada muestra se generó por la sumatoria de 50 barridos de 30 impactos de láser, dirigidos aleatoriamente en diferentes puntos de la muestra depositada sobre una placa portamuestra “*micro scout*” (Bruker Daltonics Inc., MA-EUU).

Las muestras de lípido A se prepararon para su análisis utilizando un protocolo estandarizado previamente en el laboratorio (Fernández *et al.*, 2018) (**Fig. 6**). El precipitado seco de lípido A purificado se resuspendió por agitación con vórtex en 90 μL de una mezcla $\text{CHCl}_3/\text{MetOH}$ 1:1 (v/v) (Silipo *et al.*, 2004). Cada solución de lípido A se mezcló en razón 1:1 con la matriz de ácido 2,5–dihidroxibenzoico (DHB) 10 mg/mL en una solución de ácido cítrico 19,2 mg/mL (March *et al.*, 2010) y se depositó un total 2,1 μL de la mezcla sobre una celda de la placa portamuestra. Los espectros de masa obtenidos se analizaron empleando el programa de acceso libre *mMass* 5.5, desarrollado por Martin Strohm y disponible para descarga (<http://www.mmass.org/>).

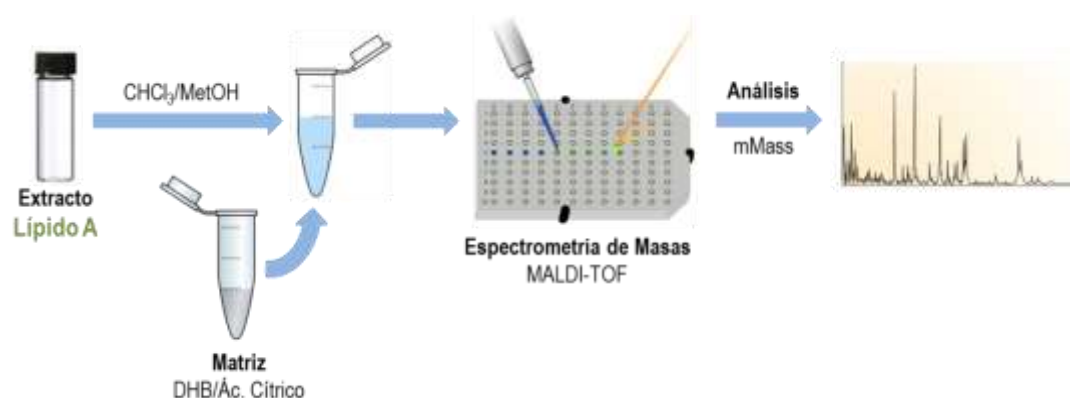


Figura 6. Preparación de muestras de lípido A para espectrometría de masas MALDI-TOF. Los extractos enriquecidos de lípido A se solubilizaron en una solución 1:1 de cloroformo y metanol ($\text{CHCl}_3/\text{MetOH}$) y luego se mezclaron en proporción 1:1 con la matriz de ácido 2,5–dihidroxibenzoico en ácido cítrico (DHB/Ác. cítrico). Alícuotas de la emulsión resultante se cargaron sobre una placa portamuestra para su análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF. Los espectros de masas se procesaron y graficaron usando el programa de licencia libre *mMass* 5.5 (<http://www.mmass.org/>).

5.15.- Internalización y supervivencia intracelular de cepas derivadas de *S. Enteritidis* NCTC13349 en macrófagos RAW264.7

La internalización y supervivencia intracelular *in vitro* de las distintas cepas derivadas de *S. Enteritidis* NCTC13349 (**Tabla 1**) en macrófagos murinos RAW264.7 se evaluó a través de ensayos de protección a gentamicina (**Fig. 7**).

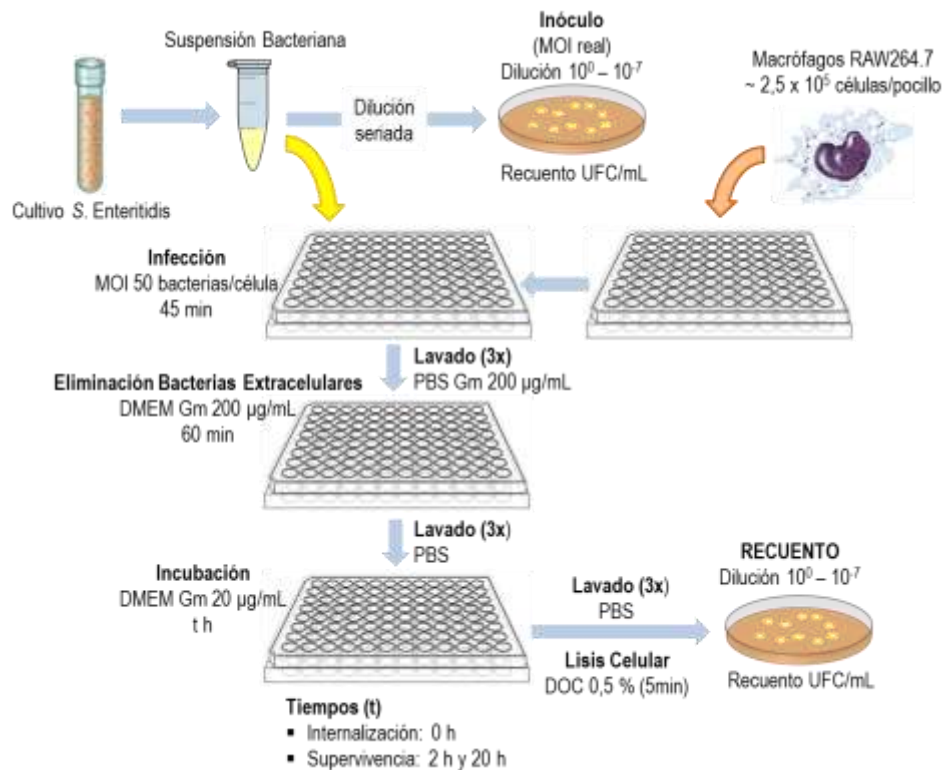


Figura 7. Ensayo de protección a gentamicina de macrófagos murinos RAW264.7 infectados con cepas derivadas de S. Enteritidis NCTC13349. Macrófagos RAW264.7 se infectaron con distintas cepas de S. Enteritidis NCTC13349 mediante co-incubación con una MOI de 50 bacterias/célula. La MOI real se calculó por recuento de UFC/mL de la suspensión bacteriana utilizada para la infección. Luego del periodo de co-incubación, las bacterias extracelulares se eliminaron por lavados con PBS y una incubación con medio DMEM, ambos suplementados con gentamicina (Gm). A diferentes tiempos, las bacterias intracelulares se recuperaron por lisis de los macrófagos con desoxicolato (DOC) y se cuantificaron por recuento de UFC/mL. La internalización de cada cepa bacteriana se determinó a tiempo 0 h, mientras que su supervivencia intracelular se determinó a los tiempos 2 h y 20 h.

El día previo a la infección, los macrófagos RAW264.7 se sembraron en medio DMEM suplementando con FBS 10% a una densidad de $\sim 2,5 \times 10^5$ células/pocillo en una placa microtituladora de 48 pocillos, permitiendo su adherencia por incubación a 37°C en una atmósfera de CO₂ 5% (v/v) durante 24 h. Paralelamente, las bacterias se cultivaron en 5 mL de caldo LB, suplementado con Amp en caso de ser necesario, incubando a 37°C con agitación por 24 h. Al día siguiente, los macrófagos no adheridas se removieron mediante tres lavados con PBS 1x estéril. El número de macrófagos viables se cuantificó por recuento en cámara de Neubauer con tinción de azul de tripán a partir de dos pocillos tratados durante 10 min con tripsina 25% (dilución 1:10 en PBS 1x) para el desprendimiento enzimático de las células. Las cepas bacterianas se subcultivaron a razón 1:100 en 5 mL de caldo LB fresco, suplementado con Amp según corresponda, siendo incubadas a 37°C con agitación hasta una OD_{600nm} 0,4–0,6. Cada cultivo bacteriano se sedimentó por centrifugación y se sometió a tres lavados con 1 mL de PBS 1x centrifugando a 18.300 x g durante 8 min cada vez, siendo finalmente

resuspendido en medio DMEM. El volumen de cada cultivo sedimentado contenía, de acuerdo a la lectura de OD_{600nm} , una cantidad de bacterias totales suficiente para conseguir una multiplicidad de infección (MOI) de 50 bacterias/célula, respecto al número de macrófagos determinando previamente. A fin de conocer la MOI real, se determinó el número de bacterias viables en cada suspensión por dilución seriada en PBS 1x (10^0-10^{-7}) y recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en agar LB incubado a $37^\circ C$ durante 24 h.

La infección se efectuó co-incubando los macrófagos con las diferentes suspensiones bacterianas durante 45 min en triplicado técnico. Después de cumplido el periodo de infección, las bacterias extracelulares se eliminaron a través de tres lavados con PBS 1x suplementado con Gm 200 $\mu g/mL$, seguidos de una incubación con medio DMEM suplementado con Gm 200 $\mu g/mL$ durante 60 min. Luego, el medio de cultivo se reemplazó por DMEM suplementado con Gm 20 $\mu g/mL$. A los tiempos de incubación 0, 2 y 20 h, las células se lavaron tres veces con PBS 1x y se lisaron por acción de desoxicolato de sodio (DOC) al 0,5% durante 5 min para recuperar las bacterias intracelulares, cuyo número se determinó mediante dilución seriada en PBS 1x (10^0-10^{-7}) y siembra en agar LB, cultivando a $37^\circ C$ durante 24 h.

La internalización de cada cepa se calculó como el cociente promedio entre el recuento de UFC/mL del tiempo de infección 0 h (t_0) y el recuento de UFC/mL de la correspondiente suspensión bacteriana inicial (inóculo), según la fórmula $([UFC/mL]_{t_0}/[UFC/mL]_{in\acute{o}culo}) \times 100$. La supervivencia intracelular de la bacteria se calculó como el cociente promedio entre el recuento de UFC/mL de los tiempos de infección 2 y 20 h (t_x), y el recuento de UFC/mL recuperadas en el tiempo 0 h (t_0) para cada cepa, según la fórmula $([UFC/mL]_{t_x}/[UFC/mL]_{t_0}) \times 100$. En ambos casos los resultados se expresaron como porcentaje.

5.16.- Secreción de IL-6 por macrófagos RAW264.7 desafiados con cepas derivadas de *S. Enteritidis* NCTC13349

La secreción de IL-6 se midió en el sobrenadante de cultivo de macrófagos RAW264.7, como un marcador pro-inflamatorio de su activación en respuesta a la infección por las diferentes cepas derivadas de *S. Enteritidis* NCTC13349 (**Tabla 1**). La citoquina secretada se cuantificó a través de un inmunoensayo tipo ELISA disponible comercialmente.

5.16.1.- Infección de macrófagos RAW264.7 con cepas derivadas de *S. Enteritidis* NCTC13349

Se desafiaron cultivos de macrófagos murinos RAW264.7 con las cepas derivadas de *S. Enteritidis* NCTC13349 a través de una infección simple, siguiendo un procedimiento similar al descrito para los ensayos de protección a gentamicina (ver **Sección 5.15**), con ciertas modificaciones en sus etapas finales.

Una vez establecida la infección y eliminadas las bacterias extracelulares, los macrófagos se incubaron en DMEM suplementado con Gm 20 µg/mL hasta el tiempo 20 h, momento en que los remanentes celulares en suspensión se sedimentaron por centrifugación a 1.140 x g durante 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante de cada cultivo se recolectó y almacenó a -80°C hasta la medición de la citoquina por inmunoensayo. Se incluyó un control negativo de células no infectadas para la validación de los ensayos. Cada condición experimental se trabajó en triplicado técnico, tanto con las cepas bacterianas como con el control.

5.16.2.- Cuantificación de IL-6 por inmunoensayo tipo ELISA

La IL-6 contenida en los sobrenadantes se cuantificó utilizando el inmunoensayo comercial tipo ELISA “*Mouse IL-6/IL DuoSet® ELISA*”, según el protocolo recomendado por el fabricante con ciertas adaptaciones. Para ello, una microplaca de 96 pocillos para inmunoensayo, se activó cargando en cada pocillo 4,0 µg/mL del anticuerpo de captura de rata anti-IL-6 murina e incubando a 4°C durante 24 h. Los pocillos se lavaron tres veces con Tween-20 0,05% en PBS 1x y luego se bloquearon por incubación con una solución de BSA 1% en PBS 1x durante 2 h a temperatura ambiente. Se cargaron diluciones 1:100 de cada sobrenadante en BSA 1% en la placa, la cual se incubó a 4°C por 24 h para permitir la unión de la citoquina al anticuerpo de captura. También se cargó una curva de calibración de 8 puntos preparada por dilución seriada en base dos de un estándar de IL-6 recombinante, abarcando un rango de concentración de 0–2000 pg/mL. Se repitieron los tres lavados con Tween-20 0,05% en PBS 1x y a cada pocillo se adicionó 500 ng/mL del anticuerpo de detección de cabra anti-IL-6 murina, cuya fracción constante está biotinilada, y se incubó a temperatura ambiente por 2 h. Nuevamente los pocillos se lavaron tres veces con Tween-20 0,05% en PBS 1x y se incorporó una solución 1:40 de la enzima peroxidasa de rábano picante

funcionalizada con estreptavidina, incubando a temperatura ambiente por 20 min en oscuridad. Después de otra serie de tres lavados con Tween-20 0,05% en PBS 1x, los pocillos se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad con la solución de sustrato, que consiste en una mezcla 1:1 de H₂O₂ y tetrametilbenzidina. La reacción enzimática se detuvo por adición de H₂SO₄ 2 N cuando se estabilizó la aparición de color en el punto de mayor concentración de la curva de calibración. El producto coloreado formado tiene un máximo de absorbancia a 450_{nm}, longitud de onda a la que se realizaron las mediciones. La concentración de IL-6 en las muestras se calculó por interpolación del promedio de dos lecturas independientes en la curva de calibración. Cada lectura se normalizó por el valor obtenido de la medición de tres controles internos, uno preparado con el anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección, otro con el anticuerpo de captura e IL-6 recombinante y un tercero con IL-6 recombinante y el anticuerpo de detección. Las muestras, el estándar de IL-6 en la curva de calibración y los controles internos se cargaron en duplicado técnico.

5.17.- Colonización intestinal y sistémica *in vivo* de cepas derivadas de *S. Enteritidis* NCTC13349 en un modelo murino

La virulencia *in vivo* de las cepas derivadas de *S. Enteritidis* NCTC13349 (**Tabla 1**), en términos de su capacidad de colonización del intestino y órganos internos (bazo e hígado), se evaluó a través de la carga bacteriana recuperada desde dichos tejidos tras una infección simple en un modelo murino de colitis en ratones C56BL/6 tratados con estreptomicina (Str) (Barthel *et al.*, 2003; Hapfelmeier *et al.*, 2004) (**Fig. 8**).

5.17.1.- Declaración ética

Todos los procedimientos en animales se aprobaron por el *Texas A&M University Institutional Animal Care and Use Committee* (TAMU AUP# 2007-18) y se desarrollaron, previo capacitación y contando con participación de personal calificado en manejo veterinario, en el laboratorio de la Dra. Helene Andrews-Polymenis, *Department of Microbial Pathogenesis and Immunology, Health Science Center, Texas A&M University*, de acuerdo con las prácticas señaladas en la *Guide to the Care and Use of Laboratory Animals, the Public Health Service Policy on the Humane Care and Use of Laboratory Animals*.

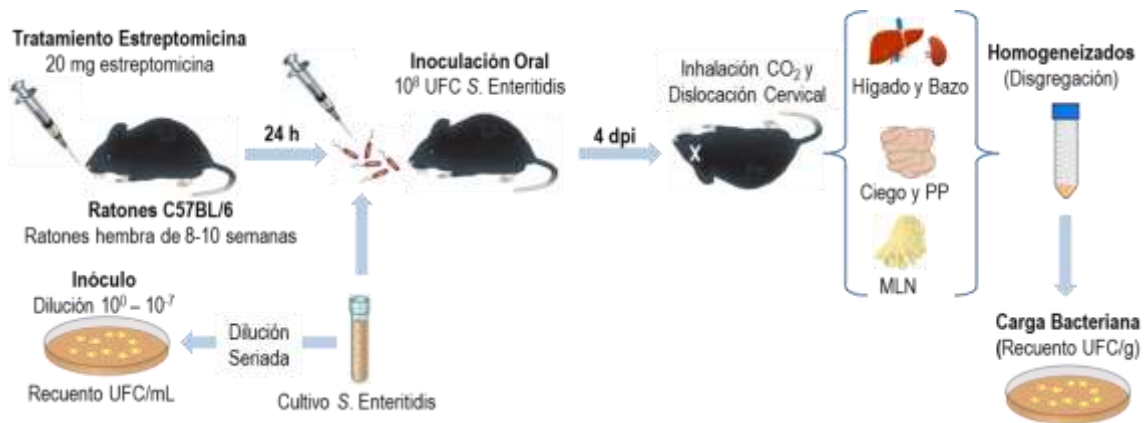


Figura 8. Ensayo de infección oral de ratones C57BL/6 con cepas derivadas de *S. Enteritidis* NCTC13349. Ratones C57BL/6 tratados oralmente con una dosis única de estreptomicina, se sometieron a una infección simple con distintas cepas derivadas de *S. Enteritidis* NCTC13349, administrando un inóculo de 10^8 UFC por vía oral. El tamaño real del inóculo se calculó por recuento de UFC/mL. Al cuarto día post infección (dpi), los animales se sacrificaron y se extrajeron asépticamente el hígado, el bazo, los nodos linfáticos mesentéricos (MLN), las placas de Peyer (PP) y el ciego. Los órganos y tejidos se homogeneizaron y la carga bacteriana en cada uno se determinó por recuento de UFC, siendo expresada por unidad de masa de tejido (UFC/g).

