

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL

“Análisis de la participación del indol en la expresión de genes de la isla de patogenicidad I en *Salmonella enterica*.”

Presentador del Servicio Social

Ana Marisol Morales Cholico

Matricula: 2193070096



ASESORES

Estela Teresita Méndez Olvera

No. Econom. 29747



Wendy Esperanza Ortiz López

No. cédula. 12273506

Lugar de realización: Laboratorio de Microbiología Agropecuaria, de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Fecha de inicio y término: 15 de febrero 2024 a 15 de agosto 2024

INDICE

INTRODUCCIÓN	3
JUSTIFICACIÓN	3
MARCO TEÓRICO	5
OBJETIVOS	9
• GENERAL	9
• ESPECÍFICOS	9
METAS	9
MÉTODOS DISEÑO EXPERIMENTAL	9
RESULTADOS	12
DISCUSIÓN	25
CONCUSIÓN	27
BIBLIOGRAFÍA	28

Introducción

Los microorganismos patógenos del género *Salmonella* pueden invadir células epiteliales por medio de la translocación de un conjunto especializado de efectores. La translocación de estos efectores se realiza por medio de un sofisticado mecanismo de exportación llamado sistema de secreción tipo 3 (T3SS). La regulación de los genes presentes en la SPI-1 involucra diversos estímulos ambientales y reguladores transcripcionales que interactúan en redes complejas. Tomando en cuenta que los cambios ambientales, como la osmolaridad, el pH y la tensión de oxígeno, influyen en la expresión de genes de la SPI-1, en este trabajo se evaluará la participación del indol, un metabolito secundario del triptófano, en la regulación de los genes de esta isla en *Salmonella enterica*. El objetivo central es establecer si la respuesta metabólica a la presencia de indol en condiciones limitadas de aminoácidos regula la expresión de los genes de la isla de patogenicidad I.

Justificación.

En varios de los microorganismos patógenos, la virulencia es el resultado de un proceso multifactorial que requiere al menos dos componentes genéticos generales. Uno de ellos codifica los elementos necesarios en los procesos metabólicos y fisiológicos, requeridos para la sobrevivencia del microorganismo; estos elementos se encuentran en todas las bacterias patógenas y no patógenas. El otro componente comprende genes específicos que codifican toxinas, adhesinas, invasinas y otros factores responsables de la virulencia, razón por la cual se les ha llamado genes de virulencia y teóricamente se encuentran sólo presentes en las bacterias patógenas. Los mecanismos de patogenicidad de bacterias les permiten superar las defensas de un hospedero, por esta razón estos mecanismos son en la actualidad objeto de estudio. Comprender los mecanismos es necesario para desarrollar metodologías novedosas para su control. En opinión de W. Ivan Morrison, director adjunto del Institute of Animal Health, Immunology and Pathology y consultor del IFPRI (Grupo Consultivo sobre Investigaciones Agrícolas Internacionales) "los adelantos en biotecnología solamente pueden explotarse debidamente si se entienden las características biológicas de los agentes patógenos escogidos como objetivo y las

enfermedades que causan”. En este trabajo se evalúa la participación del indol en la regulación de la expresión de genes de virulencia en microorganismos del género *Salmonella* spp. En este aspecto existen varias cuestiones por definir, prácticamente como interactúan los procesos metabólicos básicos de una bacteria y la expresión de factores de virulencia. Como se ha mencionado estos dos componentes son importantes para el desarrollo de la enfermedad y por lo tanto su acción coordinada es importante. Al respecto se puede cuestionar si la deficiencia de aminoácidos son un factor determinante en la expresión de genes de virulencia, o si la presencia de indol estimula la virulencia al complementar esta deficiencia, si es así, este metabolito promovería el crecimiento del microorganismo. Sin embargo, esto podría estar regulado de manera distinta en función de las concentraciones de glucosa en el medio, como fuente de energía. En este trabajo se evaluarán estas condiciones y se establecerá su relación con la expresión de los genes de la isla de patogenicidad I.

Marco Teórico

Salmonella es una bacteria Gram negativa, con forma de bacilo, anaerobia facultativa, pertenece a la familia Enterobacteriaceae, no producen esporas. Es un quimioorganotrofo, lo que significa que obtiene energía de la oxidación de los compuestos orgánicos reducidos, descompone la glucosa para producir hidrógeno y dióxido de carbono y los nitratos se reducen a nitritos. La mayoría de los miembros del género son móviles mediante flagelos peritricos. (Oludairo et al., 2022; Jajere, 2019; Naushad et al., 2023). Se han descrito solo dos especies: *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori*. A su vez, *S. enterica* se divide en seis subespecies: *S. entérica* ssp. *entérica* (I), *S. enterica* ssp. *salame* (II), *S. enterica* ssp. *arizona* (IIIa), *S. enterica* ssp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* ssp. *houtenae* (IV), y *S. enterica* ssp. *indica*. En *S. entérica* se han descrito 2,600 serovariedades con base a las diferencias en sus estructuras flagelares (antígeno H) y su lipopolisacárido (antígeno O) (Jajere, 2019; dos Santos et al., 2019).