5.17.2.- Animales

Para los experimentos de infección *in vivo* se utilizaron ratones C57BL/6, un linaje murino genéticamente susceptible a la infección por *Salmonella*. Ejemplares hembra de 8–10 semanas de edad (The Jackson Laboratory), reunidos en grupos de 5 individuos, se albergaron bajo condiciones estándar de confinamiento, dentro de jaulas ventiladas con piso de viruta esterilizada por autoclave. A los animales se les suministró el alimento y agua *ad libitum* y se inspeccionaron visualmente dos veces por día para detectar cualquier signo físico o conducta asociada a sufrimiento y/o estrés, siendo parte de los cuidados rutinarios básicos proporcionados en el *Texas A&M University Bioterium* por personal veterinario.

5.17.3.- Infección simple de ratones C57BL/6 por vía oral

25 Ratones C57BL/6, divididos equitativamente en 5 grupos, se trataron con una dosis oral única de 20 mg de Str (100 μ L de Str 200 mg/mL en H₂O estéril) para eliminar la microbiota comensal del intestino, cuya ausencia facilita la colonización inicial de *Salmonella* en el animal. Después de 24 h, los ratones se inocularon oralmente con 10^8 UFC totales de *S. Enteritidis* NCTC133449 y sus cepas derivadas (100 μ L de un cultivo de 10^9 UFC/mL), cultivadas a 37°C con agitación durante 24 h en caldo LB suplementado con Kan 50 μ g/mL o con Kan y carbenicilina (Carb) 100 μ g/mL, según el requerimiento de cada cepa bacteriana en particular. A fin de seleccionar específicamente a las bacterias en estudio luego de su paso por

el animal, a todas las cepas se les introdujo por transducción con el fago P22 un *cassette* de resistencia a Kan en reemplazo del gen *phoN* (ver **Sección 5.10**), ya que se ha descrito que la deleción de este gen no tiene influencia sobre la virulencia de *Salmonella* (Klumpp & Fuchs, 2007). El tamaño real (UFC/mL) del inóculo bacteriano administrado a los ratones se determinó por recuento en placa de diluciones seriadas en PBS 1x estéril frío (10^0 – 10^{-7}), incubando a 37°C durante 24 h en agar LB suplementado con Kan o con Kan y Carb, según el caso. El peso de cada ratón se midió al momento de ser inoculado.

Transcurridos 4 días a contar de la inoculación, los ratones se pesaron nuevamente y se sacrificaron por inhalación de CO₂, seguido de dislocación cervical. Inmediatamente después, se extrajeron en forma aséptica el ciego, los nodos linfáticos mesentéricos (MLN), las placas de Peyer (PP), el bazo y el hígado. Los órganos y tejidos se pesaron y homogeneizaron mediante un Ultra-Turrax en 3 mL de PBS 1x estéril frío. Diluciones seriadas en base 10 (10^0 – 10^{-3} para hígado, bazo y MLN; 10^0 – 10^{-4} para PP; 10^0 – 10^{-6} para el ciego) de los homogeneizados se sembraron en agar LB suplementado con Kan o con Kan y Carb, siendo incubadas a 37°C durante 24 h.

5.18.- Estabilidad del vector pBAD-TOPO en ausencia de selección con antibiótico

La complementación en *trans* del fenotipo de la mutante $\Delta lpxO$ de *S. Enteritidis* NCTC13349 (**Tabla 1**) se realizó por transformación con el plasmidio pBAD::*lpxO*, el cual incluye un gen de resistencia a ampicilina (Amp) como marcador de selección. Adicionalmente, tanto la cepa silvestre como la mutante $\Delta lpxO$ se transformaron con el vector vacío a modo de controles de complementación (ver **Sección 5.11**). Como a los ratones no se les administró ampicilina durante el curso de la infección, las cepas transformantes podrían perder el plasmidio por segregación. Por esto, se evaluó la estabilidad del vector pBAD-TOPO en condiciones no selectivas a través de curvas de crecimiento *in vitro* de las cepas transformantes en ausencia de ampicilina.

Todas las cepas transformadas con el vector pBAD-TOPO se cultivaron en caldo LB con Amp a 37°C con agitación durante 24 h. Las cepas se subcultivaron a razón 1:100 en 50 mL de caldo LB fresco sin Amp y se incubaron a 37°C en agitación. Después de 1 h de incubación, se extrajeron alícuotas de 200 μ L de cada cultivo a intervalos regulares de 30 min hasta completar 4 h de monitoreo para realizar recuentos de UFC/mL en agar LB y agar LB suplementado con Amp 100 μ g/mL. Todas las placas de agar LB también se suplementaron

con Kan 75 µg/mL, ya que todas las bacterias utilizadas en los ensayos de infección portan un *cassette* de resistencia a Kan como marcador cromosómico (ver **Sección 5.17.2**). Las curvas de crecimiento se efectuaron en triplicado biológico.

5.19.- Cinética de crecimiento *in vitro* de cepas derivadas de *S. Enteritidis* NCTC13349

El efecto de la hidroxilación del lípido A sobre la cinética de crecimiento *in vitro* de cepas derivadas de *S. Enteritidis* NCTC13349, se evaluó calculando la tasa de crecimiento de la mutante $\Delta lpxO$ complementada en *trans* y de las cepas silvestre y mutante transformadas con el vector pBAD-TOPO vacío (ver **Sección 5.11**).

Las curvas de crecimiento *in vitro* de las tres cepas transformantes, generadas a partir del recuento bacteriano para evaluar la estabilidad del vector pBAD-TOPO (ver **Sección 5.18**), se ajustaron matemáticamente a una función lineal. En el ajuste de curva sólo se consideró el intervalo de tiempo que abarca la fase exponencial de crecimiento. La velocidad específica de crecimiento (UFC/mL*min) para cada cepa se calculó como el promedio de la pendiente de las tres funciones con mayor índice de correlación lineal (R^2). Todas las operaciones matemáticas se efectuaron utilizando el programa *GraphPad Prism 6.0* (GraphPad Software Inc.).

5.20.- Análisis estadístico y expresión de resultados

Los datos obtenidos de los experimentos *in vitro* e *in vivo* corresponden al promedio de 3 y 5 réplicas biológicas, respectivamente. En todos los gráficos, las barras de error representan el error estándar del promedio. La significancia estadística en todos los análisis se determinó a través de la prueba *t* de Student de dos colas con un intervalo de confianza mínimo del 95%, considerando estadísticamente significativos a valores $P < 0,05$. En el análisis de los ensayos *in vivo* se omitió aquellos valores identificados como “atípicos” luego de la aplicación combinada de las pruebas de Grubbs y ROUT. Todo el procesamiento estadístico de los datos y la elaboración de gráficos se realizó con el programa *GraphPad Prism 6.0* (GraphPad Software Inc.).

6.- RESULTADOS

6.1.- Caracterización estructural del lípido A de *S. Enteritidis* a través de espectrometría de masas MALDI-TOF

A fin de conocer las especies de lípido A determinadas por las proteínas codificadas en los genes *lpxO* y *visP* de *S. Enteritidis* NCTC13349, se prepararon muestras de lípido A de la cepa silvestre y las mutantes $\Delta lpxO$ y $\Delta visP$ (ver **Sección 5.2**) para su análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (ver **Sección 5.14**). Para esto, la biomasa proveniente de las distintas cepas cultivadas en condiciones aeróbicas en medio mínimo E suplementado con glucosa se sometió a un proceso de extracción fenólica para purificar el LPS, el cual se hidrolizó químicamente para obtener el lípido A (ver **Sección 5.12**).

En la cepa silvestre (**Fig. 9A**), el espectro del lípido A mostró dos pares de señales en diferentes rangos de cociente masa/carga (m/Z): el primero representa a las especies de lípido A hexa-aciladas (~1797 m/Z y ~1813 m/Z) (Kawasaki *et al.*, 2007) y el segundo a sus contrapartes hepta-aciladas por palmitoilación (~2035 m/Z y ~2051 m/Z) (Guo *et al.*, 1997; Kawasaki *et al.*, 2007). En de cada par de señales, la primera corresponde al lípido A no hidroxilado y la segunda a la especie hidroxilada. En este caso, bajo condiciones aeróbicas de crecimiento, las especies hidroxiladas, tanto hexa-aciladas (~1813 m/Z) como hepta-aciladas (~2051 m/Z), tienen una abundancia relativa mayoritaria, en conformidad a lo reportado recientemente (Fernández *et al.*, 2018). Por su parte, el lípido A de la mutante $\Delta lpxO$ (**Fig. 9B**), presentó sólo las señales de las especies no hidroxiladas (~1797 m/Z y ~2035 m/Z), indicando que en *S. Enteritidis*, al igual que en el serovar Typhimurium (Gibbons *et al.*, 2000; Gibbons *et al.*, 2005), la hidroxilación del lípido A depende de LpxO. Por otro lado, en el espectro de masas del lípido A la mutante $\Delta visP$ (**Fig. 9C**) exhibió el mismo número, distribución e intensidad de señales que la cepa silvestre de *S. Enteritidis*, a diferencia de lo descrito para *S. Typhimurium*, donde la delección del gen *visP* conduce a un notorio aumento en la abundancia relativa del lípido A hidroxilado (Moreira *et al.*, 2013).

Para complementar en *trans* el fenotipo de la mutante $\Delta lpxO$ (~1797 m/Z y ~2035 m/Z) (**Fig. 9B**), ésta se transformó con el gen *lpxO* silvestre clonado en el vector de expresión pBAD-TOPO (pBAD::*lpxO*). Además, la cepa silvestre y la mutante $\Delta lpxO$ se transformaron con el vector pBAD-TOPO vacío como controles de complementación (ver **Sección 5.11**). El lípido A de la cepa silvestre (**Fig. 9D**) y de la mutante (**Fig. 9E**) transformadas

con el plasmidio pBAD-TOPO vacío no registró cambios estructurales en relación a las correspondientes cepas sin transformar.

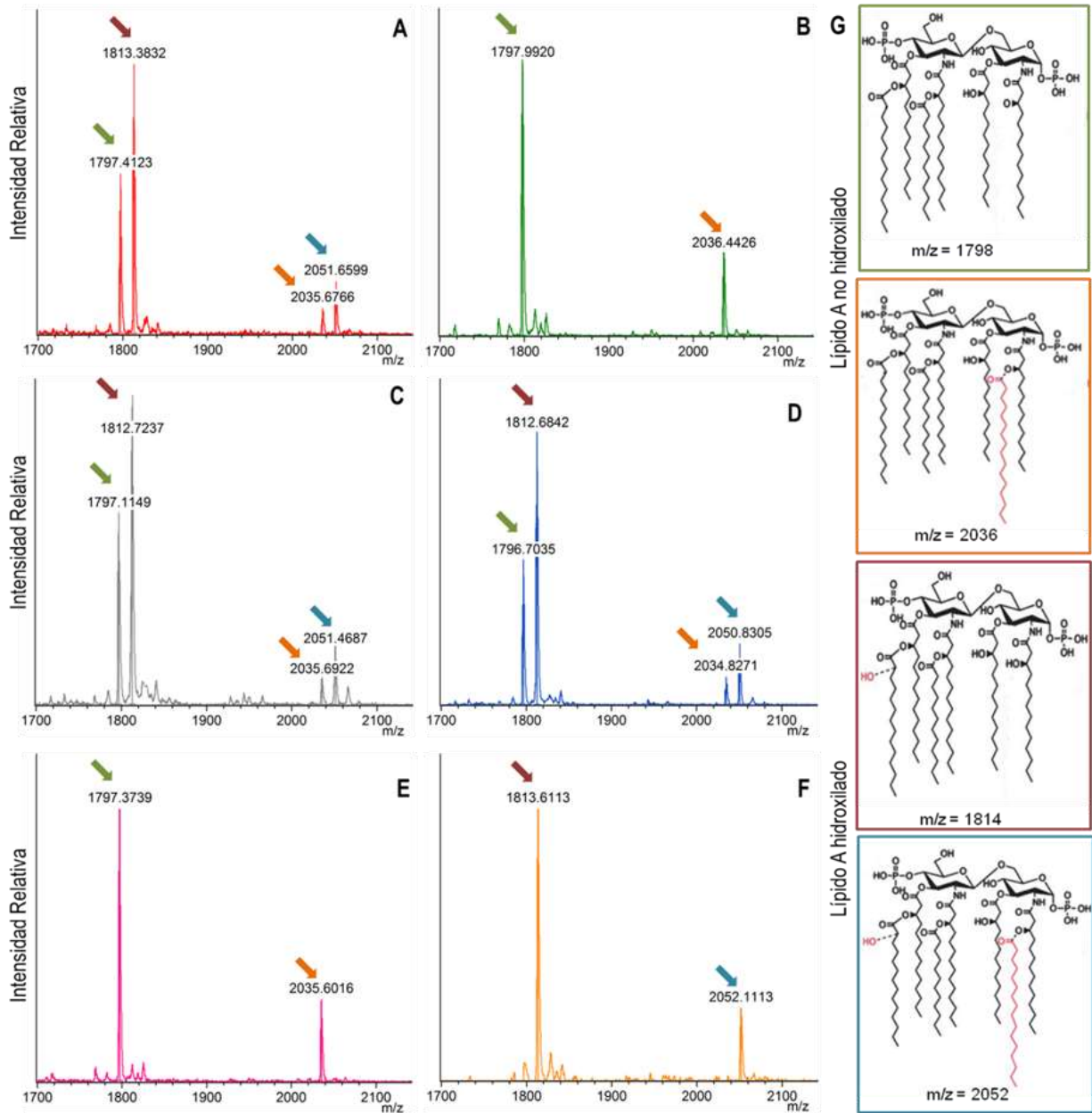


Figura 9. Caracterización de la estructura del lípido A de *Salmonella* Enteritidis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Espectros de masas que muestran la distribución de especies de lípido A procedente de las distintas cepas de *S. Enteritidis*, comprendiendo a la cepa silvestre (A), la mutante $\Delta lpxO$ (B), la mutante $\Delta visP$ (C), la cepa silvestre transformada con pBAD-TOPO (D), la mutante $\Delta lpxO$ transformada con pBAD-TOPO (E) y la mutante $\Delta lpxO$ transformada con pBAD::lpxO (F). Las señales indicadas con las flechas coloreadas corresponden a las estructuras del lípido A enmarcadas en los cuadros del color respectivo (G) (Guo *et al.*, 1997; Kawasaki *et al.*, 2007). Todas las muestras de lípido A purificado se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

En cambio, el perfil de la mutante $\Delta lpxO$ transformada con el plasmidio pBAD::lpxO (Fig. 9F) cambió radicalmente respecto a la mutante transformada con el vector vacío,

mostrando un espectro en que únicamente están presentes las señales correspondientes a las especies hidroxiladas del lípido A (~1813 m/Z y ~2051 m/Z). La completa hidroxilación del lípido A se puede atribuir a una potencial sobreexpresión del gen *lpxO*, que resultaría del alto número de copias del vector pBAD-TOPO (~20 copias).

En aerobiosis, *S. Enteritidis* silvestre presenta una población de lípido A en que coexisten especies no hidroxiladas e hidroxiladas en una proporción definida, siendo mayor la fracción hidroxilada (**Fig. 9A**). Dicha distribución se desplaza hacia un lípido A completamente hidroxilado o no hidroxilado por sobreexpresión (**Fig. 9F**) o delección (**Fig. 9B**) del gen *lpxO*, respectivamente. En conjunto estos resultados confirman la participación directa del producto del gen *lpxO* en la hidroxilación del lípido A en *S. Enteritidis*. Por su parte, la delección del gen *visP* no condujo a un enriquecimiento de las especies de lípido A hidroxilado como lo hace en *S. Typhimurium* (Moreira *et al.*, 2013), sugiriendo que el producto del gen *visP* no tendría impacto sobre la hidroxilación de lípido A en *S. Enteritidis*.

6.2.- Efecto de la hidroxilación del lípido A sobre la internalización y supervivencia intracelular de *S. Enteritidis* en macrófagos murinos

Durante su ciclo infeccioso, *Salmonella* establece contacto con macrófagos luego de acceder a la capa submucosa en el intestino delgado, siendo la interacción con los fagocitos crucial en la patogénesis de la bacteria (Vazquez-Torres *et al.*, 1999) (**Fig. 1**). Se determinó la influencia de la hidroxilación del lípido A sobre la interacción *in vitro* de *S. Enteritidis* con macrófagos murinos a través de ensayos de protección a gentamicina en macrófagos de la línea RAW264.7 infectados con la cepa silvestre, la mutante $\Delta lpxO$ y la mutante complementada *in trans*, evaluando en cada caso la invasión y la supervivencia intracelular (ver **Sección 2.15**).

Se ha reportado que la delección del gen *lpxO* en *S. Typhimurium* reduce su invasión en células epiteliales (Moreira *et al.*, 2013), pero no afecta la internalización de la bacteria en macrófagos murinos (Gibbons *et al.*, 2005). En contraste, en *S. Enteritidis* la internalización de la mutante $\Delta lpxO$ fue significativamente superior (~120 veces) a la de la cepa silvestre en macrófagos RAW264.7 (**Fig. 10A**). La reincorporación del gen *lpxO* restauró sólo parcialmente el fenotipo silvestre, disminuyendo el porcentaje de internalización en la mutante $\Delta lpxO$ complementada *in trans*, pero siendo todavía estadísticamente mayor que el porcentaje de internalización de la cepa silvestre (**Fig. 10B**). La cepa silvestre y la mutante transformadas con

el vector vacío como controles de complementación, mostraron el mismo comportamiento que las respectivas cepas sin transformar (Fig. 10B).

En cuanto a la supervivencia intracelular de *S. Enteritidis* en macrófagos, se observó que la mutante $\Delta lpxO$ sobrevive menos que la cepa silvestre a tiempos cortos (2 h) y especialmente a tiempos largos (20 h) de infección, cuando la diferencia es estadísticamente significativa (Fig. 10C). Al contrario de la cepa silvestre, cuyo porcentaje de supervivencia prácticamente se duplicó a las 20 h, la mutante $\Delta lpxO$ es incapaz de replicarse al interior de los macrófagos (Fig. 10C). Este fenotipo coincide con lo descrito previamente para *S. Typhimurium* en el mismo tipo celular (Moreira *et al.*, 2013).

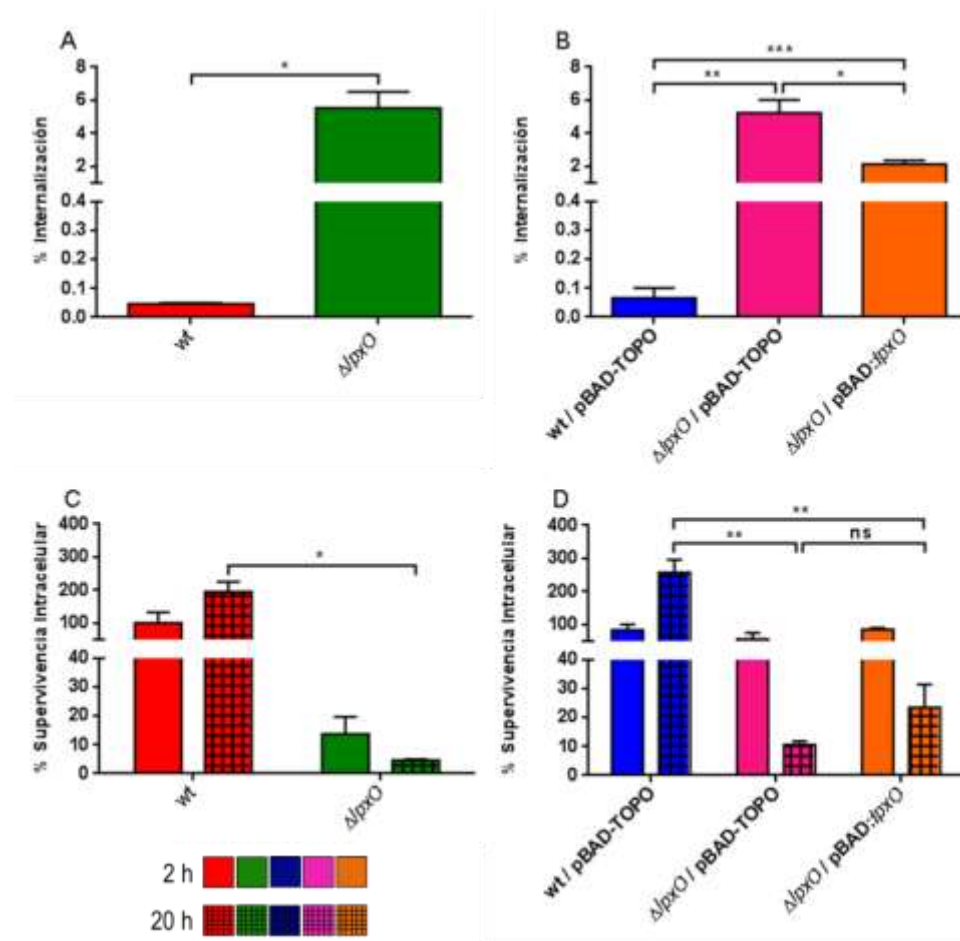


Figura 10. Efecto de la hidroxilación del lípido A sobre la internalización y supervivencia intracelular de *S. Enteritidis* en macrófagos murinos. Ensayos de infección de macrófagos RAW264.7 con la cepa silvestre (wt) y la mutante $\Delta lpxO$ de *S. Enteritidis* NCTC13349 para evaluar internalización (A) y supervivencia intracelular (B) *in vitro*. La internalización (C) y la supervivencia (D) también se determinaron para la mutante $\Delta lpxO$ complementada *in trans* con el gen *lpxO* ($\Delta lpxO$ / pBAD::lpxO), y para los controles de complementación correspondientes a la cepa silvestre (wt / pBAD-TOPO) y la mutante $\Delta lpxO$ ($\Delta lpxO$ / pBAD-TOPO), ambas transformadas con el vector vacío (ver Sección 5.20). Cada barra representa el promedio de tres réplicas biológicas con el error estándar del promedio asociado. En el caso de la supervivencia intracelular (C y D), las barras de color sólido y las barras achuradas corresponden a tiempos de infección de 2 h y 20 h, respectivamente. (ns: no significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

En contraposición a lo esperado, en la mutante complementada en *trans* con el gen *lpxO* no se revirtió ni siquiera parcialmente el efecto en la supervivencia intracelular ocasionado por la delección de este gen (**Fig. 10D**). A tiempos largos, la supervivencia intracelular de la cepa silvestre transformada con el vector vacío también fue significativamente mayor que la de la mutante $\Delta lpxO$ transformada con el mismo vector (**Fig. 10D**), lo que concuerda con la observación para las mismas cepas no transformadas.

La complementación en *trans* con el gen *lpxO* rescató de manera parcial el fenotipo mutante para la internalización, sin embargo, no se recuperó en lo absoluto la supervivencia intracelular de la cepa silvestre. Este fenómeno se podría explicar como una consecuencia de que en la mutante $\Delta lpxO$ complementada en *trans* virtualmente todas las moléculas de lípido A que se producen están hidroxiladas (ver **Fig. 9F**) a causa de la sobreexpresión del gen *lpxO*, producto del alto número de copias del vector en que se clonó. Dicha situación no se ajusta al perfil silvestre del lípido A de *Salmonella* en aerobiosis, donde las especies hidroxiladas son mayoritarias, pero no exclusivas (ver **Fig. 9A**).

Conjuntamente, los resultados sugieren que un grado adecuado de hidroxilación del lípido A ayudaría a que en una primera instancia *S. Enteritidis* evite la fagocitosis por parte de macrófagos murinos y una vez fagocitada, contribuiría a que la bacteria sobreviva y se replique intracelularmente. Algo similar se ha descrito para *S. Typhimurium*, donde tanto la ausencia como el exceso del lípido A hidroxilado producen una reducción de la supervivencia bacteriana en macrófagos J774 (Moreira *et al.*, 2013).

6.3.- La delección del gen *lpxO* incrementa la secreción de IL-6 en macrófagos murinos infectados con *S. Enteritidis*.

En *K. pneumoniae* la delección del gen *lpxO* conduce a un fenotipo de lípido A no hidroxilado, tal como ocurre en *S. Enteritidis* (**Fig. 9B**). La infección con una mutante $\Delta lpxO$ de *K. pneumoniae* induce una mayor secreción de TNF- α *in vitro* por parte de macrófagos murinos, así como también un incremento en la expresión *in vivo* de la citoquina en ratones, sugiriendo que la ausencia de la hidroxilación elevaría el potencial inflamatorio del lípido A (Llobet *et al.*, 2015). Este fenómeno no ha sido estudiado en ningún miembro del género *Salmonella*. El efecto de la hidroxilación sobre la inmunogenicidad del lípido A de *S. Enteritidis* se determinó midiendo la secreción de IL-6 como marcador de la magnitud de la repuesta inflamatoria de macrófagos murinos RAW264.7 frente a una infección con la cepa

silvestre o con las mutantes $\Delta lpxO$ y $\Delta visP$. La citoquina se cuantificó en sobrenadantes de cultivo celular mediante inmunoensayo (ver Sección 5.16).

La mayor secreción de IL-6 se registró en los macrófagos infectados con la mutante $\Delta lpxO$, siendo ~2,5 veces superior a la cantidad secretada por las células infectadas con la bacteria silvestre (Fig. 11). Este incremento sugiere que la ausencia de lípido A hidroxilado estimula una reacción inflamatoria más robusta. Por lo tanto, la hidroxilación contribuiría a mitigar la capacidad inmunogénica del lípido A de *S. Enteritidis*. Por su parte, al infectar los macrófagos con la mutante $\Delta visP$, la cual no presenta alteraciones en la estructura del lípido A con respecto a la cepa silvestre (ver Fig. 9C), la secreción de la citoquina alcanzó niveles muy similares a los de macrófagos desafiados con la bacteria silvestre (Fig. 11).

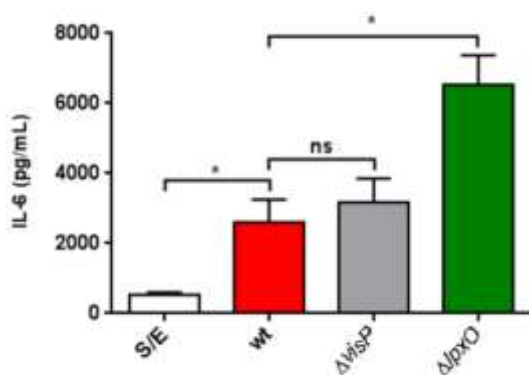


Figura 11. Efecto de la delección del gen *lpxO* sobre la secreción de IL-6 en macrófagos murinos infectados con *S. Enteritidis*. Concentración de IL-6 en el sobrenadante de cultivo de macrófagos murinos RAW264.7 infectados separadamente con la cepa silvestre (wt) y las mutantes $\Delta lpxO$ y $\Delta visP$. Los sobrenadantes se recolectaron luego de una incubación de 20 h. El sobrenadante de cultivo de macrófagos sin infectar se usó como control negativo no estimulado (S/E) para definir la secreción basal de IL-6 en las condiciones de ensayo (ver Sección 5.16.1). La citoquina se cuantificó mediante un inmunoensayo comercial tipo ELISA (ver Sección 5.16.2). Cada barra representa el promedio de tres réplicas biológicas con el error estándar del promedio asociado. La significancia estadística se determinó mediante una prueba *t* de Student con un intervalo de confianza mínimo del 95% (ns: no significativo; * $p < 0,05$).

6.4.- La hidroxilación del lípido A afecta la capacidad de colonización intestinal y sistémica de *S. Enteritidis* en modelo murino

Los cambios en la hidroxilación del lípido A en *S. Typhimurium*, ya sea por delección del gen *lpxO* o del gen *visP*, provocan una atenuación de la virulencia *in vivo*, la cual se manifiesta como una deficiencia en la colonización del intestino y órganos internos y una disminución de la letalidad en ratones (Moreira *et al.*, 2013). Como en *S. Enteritidis* la delección del gen *visP* no afectó la distribución de especies del lípido A (Fig. 9C), para estudiar el impacto de la hidroxilación del lípido A sobre la virulencia *in vivo* se usó la cepa silvestre, la mutante $\Delta lpxO$ y la mutante $\Delta lpxO$ complementada en *trans*, realizando ensayos de infección en un modelo murino de colitis (Barthel *et al.*, 2003; Hapfelmeier *et al.*, 2004). Las cepas se inocularon oralmente en ratones C57BL/6 tratados con estreptomicina y, luego de 4 días post inoculación, la colonización intestinal y sistémica se evaluó en función de la carga

bacteriana recuperada desde el intestino, tejidos subyacentes y órganos internos (ver **Sección 5.17**). A fin de seleccionar las bacterias para el recuento luego de la infección *in vivo*, todas las cepas de *S. Enteritidis* fueron mutagenizadas por transducción con un lisado de fago P22, incorporando como marcador de selección un *cassette* de resistencia a Kan en reemplazo del gen *phoN* (ver **Sección 5.17.2**).

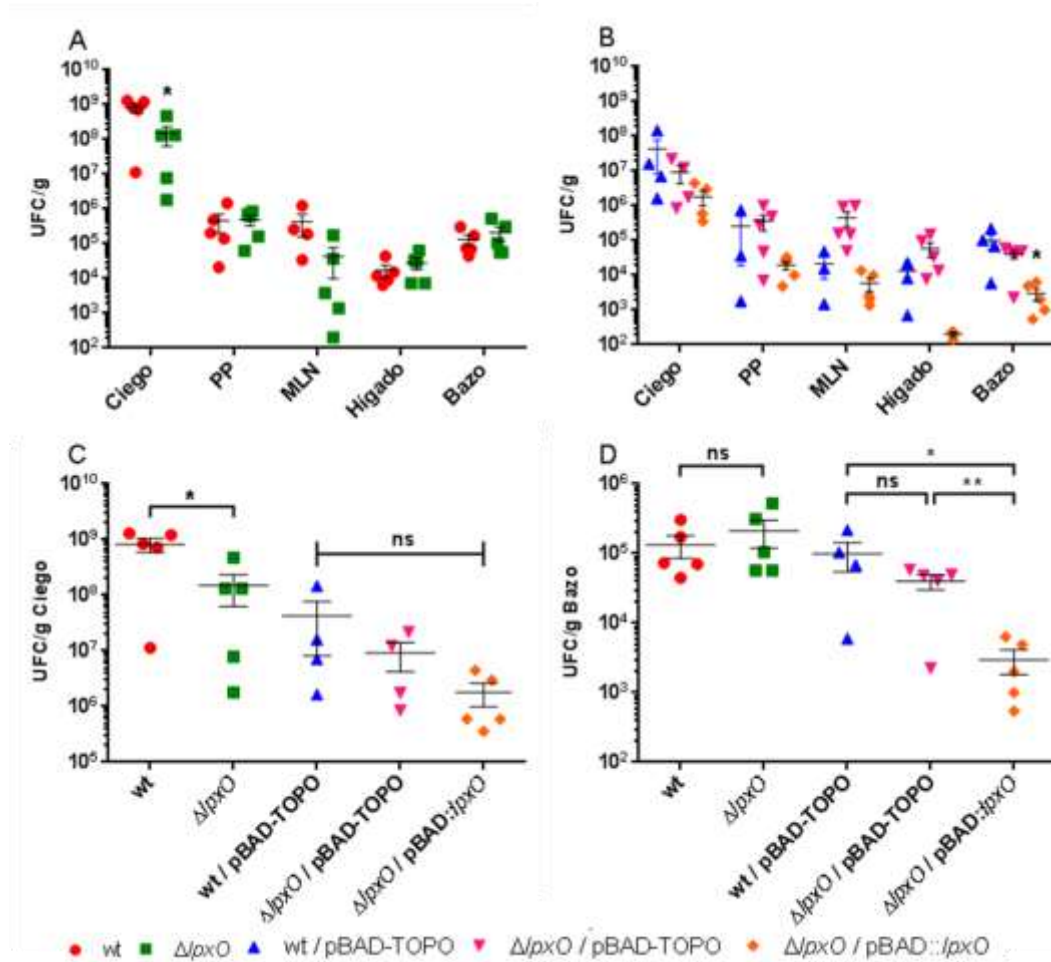


Figura 12. Efecto de la hidroxilación del lípido A sobre la colonización intestinal y sistémica de *S. Enteritidis* en un modelo murino. Carga bacteriana de *S. Enteritidis* contenida en el ciego, placas de Peyer (PP), nodos linfáticos mesentéricos (MLN), hígado y bazo de ratones C57BL/6 infectados. Los animales se inocularon oralmente con la cepa silvestre (●) y la mutante $\Delta lpxO$ (■) sin transformar (A); o con las cepas control silvestre (▲) y mutante (▼) transformadas con el vector vacío y con la mutante complementada en *trans* (◆) (B). En particular, se muestra el recuento para todas las cepas bacteriana en el ciego (C) y bazo (D). En todos los casos, la carga bacteriana se expresa como UFC por masa (UFC/g) de tejido. Dentro de los distintos grupos experimentales, los símbolos (●; ■; ▲; ▼; ◆) representan individualmente el valor de la carga bacteriana recuperada desde cada ratón. La línea horizontal media indica el promedio del recuento para cinco réplicas biológicas. También se señala el error estándar asociado al promedio. En todos los gráficos, el eje Y se estableció como escala logarítmica en base 10. (ns: no significativo; *p<0,05; **p<0,01).

En las placas de Peyer (PP), los nodos linfáticos mesentéricos (MLN), el bazo y el hígado, la mutante $\Delta lpxO$ y la cepa silvestre mostraron un recuento relativamente similar entre sí (Fig. 12A). En cambio, en el ciego se recuperó una carga bacteriana menor para la mutante

$\Delta lpxO$ en comparación a la cepa silvestre, siendo éste el único tejido donde la delección de este gen tuvo un efecto estadísticamente significativo (**Fig. 12A y C**). La mutante $\Delta lpxO$ transformada con el vector pBAD-TOPO vacío y especialmente la mutante complementada en *trans*, también presentaron un recuento menor respecto a su contraparte silvestre en el ciego (**Fig. 12C**), aunque sólo como una tendencia sin alcanzar significancia estadística. Esta tendencia, vale decir una menor carga bacteriana al infectar con la mutante $\Delta lpxO$ complementada, se observó en la mayoría de los otros tejidos (**Fig. 12B**). En el bazo, sin embargo, órgano en que tanto la cepa silvestre como la mutante $\Delta lpxO$ transformadas con el vector vacío presentaron una carga bacteriana similar, la carga bacteriana recuperada fue significativamente menor al infectar con la mutante complementada en comparación a las cepas control (**Fig. 12B y D**). Al igual que para las cepas transformantes usadas como control, en el bazo no hubo diferencia estadística de la carga bacteriana entre la cepa silvestre y la mutante $\Delta lpxO$ sin transformar (**Fig. 12D**).

En suma, los resultados sugieren que un adecuado balance de la hidroxilación del lípido A contribuye a la capacidad de *S. Enteritidis* para colonizar intestinal y sistémicamente a un hospedero murino durante una infección *in vivo*. Este balance sería particularmente importante para la colonización del intestino, pues la mutante $\Delta lpxO$ y la mutante complementada en *trans* tienen un fuerte fenotipo de atenuación en el ciego (**Fig. 11C**). A nivel sistémico, la completa hidroxilación del lípido A parecería ser más perjudicial para la virulencia *in vivo* de la bacteria que la ausencia de la modificación, ya que en el bazo la mutante $\Delta lpxO$ desarrolla un fenotipo cercano al silvestre, mientras que la mutante $\Delta lpxO$ complementada en *trans* tuvo una deficiencia significativamente mayor para colonizar dicho órgano (**Fig. 11D**).

6.5.- La mutante $\Delta lpxO$ de *S. Enteritidis* complementada en *trans* sufre una selección negativa durante la infección en ratones C57BL/6

En los ensayos de infección *in vivo*, todas las cepas de *S. Enteritidis* tenían un gen de resistencia a Kan en su cromosoma (ver **Sección 5.17.2**). Adicional a esto, las cepas transformadas con el vector pBAD-TOPO vacío (cepa silvestre y mutante $\Delta lpxO$) o con su derivado pBAD:: $lpxO$ (mutante complementada en *trans*), también tenían resistencia Amp/Carb conferida por el plasmidio (ver **Sección 5.11**).

Las diluciones seriadas de los homogeneizados de órganos y tejidos provenientes de los grupos de ratones infectados con la mutante $\Delta lpxO$ complementada en *trans* y con las dos cepas transformantes control, se sembraron en agar LB con Kan y Carb (**Fig. 11**) En paralelo, las mismas diluciones de un ratón por grupo también se sembraron en agar LB con Kan para monitorear si existía alguna diferencia en el recuento entre los medios suplementados con los distintos antibióticos (ver **Sección 5.17.2**).

Únicamente en el caso de la mutante $\Delta lpxO$ complementada en *trans* se detectó un mayor recuento en agar LB con Kan comparado con el medio suplementado con Kan y Carb, ante lo cual las diluciones de todos los ratones restantes en el grupo se sembraron excepcionalmente en agar LB sólo con Kan. El recuento de la mutante complementada fue mayor en el medio con Kan respecto al medio con Kan y Carb en todos los órganos y tejidos, siendo esta variación estadísticamente significativa en el ciego, PP, NLM y bazo (**Fig. 13A**).

Dado que la resistencia a Kan es otorgada por un marcador de selección cromosómico, ésta es estable durante la infección *in vivo*. Por otro lado, la resistencia a Carb podría perderse por segregación del plasmidio durante el paso de las bacterias por el animal, especialmente debido a que los ratones no se les administró el antibiótico. La pérdida del plasmidio se podría atribuir a una conjunción de tres factores: (i) la ausencia de Amp/Carb ejerciendo una selección para mantener al plasmidio durante la infección (Imanaka *et al.*, 1981; Boe *et al.*, 1987), (ii) el elevado costo metabólico que implica la replicación un plasmidio de alto número de copias durante la infección (Popov *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012b) y (iii) la atenuación *in vivo* inducida por un fenotipo de lípido A completamente hidroxilado resultado de la complementación en *trans* (**Fig. 9C**). Todo ello podría contribuir a que el plasmidio se pierda *in vivo* y a que la población bacteriana viable dentro del animal se enriqueciera en aquellas bacterias que perdieron el plasmidio, derivando en una disminución de las resistentes a Kan y Carb. Las dos primeras situaciones (i y ii) también deberían afectar a las cepas silvestre y mutante transformadas con el vector vacío; sin embargo, sólo en la población de la mutante complementada en *trans* se observó una pérdida de la resistencia conferida por el plasmidio. Esto sugiere que la sobreexpresión ectópica de *lpxO*, que determina un fenotipo de lípido A hiperhidroxilado, es negativa para la supervivencia *in vivo* de las bacterias que mantienen el vector.

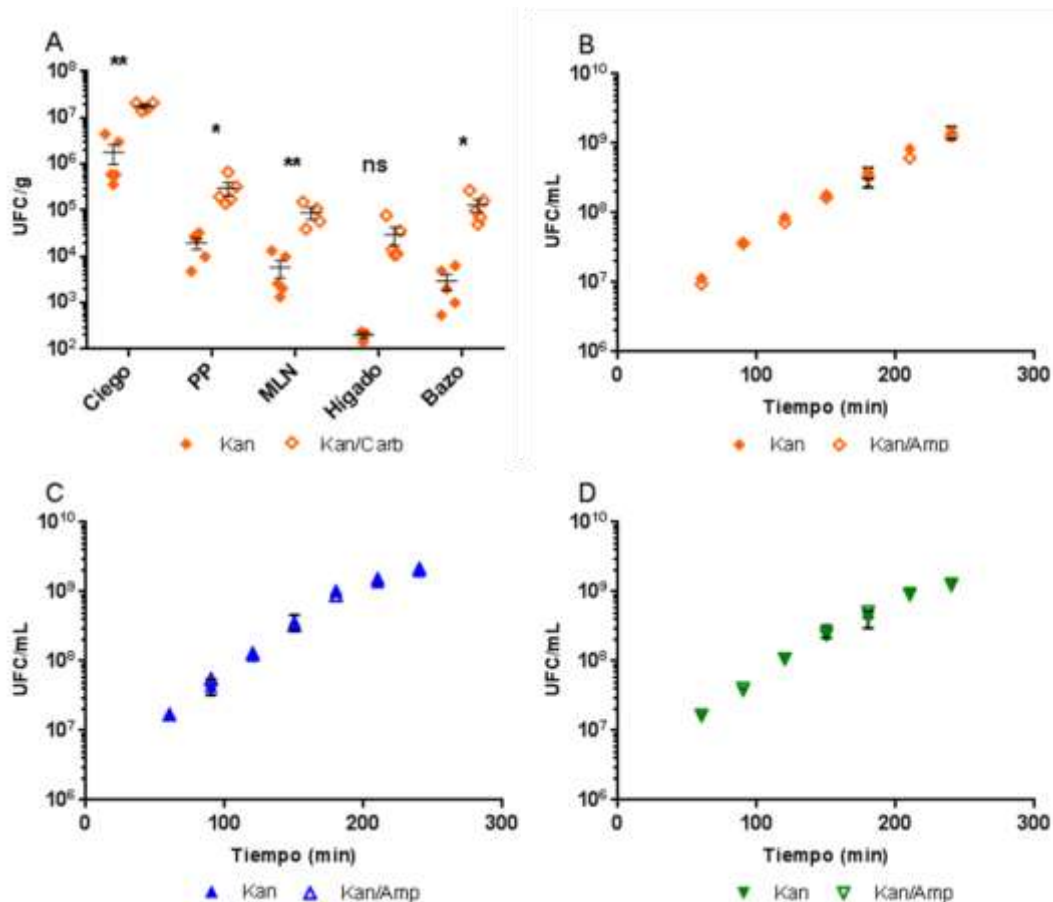


Figura 13. Pérdida del plasmidio pBAD::lpxO durante la infección de ratones C57BL/6 con la mutante Δ lpxO de *S. Enteritidis* complementada en *trans*. Recuento bacteriano expresado en UFC/g de los distintos tejidos recolectados desde ratones C57BL/6 infectados con la mutante Δ lpxO complementada en *trans* (A). Curvas de crecimiento *in vitro* de la mutante Δ lpxO complementada en *trans* (B) y de la cepa silvestre (C) y mutante (D) transformadas con el vector pBAD-TOPO vacío. Todos los cultivos se efectuaron en caldo LB sin suplementar, monitoreando el crecimiento cada 30 min a partir de 1 h tras la inoculación y hasta completar 4h (ver **Sección 5.18**). En todos los casos se indican tanto el recuento en agar LB con Kan (símbolos sólidos) como el recuento en agar LB con Kan y Carb/Amp (símbolos sin relleno). La línea horizontal media representa el promedio del recuento para cinco (A) y tres (B, C y D) réplicas biológicas. También se señala el error estándar asociado al promedio. En todos los gráficos, el eje Y se estableció como escala logarítmica en base 10. PP: placas de Peyer; MLN: nodos linfáticos mesentéricos. (ns: no significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Con la finalidad de reafirmar la idea anterior y descartar que la pérdida de la resistencia a Carb observada *in vivo* en la mutante complementada sea causada por la inestabilidad intrínseca del vector pBAD-TOPO en ausencia de selección, su estabilidad se evaluó *in vitro* a través de curvas de crecimiento de todas las cepas transformantes. Para esto, las cepas se cultivaron en caldo LB y periódicamente se sembraron para su recuento tanto en agar LB con Kan como en agar LB con Kan y Amp (ver **Sección 5.18**). No se observó diferencia entre el recuento en agar LB suplementado sólo con Kan y el recuento obtenido en agar LB suplementado con Kan y Amp, ni para la mutante complementada en *trans* (**Fig. 13B**) ni para la cepa silvestre (**Fig. 13C**) y mutante (**Fig. 13D**) transformadas con el vector vacío. Los

resultados sugieren que la ausencia de selección mediante antibióticos es insuficiente para causar la pérdida del vector pBAD-TOPO por segregación. No obstante, se requieren experimentos adicionales para determinar si la atenuación *in vivo* ocasionada por la completa hidroxilación del lípido A y/o el costo metabólico de la replicación del vector, promueven la menor recuperación de colonias resistentes a Kan y Amp de la mutante $\Delta lpxO$ complementada en *trans*.

6.6.- La hidroxilación del lípido A altera la cinética de crecimiento, pero no la biomasa total de *S. Enteritidis* en cultivo

LpxO es una proteína que se inserta en la cara citoplasmática de la membrana plasmática (Doerrler *et al.*, 2004; Gibbons *et al.*, 2008), donde cataliza la hidroxilación del lípido A (Gibbons *et al.*, 2000; Gibbons *et al.*, 2008). Cambios en la cantidad de LpxO en la membrana o en el nivel de hidroxilación del lípido A (**Fig. 9**), ya sea por delección o sobreexpresión del gen *lpxO*, podrían alterar la cinética de crecimiento de *S. Enteritidis*. Esto se evaluó comparando la tasa de crecimiento *in vitro* de la mutante $\Delta lpxO$ complementada en *trans* y de las cepas silvestre y mutante transformadas con el vector vacío como control (ver **Sección 5.19**).

Las curvas de crecimiento mostraron que las tres cepas transformantes se replicaron siguiendo un comportamiento exponencial similar, alcanzando también una biomasa final comparable (**Fig. 14A**). La velocidad específica de crecimiento resultó mayor para la cepa silvestre comparada con las mutantes, principalmente respecto a la mutante complementada en *trans* que presentó la tasa de crecimiento más baja en fase exponencial. No obstante, únicamente en el caso de la mutante transformada con el vector vacío y su contraparte complementada en *trans* hubo una diferencia estadísticamente significativa (**Fig. 14B**).

La mutante $\Delta lpxO$ complementada en *trans*, que sólo produce un lípido A hidroxilado (**Fig. 9E**), presentó una tasa de crecimiento incluso menor a la mutante transformada con el vector vacío, cuyo lípido A no está hidroxilado (**Fig. 9F**). Considerando esto, se concluye que la hidroxilación excesiva del lípido A alteraría la cinética de crecimiento de *S. Enteritidis in vitro* más fuertemente que la ausencia de la modificación. El menor efecto de un lípido A sin hidroxilar sobre el crecimiento de *S. Enteritidis in vitro* tiene cierta congruencia con hallazgos descritos para *S. Typhimurium*, donde la delección del gen *lpxO* no afecta el crecimiento del serovar en caldo LB ni en medio mínimo N con bajo Mg^{2+} , así como tampoco compromete la

integridad de membrana de la bacteria en ninguna de las dos condiciones (Gibbons *et al.*, 2008).

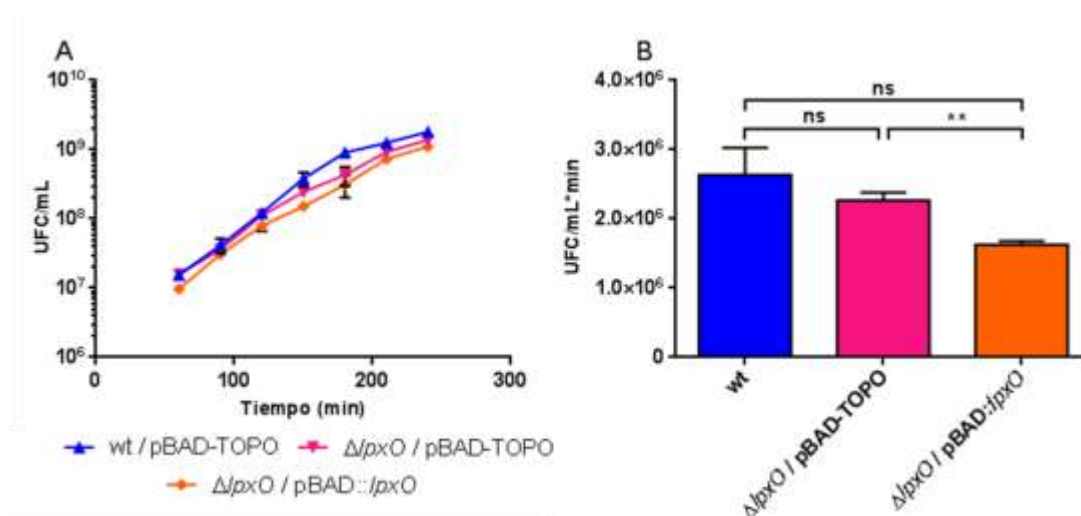


Figura 14. Efecto de la hidroxilación del lípido A sobre la cinética de crecimiento de *S. Enteritidis* *in vitro*. Curvas de crecimiento *in vitro* de la mutante $\Delta lpxO$ complementada *in trans* (♦) y de la cepa silvestre (▲) y mutante (▼) transformadas con el vector pBAD-TOPO vacío (A). Los cultivos se efectuaron en caldo LB sin suplementar, monitoreando el crecimiento por recuento bacteriano en agar LB suplementado con Kan y Amp (ver **Sección 5.18**). La velocidad específica de crecimiento (UFC/mL*min) de cada cepa (B) se determinó como la pendiente de la función lineal a la que cada curva se ajustó en su etapa exponencial (ver **Sección 5.19**). Se señala el error estándar asociado al promedio de tres réplicas biológicas. En el gráficos, el eje Y se estableció como escala logarítmica en base 10 en A y como escala lineal en B. (ns: no significativo; **p<0,01).

7.- DISCUSIÓN

Desde su entrada al hospedero, *Salmonella* está sometida a una serie de microambientes inductores de estrés, especialmente en su paso por el estómago, cuando alcanza el lumen del intestino o intracelularmente, luego de ser fagocitada por los macrófagos residentes en el subepitelio intestinal (**Fig. 1**) (Haraga *et al.*, 2008). Las condiciones ambientales en cada uno de estos sitios constituyen señales que activan mecanismos adaptativos en la bacteria, siendo uno de ellos la remodelación de su envoltura (Shen & Fang, 2012; Fàbrega & Vila, 2013).

La superficie más expuesta en la envoltura de bacterias Gram negativo es la membrana externa, cuya cara externa está mayoritariamente compuesta por el LPS. El dominio más interno del LPS es el lípido A, el cual funciona como un potente inductor de la respuesta inmune innata (Galanos *et al.*, 1985). *Salmonella*, como muchos otros patógenos Gram negativo, tiene un conjunto de enzimas que pueden remodelar la estructura del lípido A, lo que ayuda a la bacteria a sortear las defensas inmunológicas del hospedero (Wang & Quinn, 2010). Entre ellas, LpxO cataliza la hidroxilación del lípido A en *S. Typhimurium* (Gibbons *et al.*, 2000; Gibbons *et al.*, 2005; Gibbons *et al.*, 2008), modificación cuya relevancia en la interacción de *S. Enteritidis* con el hospedero se desconocía. Más aún, su impacto sobre el potencial inmunogénico del lípido A no había sido estudiado en el género *Salmonella*. Los resultados obtenidos en esta tesis indican que el grado de hidroxilación del lípido A de *S. Enteritidis* es relevante para su internalización en macrófagos murinos, como también para la supervivencia intracelular del patógeno en estas células. Además, se muestra que la alteración del nivel de hidroxilación del lípido A genera graves defectos en la colonización intestinal y sistémica de *S. Enteritidis* en ratones. Por último, la hidroxilación del lípido A también tiene efecto sobre la secreción de IL-6 por parte de macrófagos, siendo ésta la primera evidencia dentro del género *Salmonella* referida a que esta modificación podría influir sobre la inmunogenicidad del lípido A.

7.1.- Perfil de especies de lípido A determinado por los genes *lpxO* y *visP* en *S. Enteritidis*.

Para este estudio se usó *S. Enteritidis* NCTC13349 como cepa silvestre y a partir de ésta se generó una mutante $\Delta lpxO$. La cepa silvestre mostró un fenotipo de lípido A en que

coexisten especies no hidroxiladas e hidroxiladas cuando se cultivó aeróbicamente en medio mínimo E. Esto concuerda con observaciones previas, donde se encontró este mismo perfil de especies de lípido A para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* crecidas bajo estas condiciones (Fernández *et al.*, 2018). Por su parte, en el espectro de masas del lípido A obtenido a partir de la mutante $\Delta lpxO$ de *S. Enteritidis*, se observaron únicamente las señales de las especies no hidroxiladas (**Fig. 9B**). Este perfil tiene coherencia con la delección de *lpxO*, ya que en ausencia de la enzima codificada por el gen, la modificación no ocurre (Gibbons *et al.*, 2000; Gibbons *et al.*, 2005). A fin de complementar el fenotipo mutante, la cepa $\Delta lpxO$ se transformó con el plasmidio recombinante pBAD::*lpxO*, que contiene una copia silvestre del gen *lpxO* incluyendo su región promotora. Sorprendentemente, en la mutante $\Delta lpxO$ complementada no se restableció la distribución silvestre de las especies de lípido A para *S. Enteritidis*, sino que se observó exclusivamente la producción especies hidroxiladas (**Fig. 9F**). Esta hidroxilación exacerbada del lípido A se podría atribuir a una sobreexpresión del gen *lpxO*, consecuencia del alto número de copias del vector utilizado, sumado a la elevada expresión basal del gen en *Salmonella* (Gibbons *et al.*, 2005). Así, se dispuso de tres cepas de *S. Enteritidis* con distintos niveles de hidroxilación en su lípido A para evaluar el efecto de esta modificación sobre la virulencia *in vivo* e *in vitro*.

Es importante mencionar que la delección del gen *visP* no afectó el número, distribución ni abundancia de las especies de lípido A producido por *S. Enteritidis* (**Fig. 9C**), a diferencia de *S. Typhimurium* donde la delección del gen causa un enriquecimiento significativo de las especies hidroxiladas (Moreira *et al.*, 2013). En esta bacteria se hipotetiza que VisP actuaría como un inhibidor de la actividad enzimática de LpxO; sin embargo, el gen *visP* también determina fenotipos independientes de LpxO, como la resistencia a CAMPs. Además, *visP* está presente en el genoma de bacterias que carecen del gen *lpxO* (Moreira *et al.*, 2013; Matson *et al.*, 2017). Por lo tanto, no se puede descartar que en *S. Enteritidis* el gen *visP* esté involucrado en otras funciones no relacionadas con el remodelamiento del lípido A. La mutante $\Delta visP$ tampoco alteró la liberación de IL-6 desde macrófagos RAW264.7 infectados (**Fig. 11**), lo cual es coherente con el hecho que la delección del gen *visP* no provocó ningún cambio en el perfil del lípido A producido por *S. Enteritidis*.

7.2.- Influencia de la hidroxilación del lípido A sobre la interacción de *S. Enteritidis* con macrófagos murinos

La hidroxilación del lípido A influyó drásticamente en la internalización y supervivencia intracelular de *S. Enteritidis* en macrófagos murinos RAW264.7. Cuando se deletó el gen *lpxO*, que conduce a un lípido A no hidroxilado (**Fig. 9B**), la internalización de la bacteria aumentó ~120 veces (**Fig. 10A**). Este resultado se opone a la hipótesis de esta tesis, ya que indica que la hidroxilación no favorece la internalización, sino que, por el contrario, contribuye a que *S. Enteritidis* escape de la fagocitosis por parte de macrófagos. Considerando la baja disponibilidad de oxígeno que *Salmonella* enfrenta en el intestino (Haraga *et al.*, 2008; Hèbrard *et al.*, 2011), la bacteria tendría un lípido A mayoritariamente no hidroxilado que podría provocar que sea fagocitada más eficientemente por macrófagos en el subepitelio intestinal, proceso que es indispensable para que la bacteria se disemine por el organismo (Vazquez-Torres *et al.*, 1999).

Cuando la hidroxilación del lípido A se describió en *S. Typhimurium*, no se encontró efecto de la modificación sobre su capacidad para invadir y replicarse dentro de macrófagos murinos RAW264.7 (Gibbons *et al.*, 2005). A pesar que entre *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* existe una gran similitud a nivel genómico (Thompson *et al.*, 2008) y patogénico (Silva *et al.*, 2012), corresponden a serovares distintos, en consecuencia, la hidroxilación del lípido A no tendrá necesariamente una contribución reproducible en el comportamiento de ambas bacterias, aún interactuando con la misma línea celular. Por otra parte, en células epiteliales se ha observado que mutantes $\Delta lpxO$ de *S. Typhimurium* desarrollan una menor invasión (Moreira *et al.*, 20013). El ingreso de *Salmonella* a células epiteliales ocurre a través de una endocitosis inducida por efectores bacterianos translocados hacia el citoplasma celular por el T3SS codificado en la SPI-1, proceso que difiere ampliamente de la fagocitosis que sufre la bacteria por parte de los macrófagos (Vazquez-Torres *et al.*, 1999). Es por ello que la delección del gen *lpxO* podría determinar un fenotipo de internalización para *S. Enteritidis* en macrófagos murinos distinto al de *S. Typhimurium* en células epiteliales no fagocíticas.

Si la total ausencia de hidroxilación en el lípido A de la mutante $\Delta lpxO$ incrementó la internalización de *S. Enteritidis* en macrófagos, se podría suponer que este fenotipo sería revertido en la mutante complementada en *trans*, debido a que su lípido A está completamente hidroxilado. Sin embargo, aunque la mutante $\Delta lpxO$ complementada en *trans* se internalizó significativamente menos que la mutante sin complementar, no alcanzó los bajos niveles de

internalización de la cepa silvestre (**Fig. 10B**). Algo similar ocurrió con la supervivencia intracelular de *S. Enteritidis*, donde la mutante $\Delta lpxO$ (**Fig. 10C**) y la mutante complementada en *trans* (**Fig. 10D**) resultaron igualmente incapaces de sobrevivir y proliferar al interior de macrófagos, en comparación con la cepa silvestre, deficiencia que es más acentuada a tiempos largos de infección. Estas observaciones sugieren que la capacidad de *S. Enteritidis* para modular su fagocitosis por parte de macrófagos murinos y luego para sobrevivir intracelularmente, requeriría de una adecuada proporción de lípido A hidroxilado y no hidroxilado en la membrana externa, tal como ocurre en la cepa silvestre (**Fig. 9A**). Esto es congruente con lo descrito en *S. Typhimurium*, donde la nula o excesiva hidroxilación del lípido A disminuyen la supervivencia del serovar en macrófagos J774 (Moreira *et al.*, 2013). En este control fino del nivel de hidroxilación del lípido A, la disponibilidad de oxígeno sería de gran relevancia ya que, como recientemente demostró nuestro grupo, el oxígeno constituye una señal positiva para la transcripción de *lpxO* y, consecuentemente, para la hidroxilación del lípido A de *S. Enteritidis* (Fernández *et al.*, 2018).

Por otra parte, en los macrófagos *Salmonella* está contenida intracelularmente dentro de un fagosoma, donde debe soportar un pH medianamente ácido (5.0) y la presencia de agente bacteriolíticos, como CAMPs y ROS/RNS (Alpuche-Aranda *et al.*, 1992; Bader *et al.*, 2003; Vazquez-Torres & Fang, 2001). La resistencia a estrés ácido y oxidativo es reducida por cambios en la hidroxilación del lípido A en *S. Typhimurium* (Moreira. *Et al.*, 2013), los cuales también alteran la permeabilidad de su membrana (Murata *et al.*, 2007). Es así como la falta de lípido A hidroxilado en la mutante $\Delta lpxO$ y su exceso en la mutante complementada en *trans*, podrían aumentar la susceptibilidad de *S. Enteritidis* a las condiciones de estrés existentes en macrófagos, afectando la capacidad de la bacteria para sobrevivir en su interior. Se requieren experimentos adicionales para esclarecer si la hidroxilación del lípido A afecta la sensibilidad de *S. Enteritidis* a agentes estresores de membrana, como los encontrados en el fagosoma de los macrófagos.

7.3.- Impacto de la hidroxilación del lípido A sobre la inmunogenicidad de *S. Enteritidis* *in vitro*

La respuesta inflamatoria montada por macrófagos murinos ante la infección por *S. Enteritidis*, es otro de los aspectos en que los cambios en la hidroxilación del lípido A ocasionaron alteraciones. Ante la ausencia de la modificación, las propiedades inmunogénicas

del lípido A de *S. Enteritidis* se acentuaron, siendo mayor la secreción de IL-6 por macrófagos RAW264.7 cuando se desafiaron con la mutante $\Delta lpxO$ (**Fig. 11**). Este es un fenómeno que hasta ahora no se había observado en el género *Salmonella*, pero que concuerda con hallazgos obtenidos en *K. pneumoniae*, donde mutantes $\Delta lpxO$ estimulan una mayor producción *in vitro* de TNF- α en macrófagos murinos e inducen una mayor expresión *in vivo* de la citoquina en ratones (Llobet *et al.*, 2015). Los serovares no tifoideos de *Salmonella*, tales como *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, usualmente desencadenan una potente respuesta inflamatoria en el intestino de su hospedero, generando un nicho con presencia de sustratos que la bacteria puede metabolizar para competir con la microbiota comensal. Esta inflamación también promueve la excreción del patógeno hacia el ambiente, facilitando su transmisión por vía fecal-oral (Rivera-Chávez & Bäumlér, 2015). En concordancia con esto, *Salmonella* produciría lípido A mayoritariamente no hidroxilado y con un mayor potencial proinflamatorio en el microambiente anaeróbico del lumen intestinal, lo que podría contribuir a una mayor capacidad de colonización *in vivo* (Fernández *et al.*, 2018).

La actividad del lípido A como inmunógeno depende de su reconocimiento por el receptor TLR4, que es expresado en macrófagos (monocitos), neutrófilos, células dendríticas, linfocitos y células endoteliales (Raetz & Whitfield, 2002; Akira *et al.*, 2006). La activación del TLR4 promueve la transcripción de más de 1000 genes (Bjorkbacka *et al.*, 2004), llevando a una respuesta inmune pleiotrópica que entre muchos eventos incluye la secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Dinarello, 1991; Takeuchi & Akira, 2010). El receptor TLR4 es activado como consecuencia de una dimerización inducida por la unión del lípido A, en un proceso en que las cadenas de ácidos grasos y los grupos fosfato desempeñan un rol crucial. Modificaciones de la estructura canónica del lípido A (**Fig. 2^a**) definen su carácter agonista o antagonista hacia el TLR4 (Akashi *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 2008; Ohto *et al.*, 2012), ya sea por incorporación de motivos sobre los fosfatos terminales o variación del número de cadenas acilo (Brandenburg, *et al.*, 1993; Seydel *et al.*, 2000). Prueba de esto es que la adición de L-Ara4N sobre el fosfato 4' por ArnT, la palmitoilación en la posición 2 por PagP, o la remoción de cadenas aciladas desde el carbono 3 por PagL y el carbono 3' por LpxR (**Fig. 3**), son todos cambios que aminoran la inmunogenicidad del lípido A en *Salmonella* (Trent *et al.*, 2001b; Kawasaki *et al.*, 2004; Kawasaki *et al.*, 2005; Reynolds *et al.*, 2006; Kawano *et al.*, 2010). Como la hidroxilación catalizada por LpxO también se produce sobre una cadena de ácido grado (carbono 2 de la acilación secundaria de la posición 3') del lípido A (**Fig. 2B**) (Gibbons *et al.*, 2000; Gibbons *et al.*, 2008), esta modificación podría

debilitar el agonismo del lípido A de *S. Enteritidis* hacia el TLR4, al igual como ocurriría en *K. pneumoniae* (Llobet *et al.*, 2015). La dimerización del TLR4 necesita del correcto posicionamiento de cinco de las seis cadenas acilo del lípido A canónico dentro de un bolsillo hidrofóbico en el receptor (Park *et al.*, 2009; Ohto *et al.*, 2012). La hidroxilación catalizada por LpxO se produce precisamente en una de esas cinco cadenas. Si la modificación implica una alteración de polaridad y/o conformación, podría perturbar el acceso de la cadena a la cavidad hidrofóbica y con ello, interferir en la activación del TLR4. En un hospedero, cuando la concentración de LPS libre es baja, la detección del lípido A requiere de la proteína de fase aguda LBP (*LPS Binding Protein*) y del coreceptor CD14, que puede ser soluble o estar anclado a membranas celulares. La proteína LBP extrae al LPS desde la membrana de la bacteria y lo transfiere a CD14, el cual a su vez lo presenta al receptor TLR4 (Wurfel *et al.*, 1995; Wurfel & Wright, 1997). La hidroxilación del lípido A podría también comprometer la interacción del LPS con LBP y/o CD14, contribuyendo al efecto inmunomodulador de la modificación *in vivo*. Sin embargo, a través de ensayos de estimulación *in vitro* en ausencia de LBP y CD14, como los efectuados en este trabajo, no es posible evaluar la contribución de ambos factores.

Las cepas de *S. Enteritidis* utilizadas en los ensayos de infección *in vitro* de macrófagos RAW264.7 sólo difieren en la presencia, ausencia o número de copias del gen *lpxO* y, por ende, virtualmente sólo varían en su perfil de hidroxilación del lípido A. No obstante, *Salmonella* tiene una multitud de otros antígenos (Mastroeni *et al.*, 2001) que también podrían haber aportado a la alteración de la secreción de IL-6 observada aquí. Estos antígenos podrían estimular en los macrófagos una activación tan intensa que enmascare el efecto de la hidroxilación sobre la inmunogenicidad el lípido A. Para evaluar esta posibilidad, se debería repetir los ensayos, pero desafiando a los macrófagos con un extracto de LPS o lípido A purificado, asegurando que sea el único estímulo inductor del sistema.

7.4.- Participación de la hidroxilación del lípido A sobre la colonización intestinal y sistémica de *S. Enteritidis* en un modelo murino.

Cuando se produjo un desbalance en la hidroxilación del lípido A, se observó un potenciamiento de la internalización de *S. Enteritidis* en macrófagos murinos (**Fig. 10A–B**), pero una deficiencia en la supervivencia intracelular del patógeno (**Fig. 10 C–D**). Por su parte, en ausencia de la modificación, la respuesta inflamatoria desarrollada por los macrófagos

frente a la bacteria se intensificó. Estas situaciones podrían ser la causa que subyace a la capacidad de colonización deficiente que presentó la mutante $\Delta lpxO$ (**Fig. 11A**) y la mutante complementada en *trans* (**Fig. 11B**) en un ensayo de infección por vía oral en ratones C57BL/6. Así, la menor recuperación de mutantes en el ciego, especialmente notoria en el caso de la mutante $\Delta lpxO$ sin complementar (**Fig. 11C**), se podría explicar dado que las bacterias serían fagocitadas y degradadas de manera más eficiente por parte de los macrófagos, esto último probablemente es producto de una menor resistencia a las condiciones bactericidas al interior de los fagocitos, como se discutió anteriormente. Además, la mutante $\Delta lpxO$ induce a que macrófagos liberen una gran cantidad de IL-6, citoquina pro-inflamatoria que participa en la defensa contra patógenos mediante el reclutamiento de polimorfonucleares (PMN), la generación de estrés oxidativo y la producción de CAMPs en el subepitelio del intestinal (Scheller *et al.*, 2011). Aunque *Salmonella* se beneficia de un contexto inflamatorio en el intestino (Rivera-Chávez & Bäumlér, 2015), una respuesta inmune tan extrema como la que desencadena la mutante comparada con la cepa silvestre (**Fig. 11**) podría igualmente eliminar a la bacteria. Complementariamente, la baja recuperación de las mutantes desde órganos internos, en específico desde el bazo para la mutante $\Delta lpxO$ complementada en *trans* (**Fig. 12D**), podría ser el resultado de su incapacidad para sobrevivir y replicarse dentro de los macrófagos, lo que les impediría utilizarlos como vehículos para diseminarse sistémicamente, como lo hacen algunos serovares de *Salmonella* durante el curso de la infección en un hospedero (Vazquez-Torres *et al.*, 1999).

Tanto en el contexto intestinal como sistémico de la virulencia *in vivo* de *S. Enteritidis*, los defectos de la mutante $\Delta lpxO$ y de la mutante complementada en *trans* también podrían ser ocasionados directamente por un aumento en la actividad bactericida de los macrófagos. En respuesta al desequilibrio en la hidroxilación del lípido A, se podrían activar los mecanismos bactericidas de macrófagos, como ocurre por ejemplo con la modificación catalizada por la lipasa LpxR, que en *S. Typhimurium* reduce la síntesis de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en macrófagos RAW264.7 (Kawano *et al.*, 2010).

7.5.- Selección negativa de la mutante $\Delta lpxO$ de *S. Enteritidis* complementada en *trans* durante la infección *in vivo* y la alteración de su cinética de crecimiento *in vitro*

En los ensayos de infección *in vivo* de *S. Enteritidis* en el hospedero murino, todas las cepas llevaban en su genoma un *cassette* de resistencia a Kan como marcador cromosómico para su selección. Adicionalmente, la mutante $\Delta lpxO$ complementada en *trans*, así como las

cepas silvestre y mutante transformadas con el vector pBAD-TOPO vacío tenían resistencia a Carb/Amp. Al respecto, es importante mencionar que durante los ensayos los ratones no se trataron con Carb o Amp, antibióticos que seleccionan la mantención estable de los derivados del vector pBAD-TOPO, existiendo, por lo tanto, el riesgo que las cepas transformantes perdieran el vector por segregación durante su paso por el animal (Imanaka *et al.*, 1981; Boe *et al.*, 1987). Sin embargo, esto ocurrió sólo en la mutante complementada en *trans* (**Fig. 13A**), lo que sugiere que esta cepa mutante fue sometida a una selección negativa en el hospedero debido a la hidroxilación excesiva de su lípido A. Ciertamente, la pérdida del vector *in vivo* en la mutante complementada en *trans* también podría ser ocasionada por el estrés metabólico que causa la replicación de pBAD-TOPO en las bacterias, al ser éste un plasmidio con un alto número de copias (Popov *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012b). A pesar de esto, la inestabilidad no se manifestó en ninguna de las cepas control (transformadas con el vector vacío), apoyando la hipótesis que la selección negativa en el hospedero resultó de la hidroxilación excesiva del lípido A en la mutante complementada en *trans*. Otra explicación para la pérdida del plasmidio en la mutante complementada en *trans* se relaciona con el hecho que la sobreexpresión de genes que codifican proteínas de membrana suele ser tóxico para la bacteria (Preston, 2003) y LpxO se ha descrito como una proteína localizada en la membrana plasmática (Gibbons *et al.*, 2000; Doerrler *et al.*, 2004; Gibbons *et al.*, 2008). A pesar que la sobreexpresión del gen *lpxO* en la mutante complementada en *trans* produjo una demora en la cinética de crecimiento *in vitro* de *S. Enteritidis* en un medio rico en nutrientes, esta perturbación no afectó la generación de biomasa total de la bacteria en cultivo (**Fig. 14**). A diferencia de otros genes que codifican proteínas de membrana, la sobreexpresión de *lpxO* no afectaría de manera tan profunda el crecimiento bacteriano, posiblemente debido a que LpxO sólo se inserta en la cara citoplasmática de la membrana interna a través de dominios hidrofóbicos en sus extremos N- y C-terminal (Doerrler *et al.*, 2004; Gibbons *et al.*, 2008). Esto no causaría un cambio estructural tan drástico en la membrana, como el que se produce por la incorporación proteínas integrales de membrana (Wagner *et al.*, 2007; Gubellini *et al.*, 2011). En conjunto, estas observaciones apoyan la idea que es la excesiva hidroxilación del lípido A la que lleva a la pérdida del plasmidio en la mutante complementada en *trans*, lo que a su vez podría explicar el fenotipo atenuado que esta mutante mostró sistémicamente en el modelo de infección animal (**Fig. 11D**).

Además de ser una proteína de membrana interna, LpxO modifica la estructura del lípido A, que es la porción hidrofóbica que mantiene al LPS anclado a la membrana externa

como uno de los componentes mayoritarios en su cara externa (Molinaro *et al.*, 2014; Giuliani *et al.*, 2010). La hidroxilación catalizada por LpxO se ha asociado a una mayor estabilidad y menor permeabilidad de la membrana externa, por el establecimiento de enlaces tipo puente de hidrógeno entre los grupos OH de moléculas de lípido A hidroxilado adyacentes (Nikaido, 2003; Murata *et al.*, 2007). De esta forma, el exceso de lípido A hidroxilado por la sobreexpresión de *lpxO* podría interferir con la fluidez de la membrana, alterando así el crecimiento de *S. Enteritidis*. Bajo ese mismo razonamiento, también se esperaría que la delección del gen *lpxO*, por ausencia de la hidroxilación en el lípido A, influyera negativamente sobre el crecimiento de la bacteria a consecuencia de algún deterioro de la membrana. No obstante, dicha idea no es sugerida por los resultados de esta tesis, ni por lo anteriormente observado en *S. Typhimurium* (Gibbons *et al.*, 2008). Se deberían efectuar ensayos de sensibilidad a agentes estresores de membrana, empleando la mutante $\Delta lpxO$ y la mutante complementada en *trans*, para determinar si la hidroxilación del lípido A efectivamente repercute sobre la integridad de la envoltura en *S. Enteritidis*.

7.6.- Hidroxilación del lípido A en el marco de la infección por *Salmonella*

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten proponer un modelo sobre la relevancia de la hidroxilación del lípido A en el desarrollo exitoso de la infección por *Salmonella* en un hospedero (**Fig. 15**).

A lo largo del ciclo infectivo de *Salmonella* se establece un gradiente decreciente en cuanto a la concentración de oxígeno. En el ambiente, previo al ingreso a su hospedero, *Salmonella* está expuesta a una alta presión parcial de oxígeno (pO_2) que permitiría que su lípido A esté mayoritariamente hidroxilado. La disponibilidad de oxígeno disminuye paulatinamente en la medida que la bacteria avanza por el tracto gastrointestinal hasta alcanzar una baja pO_2 en el lumen del intestino delgado (Marteyn *et al.*, 2011), frente a lo cual el lípido A de *Salmonella* estaría preferentemente no hidroxilado. Continuando con la infección, *Salmonella* penetra la barrera de células epiteliales y accede al sub-epitelio, donde interactúa con distintas células inmunes, entre las que se incluye principalmente a macrófagos (Vazquez-Torres *et al.*, 1999). Ante esta situación, el bajo nivel de hidroxilación de lípido A favorecería que la bacteria sea fagocitada por macrófagos. Una vez al interior de los macrófagos, *Salmonella* podría recuperar la hidroxilación de su lípido A, potenciando su supervivencia intracelular. De esta manera, al modular la hidroxilación de su lípido A, *Salmonella* sería

primero fagocitada más eficientemente por macrófagos y luego sobreviviría intracelularmente, pudiendo utilizarlos como vehículos para su diseminación sistémica hacia órganos internos (Sinnott & Teall, 1987; Vazquez-Torres *et al.*, 1999; Wain *et al.*, 2001).

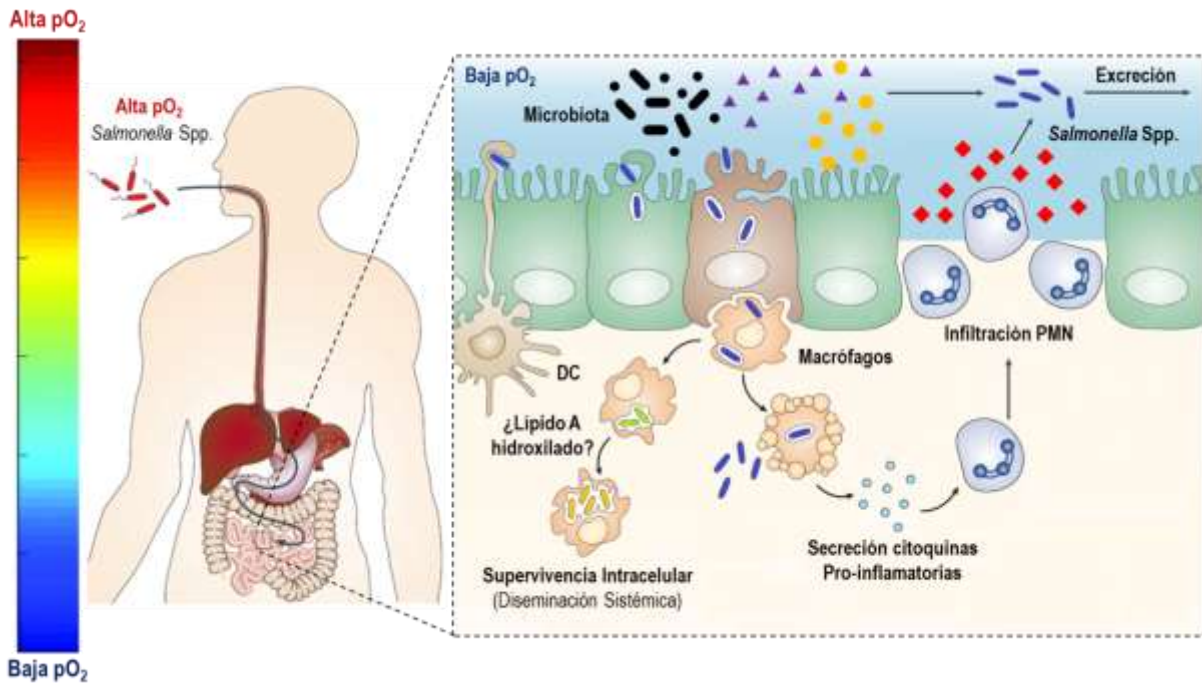


Figura 15. Posible rol de la hidroxilación del lípido A en la colonización intestinal y diseminación sistémica de *Salmonella*. El gradiente de oxígeno que existe a lo largo del tracto gastrointestinal es representado por la barra de colores, donde el rojo corresponde a una alta pO_2 en el ambiente y el azul a una baja pO_2 en el lumen intestinal del hospedero. El nivel de hidroxilación del lípido A de *Salmonella*, en virtud de la disponibilidad de oxígeno del microambiente, es señalado mediante la misma escala de colores que la pO_2 ; en que el rojo representa un lípido A mayoritariamente hidroxilado y el azul un lípido A preferentemente no hidroxilado. Como resultado de la inflamación inducida por la infección de *Salmonella*, se generan ciertos sustratos, provenientes de la microbiota (\blacktriangle) o de los enterocitos (\bullet), así como también aceptores de electrones alternativos que derivan de las especies reactivas (\blacklozenge) liberadas por PMN. *Salmonella* puede utilizar estos recursos para mantener su metabolismo energético (ver **Sección 7.6**). pO_2 : presión parcial de oxígeno; DC: células dendríticas; PMN: polimorfonucleares. Adaptado de Sansonetti *et al.*, 2004; Haraga *et al.*, 2008; Rivera-Chávez & Bäumlér, 2015; Spiga *et al.*, 2017; Gillis *et al.*, 2018.

En otro ámbito de la interacción de *Salmonella* con macrófagos, la baja hidroxilación del lípido A derivada de la condición anaeróbica en el intestino, causaría que la bacteria induzca una mayor secreción de citoquinas pro-inflamatorias, las cuales promueven el reclutamiento e infiltración de neutrófilos hacia el sub-epitelio y lumen intestinal (McCormick *et al.*, 1995). Como parte de la respuesta inflamatoria tendiente a eliminar a *Salmonella*, los neutrófilos liberan especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS), no obstante, la inflamación generada crea un nicho al que la bacteria puede adaptarse para proliferar eficientemente mediante cambios en su metabolismo (Rivera-Chávez & Bäumlér, 2015).

Compuestos oxidados derivados de ROS/RNS, como lo son el nitrato o el tetrionato, pueden ser utilizados como aceptores de electrones alternativos por *Salmonella* para desarrollar un ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) completo aun en ausencia de oxígeno, pudiendo metabolizar oxidativamente sustratos cuya fermentación es ineficiente, como succinato, etanolamina, lactato y otros (Spiga *et al.*, 2017; Gillis *et al.*, 2018). La disponibilidad de estos sustratos se incrementa en el lumen del intestino, ya sea por una disbiosis de la microbiota comensal o una variación en el metabolismo de las células del epitelio, todo como consecuencia de la inflamación inducida por la infección por *Salmonella* (Spiga *et al.*, 2017; Gillis *et al.*, 2018). De este modo, un contexto inflamatorio le resulta ventajoso a *Salmonella* para competir y colonizar el intestino en desmedro de la microbiota del hospedero.

Además de ayudar a la colonización del intestino, la inflamación también produce la diarrea característica del cuadro de gastroenteritis por *Salmonella*, lo que potencia la transmisión fecal-oral de la bacteria al facilitar su excreción hacia el ambiente (Rivera-Chávez & Bäumler, 2015).

7.7.- Perspectivas finales

Los resultados de esta tesis apuntan a que el balance en los niveles de hidroxilación del lípido A en *S. Enteritidis*, como aquel que existe en la cepa silvestre (**Fig. 9A**), es crítico para la virulencia de la bacteria. Esto implica que la hidroxilación, así como otras modificaciones del lípido A (Needham & Trent, 2013), debe ser finamente regulada. El hecho que la hidroxilación del lípido A sea independiente de los sistemas de dos componentes PhoP-PhoQ y PmrA-PmrB (Gibbons *et al.*, 2005), junto con que en esta tesis no se encontró participación de VisP en el control de la modificación en *S. Enteritidis* (**Fig. 9C**), como sí lo hace en *S. Typhimurium* (Moreira *et al.*, 2013), permiten suponer la intervención de otros reguladores. Recientemente, nuestro grupo identificó a los reguladores globales Fnr y ArcA como participantes en la regulación de la hidroxilación del lípido A de *S. Enteritidis*, controlando directamente la transcripción del gen *lpxO* por unión a cajas presentes en su promotor (Fernández *et al.*, 2018). Análogamente, el gen *pagP* que codifica la enzima encargada de la palmitoilación del lípido A (Guo *et al.*, 1997; Kawasaki *et al.*, 2007) también estaría sometido a una regulación similar (Fernández *et al.*, 2018.). Estas son las primeras evidencias que vinculan a Fnr y ArcA con la modificación del lípido A en *S. Enteritidis*, proponiendo al

oxígeno como una señal ambiental clave para el remodelamiento de la envoltura de *Salmonella*.

El objetivo central de esta tesis se enfocó en dilucidar el efecto fisiológico que la hidroxilación del lípido A, catalizada por la enzima dioxigenasa LpxO (Gibbons *et al.*, 2000; Gibbons *et al.*, 2008), tiene sobre la interacción de *S. Enteritidis* con su hospedero, aportando así a la comprensión de la patogénesis de un serovar de *Salmonella* con gran importancia para la salud pública y la industria de producción animal (Guard-Petter, 2001; Antunes *et al.*, 2016). Los resultados obtenidos respaldan en su mayoría a la hipótesis formulada, en relación a que la ausencia de la modificación por delección del gen *lpxO* provoca una reducción en la virulencia de *S. Enteritidis*. Sorprendentemente, también se determinó que la hidroxilación excesiva del lípido A por sobreexpresión del gen tuvo un impacto igualmente perjudicial para la bacteria, tal como se había descrito para *S. Typhimurium* (Moreira *et al.*, 2013).

El nivel adecuado de hidroxilación del lípido A favorecería a que en el subepitelio intestinal, donde el ambiente anaeróbico conduciría a un bajo nivel de hidroxilación del lípido A, *S. Enteritidis* en un comienzo controle su fagocitosis por macrófagos y que después sobreviva y se replique intracelularmente. Esto, combinado con el efecto inmunomodulador de la modificación sobre la respuesta inflamatoria local, dificultaría la eliminación de la bacteria y promovería la colonización del intestino. Además, la supervivencia intracelular en macrófagos, a la cual contribuye el balance de la hidroxilación del lípido A, también permitiría que *S. Enteritidis* use a estos fagocitos como vectores de diseminación sistémica para alcanzar órganos internos. En todos estos aspectos críticos para la infección de *Salmonella* en un hospedero (Vazquez-Torres *et al.*, 1999; Haraga *et al.*, 2008), las mutantes de *S. Enteritidis* con un lípido A sin hidroxilar o totalmente hidroxilado, presentaron fenotipos con graves deficiencias. La elevada secreción de IL-6 desde macrófagos murinos desafiados *in vitro* con la mutante cuyo lípido A no está hidroxilado (**Fig. 11**) resultó en el fenotipo de mayor interés, al sugerir que la hidroxilación del lípido A afecta su potencial inflamatorio. Aunque en *K. pneumoniae* ya se había reportado que la hidroxilación del lípido A disminuye su inmunogenicidad (Llobet *et al.*, 2015), es la primera vez que se tiene evidencia del mismo fenómeno en *S. Enteritidis* y, más importante aún, dentro de todo el género *Salmonella*, constituyendo el principal aporte de este trabajo.

8.- CONCLUSIONES

- En condiciones aeróbicas de crecimiento con limitación de nutrientes, *S. Enteritidis* desarrolla un fenotipo de lípido A en que coexisten especies hidroxiladas y no hidroxiladas en una distribución definida y abundancia característica.
- La delección del gen *lpxO* de *S. Enteritidis* conduce a una ausencia total de la hidroxilación del lípido A, mientras que su sobreexpresión en *trans* produce un fenotipo en que únicamente existen especies hidroxiladas de lípido A. Esta es una evidencia genética que confirma que el gen *lpxO* codifica la enzima que cataliza la hidroxilación del lípido A en el serovar *Enteritidis*, al igual que ocurre en *S. Typhimurium*, donde la modificación se describió originalmente.
- *VisP* no interviene en la modificación de la estructura del lípido A en *S. Enteritidis*.
- El desbalance de la hidroxilación del lípido A afecta negativamente la interacción de *S. Enteritidis* con macrófagos murinos durante una infección *in vitro*, perjudicando la capacidad de la bacteria para modular su fagocitosis y sobrevivir intracelularmente.
- La inmunogenicidad del lípido A como endotoxina se incrementa en ausencia de la hidroxilación en *S. Enteritidis* por delección del gen *lpxO*. Contrariamente, la delección de *visP* no altera el potencial pro-inflamatorio del lípido A de la bacteria.
- *S. Enteritidis* requiere de la hidroxilación del lípido A en una proporción adecuada para colonizar el intestino y los órganos internos en un hospedero murino, siendo la excesiva hidroxilación del lípido A particularmente negativa a la propagación sistémica de la bacteria.
- La hidroxilación del lípido A no afecta la biomasa que alcanza *S. Enteritidis in vitro* en un medio rico en nutrientes, pero si influye sobre la cinética de su crecimiento durante la fase exponencial.

En definitiva, no es la mera presencia de la hidroxilación en el lípido A de *S. Enteritidis*, sino el adecuado nivel de la modificación lo que contribuye a la virulencia de la bacteria. Si bien el nivel de hidroxilación varía dependiendo de la disponibilidad de oxígeno,

dentro de la población de moléculas de LPS que componen la membrana externa de *S. Enteritidis* silvestre coexisten especies hidroxiladas y no hidroxiladas de lípido A en una cierta proporción. Este equilibrio ayudaría a *Salmonella* a modular su fagocitosis por macrófagos, sobrevivir en su interior y estimular una respuesta inflamatoria moderada, favoreciendo así la colonización intestinal y diseminación sistémica durante el curso de la infección de un hospedero.

9.- BIBLIOGRAFÍA

1. Akashi, S., Nagai, Y., Ogata, H., Oikawa, M., Fukase, K., Kusumoto, S., Kawasaki, K., Nishijima, M., Hayashi, S., Kimoto, M. & Miyake, K. (2001). Human MD-2 confers on mouse Toll-like receptor 4 species-specific lipopolysaccharide recognition. *Int. Immunol.* **12**: 1595–1599.
2. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* **124** (4): 783–801.
3. Alexander, C. & Rietschel, E. T. (2001). Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J. Endotoxin Res.* **7**: 167–202.
4. Alpuche-Aranda, C. M., Swanson, J. A., Loomis, W.P & Miller, S. I. (1992). *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 10079–10083.
5. Antunes, P., Mourão, J., Campos, J. & Peixe, L. (2015). Salmonellosis: the role of poultry meat. *Clin. Microbiol. Infect.* **22** (2): 110–121.
6. Bader, M. W., Navarre, W. W., Shiau, W., Nikaido, H., Frye, J. G., McClelland, M., Fang, F. C. & Miller, S. I. (2003). Regulation of *Salmonella* Typhimurium virulence gene expression by cationic antimicrobial peptides. *Mol. Microbiol.* **50**: 219–230.
7. Barthel, M., Hapfelmeier, S., Quintanilla-Martínez, L., Kremer, M., Rohde, M., Hogardt, M., Pfeffer, K., Rüssmann, H. & Hardt, W. D. (2003). Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect. Immun.* **71**: 2839–2858.
8. Bjorkbacka, H., Fitzgerald, K. A., Huet, F., Li, X., Gregory, J. A., Lee, M. A., Ordija, C. M., Dowley, N. E., Golenbock, D. T. & Freeman, M. W. 2004. The induction of macrophage gene expression by LPS predominantly utilizes Myd88-independent signaling cascades. *Physiol. Genomics.* **19**: 319–330.
9. Blanc-Potard, A. B. & Groisman, E. A. (1997). The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J.* **16** (17): 5376–5385.
10. Boe, L., Gerdes, K. & Molin, S. (1987). Effects of genes exerting growth inhibition and plasmid stability on plasmid maintenance. *J. Bacteriol.* **169** (10): 4646–4650.
11. Bogomolnaya, L. M., Santiviago, C. A., Yang, H. J., Baumler, A. J. & Andrews-Polymenis, H. L. (2008). ‘Form variation’ of the O12 antigen is critical for persistence of *Salmonella* Typhimurium in the murine intestine. *Mol. Microbiol.* **70**: 1105–1119.
12. Bos, M. P., Tefsen, B., Geurtsen, J. & Tommassen, J. (2004). Identification of an outer membrane protein required for the transport of lipopolysaccharide to the bacterial cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**: 9417–9422.
13. Brandenburg, K., Mayer, H., Koch, M. H., Weckesser, J., Rietschel, E. T. & Seydel U. (1993). Influence of the supramolecular structure of free lipid A on its biological activity. *Eur. J. Biochem.* **218**: 555–563.
14. Bravo, D., Silva, C., Carter J. A., Hoare, A., Álvarez, S. A., Blondel, C. J., Zaldívar, M., Valvano, M. A. & Contreras, I. (2008). Growth-phase regulation of lipopolysaccharide O-antigen chain length influences serum resistance in serovars of *Salmonella*. *J. Med. Microbiol.* **57**:938-946.

15. Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R. & Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 2465–2467.
16. Caroff, M. & Novikov, A. (2011). Micromethods for lipid A isolation and structural characterization. *Methods Mol. Biol.* **739**: 135–146.
17. Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**(12): 6640–6645.
18. Dinarello, C. A. (1991). Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood.* **77**: 1627–1652.
19. Doerrler, W. T., Gibbons, H. S. & Raetz, C. R. (2004). MsbA-dependent translocation of lipids across the inner membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **279**: 45102–45109.
20. Ernst, R. K., Guina, T. & Miller, S. I. (2001). *Salmonella* Typhimurium outer membrane remodeling: role in resistance to host innate immunity. *Microbes Infect.* **3**: 1327–1334.
21. Fàbrega, A. & Vila, J. (2013) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin. Microbiol. Rev.* **26** (2): 308–341.
22. Fernández, P. A., Velásquez, F., Garcias-Papayani, H., Amaya, F. A., Ortega, J., Gómez, S., Santiviago, C. A & Álvarez, S. A. (2018). Fnr and ArcA regulate lipid A hydroxylation in *Salmonella* Enteritidis by controlling *lpxO* expression in response to oxygen availability. *Front. Microbiol.* **9**: 1220.
23. Fierer, J. & Guiney, D. G. (2001). Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. *J. Clin. Invest.* **107**: 775–780.
24. Freudenberg, M. A., Merlin, T., Gumenscheimer, M., Kalis, C., Landmann, R. & Galanos, C. (2001). Role of lipopolysaccharide susceptibility in the innate immune response to *Salmonella typhimurium* infection: LPS, a primary target for recognition of Gram-negative bacteria. *Microbes Infect.* **3**: 1213–1222.
25. Galán, J. E. (1996). Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol. Microbiol.* **20**: 263–271.
26. Galanos, C., Lüderitz, O., Rietschel, E. T., Westphal, O., Brade, H., Brade, L., Freudenberg, M., Schade, U., Imoto, M., Yoshimura, H., Kusumoto, S. & Shiba, T. (1985). Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur. J. Biochem.* **148**: 1–5.
27. Garcia-del Portillo, F., Foster, J. W. & Finlay, B. B. (1993). Role of acid tolerance response genes in *Salmonella* Typhimurium virulence. *Infect. Immun.* **61**, 4489–4492.
28. Gibbons, H. S., Kalb, S. R., Cotter, R. J. & Raetz, C. R. (2005). Role of Mg²⁺ and pH in the modification of *Salmonella* lipid A after endocytosis by macrophage tumour cells. *Mol. Microbiol.* **55**: 425–440.
29. Gibbons, H. S., Lin, S., Cotter, R. J. & Raetz, C. R. (2000). Oxygen requirement for the biosynthesis of the S-2-hydroxymyristate moiety in *Salmonella* Typhimurium lipid A. Function of LpxO, A new Fe²⁺/α-ketoglutarate-dependent dioxygenase homologue. *J. Biol. Chem.* **275**: 32940–33949.
30. Gibbons, H. S., Reynolds, C. M., Guan, Z., Raetz, C. R. (2008). An inner membrane dioxygenase that generates the 2-hydroxymyristate moiety of *Salmonella* lipid A. *Biochemistry.* **47**: 2814–2825.

31. Gillis, C. C., Hughes, E. R., Spiga, L., Winter, M. G., Zhu, W., Furtado de Carvalho, T., Chanin, R. B., Behrendt, C. L., Hooper, L. V., Santos, R. L. & Winter, S. E. (2018). Dysbiosis-associated change in host metabolism generates lactate to support *Salmonella* growth. *Cell Host Microbe*. **23** (1): 54–64.e6.
32. Giuliani, A., Pirri, G. & Rinaldi, A. C. (2010). Antimicrobial peptides: the LPS connection. *Methods Mol. Biol.* **618**: 137–154.
33. Grossman, N., Schmetz, M. A., Foulds, J., Klima, E. N., Jimenez-Lucho, V. E., Leive, L. L. & Joiner, K. A. (1987). Lipopolysaccharide size and distribution determine serum resistance in *Salmonella* Montevideo. *J. Bacteriol.* **169**: 856–863.
34. Guard-Petter, J. (2001). The chicken, the egg and *Salmonella* Enteritidis. *Environ. Microbiol.* **3**: 421–430.
35. Gubellini, F., Verdon, G., Karpowich, N. K., Luff, J. D., Boël, G., Gauthier, N., Handelman, S. K., Ades, S. E. & Hunt, J. F. (2011). Physiological response to membrane protein overexpression in *E. coli*. *Mol. Cell. Proteomics*. **10** (10): M111.007930.
36. Gunn, J. S. (2008). The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends Microbiol.* **16**: 284–290.
37. Gunn, J. S., Lim, K. B., Krueger, J., Kim, K., Guo, L., Hackett, M. & Miller, S. I. (1998). PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol. Microbiol.* **27**: 1171–1182.
38. Gunn, J. S., Ryan, S. S., Van Velkinburgh, J. C., Ernst, R. K. & Miller, S. I. (2000). Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect. Immun.* **68**: 6139–6146.
39. Guo, L., Lim, K. B., Gunn, J. S., Bainbridge, B., Darveau, R. P., Hackett, M. & Miller, S. I. (1997). Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes *phoP-phoQ*. *Science*. **276**: 250–253.
40. Hapfelmeier, S., Ehrbar, K., Stecher, B., Barthel, M., Kremer, M. & Hardt, W. D. (2004). Role of the *Salmonella* pathogenicity island 1 effector proteins SipA, SopB, SopE, and SopE2 in *Salmonella enterica* subspecies 1 serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infect. Immun.* **72**: 795–809.
41. Haraga, A., Ohlson, M. B. & Miller, S. I. (2008). Salmonellae interplay with host cells. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 53–66.
42. He, G., Shankar, R. A., Chzhan, M., Samouilov, A., Kuppusamy & P., Zweier, J. L. (1999). Noninvasive measurement of anatomic structure and intraluminal oxygenation in the gastrointestinal tract of living mice with spatial and spectral EPR imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**: 4586–4591.
43. Hèbrard, M., Kröger, C., Sivasankaran, S. K., Händler, K. & Hinton, J. C. (2011). The challenge of relating gene expression to the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22** (2): 200–210.
44. Hensel, M., Shea, J. E., Waterman, S. R., Mundy, R., Nikolaus, T., Banks, G., Vazquez-Torres, A., Gleeson, C., Fang, F. C. & Holden, D. W. (1998). Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* Pathogenicity Island 2 are

- required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol. Microbiol.* **3**: 163–174.
45. Hurley, D., McCusker, M. P., Fanning, S. & Martins, M. (2014). Salmonella–host interactions – modulation of the host innate immune system. *Front Immunol.* **5**: 481–492.
 46. Imanaka, T. & Aiba, S. (1981). A perspective on the application of genetic engineering: stability of recombinant plasmid. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **369**: 1–14.
 47. Jennewein, J., Matuszak, J., Walter, S., Felmy, B., Gendera, K., Schatz, V., Nowotny, M., Liesch, G., Hensel, M., Hardt, W. D., Gerlach, R. G. & Jantsch, J. (2015). Low oxygen tensions found in *Salmonella*-infected gut tissue boost *Salmonella* replication in macrophages by impairing antimicrobial activity and augmenting *Salmonella* virulence. *Cell Microbiol.* **17** (12): 1833–1847.
 48. Jones, B. D., Ghori, N. & Falkow, S. (1994). *Salmonella* Typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J. Exp. Med.* **180**: 15–23.
 49. Kawano, M., Manabe, T., Kawasaki, K. (2010). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lipopolysaccharide deacylation enhances its intracellular growth within macrophages. *FEBS Lett.* **584**: 207–212.
 50. Kawasaki, K., China, K. & Nishijima, M. (2007) Release of the lipopolysaccharide deacylase PagL from latency compensates for a lack of lipopolysaccharide aminoarabinose modification-dependent resistance to the antimicrobial peptide polymyxin B in *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* **189**: 4911–4919.
 51. Kawasaki, K., Ernst, R. K. & Miller, S. I. (2004). Deacylation and palmitoylation of lipid A by Salmonellae outer membrane enzymes modulate host signaling through Toll-like receptor 4. *J. Endotoxin Res.* **10**: 439–444.
 52. Kawasaki, K., Ernst, R. K. & Miller, S. I. (2005). Purification and characterization of deacylated and/or palmitoylated lipid A species unique to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Endotoxin Res.* **11**: 57–61.
 53. Kim, M. L. & Schlauch, J. M. (1999). Effect of acetylation (O-factor 5) on the polyclonal antibody response to *Salmonella typhimurium* O-antigen. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **26**: 83–92.
 54. Klumpp, J. & Fuchs, T. M. (2007). Identification of novel genes in genomic islands that contribute to *Salmonella typhimurium* replication in macrophages. *Microbiology.* **153**: 1207–1220.
 55. Kong, Q., Six, D. A., Liu, Q., Gu, L., Wang, S., Alamuri, P., Raetz, C. R. & Curtiss, R 3rd. (2012). Phosphate groups of lipid A are essential for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence and affect innate and adaptive immunity. *Infect. Immun.* **80**: 3215–3224.
 56. Lee, H., Hsu, F. F., Turk, J. & Groisman, E. A. (2004). The PmrA-regulated *pmrC* gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* **186**: 4124–4133.
 57. Liu, S. F. & Malik, A. B. (2006). NF-kappaB activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **290**: L622–L645.

58. Llobet, E., Martínez-Moliner, V., Moranta, D., Dahlström, K. M., Regueiro, V., Tomás, A., Cano, V., Pérez-Gutiérrez, C., Frank, C. G., Fernández-Carrasco, H., Insua, J. L., Salminen, T. A., Garmendia, J., Bengoechea, J. A. (2015). Deciphering tissue-induced *Klebsiella pneumoniae* lipid A structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **112**: E6369–E6378.
59. Ma, B., Reynolds, C. M. & Raetz, C. R. (2008) Periplasmic orientation of nascent lipid A in the inner membrane of an *Escherichia coli* LptA mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**: 13823–13828.
60. Maeshima, N & Fernandez, R. C. (2013). Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **3**: 1–13.
61. Maloy, S. R. (1990). *Experimental Techniques in Microbial Genetics*. Boston.
62. March, C., Regueiro, V., Llobet, E., Moranta, D., Morey, P., Garmendia, J. & Bengoechea, J. A. (2010). Dissection of host cell signal transduction during *Acinetobacter baumannii*-triggered inflammatory response. *PLoS One*. **5** (4): e10033.
63. Marolda, C. L., Lahiry, P., Vinés, E., Saldías, S. & Valvano, M. A. (2006). Micromethods for the characterization of lipid A-core and O-antigen lipopolysaccharide. *Methods Mol. Biol.* **347**: 237–252.
64. Marteyn, B., Scorza, F. B., Sansonetti, P. J. & Tang, C. (2011). Breathing life into pathogens: the influence of oxygen on bacterial virulence and host responses in the gastrointestinal tract. *Cell Microbiol.* **13** (2): 171–176.
65. Mastroeni, P., Chabalgoity, J., Dunstan, S. J., Maskell, D. J. & Dougan, G. (2001). *Salmonella*: immune responses and vaccines. *Vet. J.* **161** (2): 132–164.
66. Matson, J. S., Livny, J. & DiRita, V. J. (2017). A putative *Vibrio cholerae* two-component system controls a conserved periplasmic protein in response to the antimicrobial peptide polymyxin B. *PLoS One*. **12** (10): e0186199.
67. McCormick, B. A., Miller, S. I., Carnes, D. & Madara, J. L. (1995). Transepithelial signaling to neutrophils by salmonellae: a novel virulence mechanism for gastroenteritis. *Infect. Immun.* **63**: 2302–2309.
68. McQuiston, J. R., Herrera-Leon, S., Wertheim, B. C., Doyle, J., Fields, P. I., Tauxe, R. V. & Logsdon, J. M. (2008). Molecular phylogeny of the Salmonellae: relationships among *Salmonella* species and subspecies determined from four housekeeping genes and evidence of lateral gene transfer events. *J. Bacteriol.* **190**: 7060–7067.
69. Michetti, P., Mahan, M. J., Slauch, J. M., Mekalanos, J. J. & Neutra, M. R. (1992). Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella* Typhimurium. *Infect. Immun.* **60**: 1786–1792.
70. Miller, I., Maskell, D., Hormaeche, C., Johnson, K., Pickard, D. & Dougan, G. (1989). Isolation of orally attenuated *Salmonella* Typhimurium following *TnphoA* mutagenesis. *Infect. Immun.* **57**: 2758–2763.
71. Molinaro, A., Holst, O., Di Lorenzo, F., Callaghan, M., Nurisso, A., D’Errico, G., Zamyatina, A., Peri, F., Berisio, R., Jerala, R., Jiménez-Barbero, J., Silipo, A. & Martín-Santamaría, S. (2014). Chemistry of lipid A: at the heart of innate immunity. *Chem. Eur. J.* **20**: 1–21.

72. Moreira, C. G., Herrera, C. M., Needham, B. D., Parker, C. T., Libby, S. J., Fang, F. C., Trent, M. S. & Sperandio, V. (2013). Virulence and stress-related periplasmic protein (VisP) in bacterial/host associations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **110**: 1470–1475.
73. Murata, T., Tseng, W., Guina, T., Miller, S. I. & Nikaido, H. (2007). PhoPQ-mediated regulation produces a more robust permeability barrier in the outer membrane of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* **189**: 7213–7222.
74. Murray, G. L., Attridge, S. R. & Morona, R. (2003). Regulation of *Salmonella* Typhimurium lipopolysaccharide O antigen chain length is required for virulence; identification of FepE as a second Wzz. *Mol. Microbiol.* **47**: 1395–1406.
75. Murray, G. L., Attridge, S. R. & Morona, R. (2005). Inducible serum resistance in *Salmonella* Typhimurium is dependent on wzz (*fepE*)-regulated very long O antigen chains. *Microbes Infect.* **7**: 1296–1304.
76. Murray, G. L., Attridge, S. R. & Morona, R. (2006). Altering the length of the lipopolysaccharide O antigen has an impact on the interaction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with macrophages and complement. *J. Bacteriol.* **188**: 2735–2739.
77. Needham, B. D. & Trent, M. S. (2013). Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nat. Rev.* **11**: 467–481.
78. Nevola, J. J., Stocker, B. A., Laux, D. C. & Cohen, P. S. (1985). Colonization of the mouse intestine by an avirulent *Salmonella typhimurium* strain and its lipopolysaccharide-defective mutants. *Infect. Immun.* **50**: 152–159.
79. Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 593–656.
80. Ochman, H., Soncini, F. C., Solomon, F. & Groisman, E. A. (1996) Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. **93**: 7800–7804.
81. Ohto, U., Fukase, K., Miyake, K., & Shimizu, T. (2012). Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **109**: 7421–7426.
82. Okamura, N. & Spitznagel, J. K. (1982). Outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* LT2 have lipopolysaccharide-dependent resistance to the bactericidal activity of anaerobic human neutrophils. *Infect. Immun.* **36**: 1086–1095.
83. Park, B. S., Song, D. H., Kim, H. M., Choi, B. S., Lee, H. & Lee, J. O. (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*. **458**: 1191–1195.
84. Popov, M., Petrov, S., Nacheva, G., Ivanov, I. & Reichl, U. (2011). Effects of a recombinant gene expression on ColE1-like plasmid segregation in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol.* **11**: 18.
85. Preston, A. (2003). Choosing a cloning vector. *Methods Mol. Biol.* **235**: 19–26.
86. Prouty, A. M., Brodsky, I. E., Falkow, S. & Gunn, J. S. (2004). Bile-salt-mediated induction of antimicrobial and bile resistance in *Salmonella* Typhimurium. *Microbiology*. **150**: 775–783.
87. Raetz, C. R. & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 635–700.

88. Raetz, C. R. (1993). Bacterial endotoxins: extraordinary lipids that activate eukaryotic signal transduction. *J. Bacteriol.* **175**: 5745–5753.
89. Raetz, C. R., Reynolds, C. M., Trent, M. S. & Bishop, R. E. (2007). Lipid A modification systems in Gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**: 295–329.
90. Raetz, C. R., Ulevitch, R. J., Wright, S. D., Sibley, C. H., Ding, A. & Nathan, C. F. (1991). Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *FASEB J.* **5**: 2652–2660.
91. Reynolds, C. M., Ribeiro, A. A., McGrath, S. C., Cotter, R. J., Raetz, C. R. & Trent, M. S. (2006). An outer membrane enzyme encoded by *Salmonella* Typhimurium *lpxR* that removes the 3'-acyloxyacyl moiety of lipid A. *J. Biol. Chem.* **281**: 21974–21987.
92. Rivera-Chávez, F. & Bäumlér, A. J. (2015). The pyromaniac inside you: *Salmonella* metabolism in the host gut. *Annu. Rev. Microbiol.* **69**: 31–48.
93. Roncero, C. & Casadaban, M. J. (1992). Genetic analysis of the genes involved in synthesis of the lipopolysaccharide core in *Escherichia coli* K-12: three operons in the *rfa* locus. *J. Bacteriol.* **174**: 3250–3260.
94. Rose-John, S. (2017). The soluble interleukin 6 receptor: advanced therapeutic options in inflammation. *Clin. Pharmacol. Ther.* **102** (4): 591–598.
95. Rosenfeld, Y. & Shai, Y. (2006). Lipopolysaccharide (endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: role in bacterial resistance and prevention of sepsis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1758**: 1513–1522.
96. Ruiz, N., Gronenberg, L. S., Kahne, D. & Silhavy, T. J. (2008) Identification of two innermembrane proteins required for the transport of lipopolysaccharide to the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**: 5537–5542.
97. Rychlik, I., & Barrow, P. A. (2005) *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. *FEMS Microbiol. Rev.* **29** (5): 1021–1040.
98. Samuel, S. & Reeves, P. (2003). Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly. *Carbohydr. Res.* **338**: 2503–2519.
99. Sansonetti, P. J. (2004). War and peace at mucosal surfaces. *Nat. Rev. Immunol.* **4** (12): 953–964.
100. Santiviago, C. A., Reynolds, M. M., Porwollik, S., Choi, S. H., Long, F., Andrews-Polymenis, H. L. & McClelland, M. (2009). Analysis of pools of targeted *Salmonella* deletion mutants identifies novel genes affecting fitness during competitive infection in mice. *PLoS Pathog.* **5** (7): e1000477.
101. Santos R. L., Zhang S., Tsolis R. M., Kingsley R. A., Adams L. G. & Baumler A. J. (2001). Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes Infect.* **3**: 1335–1344.
102. Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. & Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta.* **1813** (5): 878–888.
103. Schnaitman, C. A. & Klena, J. D. (1993). Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**: 655–682.

104. Selsted, M. E., Miller, S. I., Henschen, A. H. & Ouellette, A. J. (1992). Enteric defensins: antibiotic peptide components of intestinal host defense. *J. Cell Biol.* **118**: 929–936.
105. Seydel, U., Oikawa, M., Fukase, K., Kusumoto, S. & Brandenburg, K. (2000). Intrinsic conformation of lipid A is responsible for agonistic and antagonistic activity. *Eur. J. Biochem.* **267**: 3032–3039.
106. Shea, J. E., Hensel, M., Gleeson, C. & Holden, D. W. (1996). Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **93**: 2593–2597.
107. Shen, S & Fang, F. C. (2012). Integrated stress responses in *Salmonella*. *Int. J. Food Microbiol.* **152** (3): 75–81.
108. Silhavy, T. J., Kahne, D. & Walker, S. (2010). The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2** (5): a000414.
109. Silipo, A., De Castro, C., Lanzetta, R., Molinaro, A. & Parrilli, M. (2004). Full structural characterization of the lipid A components from the *Agrobacterium tumefaciens* strain C58 lipopolysaccharide fraction. *Glycobiology.* **14** (9): 805–815.
110. Silva, C. A., Blondel, C. J., Quezada, C. P., Porwollik, S., Andrews-Polymenis, H. L., Toro, C. S., Zaldívar, M., Contreras, I., McClelland, M. & Santiviago, C. A. (2012a). Infection of mice by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis involves additional genes that are absent in the genome of serovar Typhimurium. *Infect. Immun.* **80**: 839–849.
111. Silva, F., Queiroz, J. A. & Domingues, F. C. (2012b) Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*. *Biotechnol. Adv.* **30** (3): 691–708.
112. Sinnott, C. R. & Teall, A. J. (1987). Persistent gallbladder carriage of *Salmonella typhi*. *Lancet.* **1**: 976.
113. Soncini, F. C., García Vescovi, E., Solomon, F. & Groisman, E. A. (1996). Molecular basis of the magnesium deprivation response in *Salmonella typhimurium*: identification of PhoP-regulated genes. *J. Bacteriol.* **178**: 5092–5099.
114. Sperandio, P., Cescutti, R., Villa, R., Di Benedetto, C., Candia, D., Dehò, G. & Polissi, A. (2007). Characterization of *lptA* and *lptB*, two essential genes implicated in lipopolysaccharide transport to the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **189**: 244–253.
115. Sperandio, P., Lau, F. K., Carpentieri, A., De Castro, C., Molinaro, A., Dehò, G., Silhavy, T. J. & Polissi, A. (2008) Functional analysis of the protein machinery required for the transport of lipopolysaccharide to the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **190**: 4460–4469.
116. Spiga, L., Winter, M. G., Furtado de Carvalho, T., Zhu, W., Hughes, E. R., Gillis, C. C., Behrendt, C. L., Kim, J., Chessa, D., Andrews-Polymenis, H. L., Beiting, D. P., Santos, R. L., Hooper, L.V. & Winter, S. E. (2017). An oxidative central metabolism enables *Salmonella* to utilize microbiota-derived succinate. *Cell Host Microbe.* **22** (3): 291–301.e6.
117. Takeuchi, O. & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* **140**: 805–820.

118. Trent, M. S., Pabich, W., Raetz, C. R. & Miller, S. I. (2001b). A PhoP/PhoQ-induced Lipase (PagL) that catalyzes 3-O-deacylation of lipid A precursors in membranes of *Salmonella Typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **276**: 9083–9092.
119. Trent, M. S., Ribeiro, A. A., Lin, S., Cotter, R. J. & Raetz, C. R. (2001a). An inner membrane enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4-amino-4-deoxy-L-arabinose to lipid A: induction on polymyxin-resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor. *J. Biol. Chem.* **276**: 43122–43131.
120. Tsai, C. M. and Frasch, C. E. (1982). A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **119**: 115–119.
121. Valvano, M. A. Chapter 4 - Genetics and Biosynthesis of Lipopolysaccharide. *In: Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*. Edited by Yi-Wei Tang, Max Sussman, Dongyou Liu, Ian Poxton & Joseph Schwartzman. *Academic Press. Boston*. 2015. 55-89
122. Vazquez-Torres, A. & Fang, F. C. (2001). *Salmonella* evasion of the NADPH phagocyte oxidase. *Microbes Infect.* **3** (14-15): 1313-1320.
123. Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Bäumlner, A. J., Falkow, S., Valdivia, R., Brown, W., Le, M., Berggren, R., Parks, W. T. & Fang, F. C. (1999). Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature*. **401**: 804–808.
124. Wagner, S., Baars, L., Ytterberg, A. J., Klussmeier, A., Wagner, C. S., Nord, O., Nygren, P. A., van Wijk, K. J. & de Gier, J. W. (2007). Consequences of membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *Mol. Cell Proteomics*. **6** (9): 1527–1550.
125. Wain, J., Pham, V. B., Ha, V., Nguyen, N. M., To, S. D., Walsh, A. L., Parry, C. M., Hasserjian, R. P., HoHo, V. A., Tran, T. H., Farrar, J., White, N. J. & Day, N. P. (2001). Quantitation of bacteria in bone marrow from patients with typhoid fever: relationship between counts and clinical features. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 1571–1576.
126. Walsh, C., Gangloff, M., Monie, T., Smyth, T., Wei, B., McKinley, T. J., Maskell, D., Gay, N. & Bryant, C. (2008). Elucidation of the MD-2/TLR4 interface required for signaling by lipid IVa. *J. Immunol.* **118**: 1245–1254.
127. Wang, X. & Quinn, P. J. (2010). Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Prog. Lipid Res.* **49**: 97–107.
128. Whitfield, C., Amor, P. A. & Köplin, R. (1997). Modulation of the surface architecture of Gram-negative bacteria by the action of surface polymer: lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length. *Mol. Microbiol.* **23**: 629–638.
129. Woodward, R., Yi, W., Li, L., Zhao, G., Eguchi, H., Sridhar, P. R., Guo, H., Song, J. K., Motari, E., Cai, L., Kelleher, P., Liu, X., Han, W., Zhang, W., Ding, Y., Li, M. & Wang, P.G. (2010). In vitro bacterial polysaccharide biosynthesis: defining the functions of Wzy and Wzz. *Nat. Chem. Biol.* **6**: 418–423.
130. Wösten, M. M., Kox, L. F., Chamnongpol, S., Soncini, F. C. & Groisman, E. A. (2000). A signal transduction system that responds to extracellular iron. *Cell*. **103**: 113–125.
131. Wu, T., McCandlish, A. C., Gronenberg L. S., Chng, S. S., Silhavy, T. J. & Kahne, D. (2006). Identification of a protein complex that assembles lipopolysaccharide in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**: 11754–11759.

132. Wurfel, M. M. & Wright, S. D. (1997). Lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 transfer lipopolysaccharide to phospholipid bilayers: preferential interaction with particular classes of lipid. *J. Immunol.* **158**: 3925–3934.
133. Wurfel, M. M., Hailman, E. & Wright, S. D. (1995). Soluble CD14 acts as a shuttle in the neutralization of lipopolysaccharide (LPS) by LPS-binding protein and reconstituted high density lipoprotein. *J. Exp. Med.* **181**: 1743–1754.
134. Yi, E. C. & Hackett, M. (2000). Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from Gram-negative bacteria. *Analyst.* **125**: 651–656.