Las infecciones producidas por *S. enterica* se pueden dividir en tres tipos: Fiebre tifoidea, causada por *S. Typhi*; fiebre entérica, causada por *S. Paratyphi* A, B y C; y enterocolitis o salmonelosis producidas por otros serotipos (dos Santos et al., 2018). La serotipificación de *Salmonella* se basa en la variabilidad antigénica de lipopolisacáridos, proteínas flagelares y capsulares, como ya se mencionó (Jajere, 2019; Sun et al., 2019). Los lipopolisacáridos junto con la porción lipídica de la pared celular contienen la endotoxina que es responsable de los efectos biológicos de las bacterias (Oludairo et al., 2022), Las infecciones por *Salmonella typhi* pueden causar fiebre, hepatomegalia, esplenomegalia y bacteremia. En el proceso de la enfermedad, las bacterias se diseminan a la vesícula biliar, el hígado y el bazo (Li, 2022).

Para este microorganismo su patogenicidad está estrechamente relacionada con sus factores de virulencia, que incluye la formación de biopelículas, la motilidad mediada por flagelos, adhesión e invasión y el sistema de secreción tipo III (T3SS) (Zhang et al., 2022); se han reportado distintos genes de virulencia, tales como:

invA, *spvC*, *sopE*, *sseL* entre otros (Naushad et al., 2023). Los genes de virulencia se ubican en regiones cromosómicas llamadas “islas de patogenicidad” que actúan como unidades genéticas compactas. Estas regiones muestran una mayor cantidad de guanina y citosina en comparación con las otras partes del ADN cromosomal. De las cinco Islas de patogenicidad de *Salmonella enterica* (SPI por sus siglas en inglés “*Salmonella pathogenicity islands*”), la SPI-1 es la mejor caracterizada, esta contiene aproximadamente 40 genes, está ubicado en el centisoma 63 y tiene características genéticas estables. Está presente en todas las especies de *Salmonella* y contiene agrupaciones de genes como *inv*, *spa*, *sip*, *prg*, *org*, *sit*, *hil*, *sic*, *spt*, *spr* y *avr* (dos Santos et al., 2018; Naushad et al., 2023; Liu et al., 2023). El gen *invA* codifica una proteína estructural del T3SS.

Los genes codificados en SPI-1 son esenciales en la etapa de invasión del epitelio intestinal, específicamente a los enterocitos, SipABCD y SptP son las principales proteínas efectoras y se liberan en la célula huésped a través de T3SS-1, considerado el factor de virulencia más importante para *Salmonella*. (dos Santos et al., 2018; Naushad et al., 2023). SipA es una de las proteínas responsables de la inducción y el reordenamiento citoesqueleto de las células epiteliales, facilitando la entrada de bacterias a la célula huésped. La proteína SptP es una fosfotirosina fosfatasa que, al entrar en las células epiteliales, altera el citoesqueleto de la actina (dos Santos et al., 2019)

Por otra parte, el colon contiene derivados del triptófano como el indol, que es una molécula de señalización derivada de la microbiota, es un compuesto aromático heterocíclico. El indol es sintetizado por la enzima tetramérica triptofanasa, la enzima que cataliza la conversión de L-triptófano en indol (también piruvato y amoníaco) y está codificado por el gen *tnaA* (Kumar y Sperandio, 2019; Zarkan et al., 2020). La triptofanasa es una enzima dependiente de fosfato de piridoxal responsable de hidrolizar triptófano para formar indol, además de piruvato y amonio (Kim & Park, 2015). La producción de indol es una característica ampliamente difundida en el reino bacteriano, alrededor de 85 especies de bacterias, tanto Gram

negativas como Gram positivas, lo producen. Se sabe que el indol juega un papel importante en las bacterias, como en la formación de biopelícula, virulencia, estabilización de plásmidos, formación de esporas, resistencia a ácidos y formación de células persistentes (Kim & Park, 2015). *Salmonella* no alberga *tnaA*, por lo tanto esta no produce indol, pero *Escherichia coli*, al producir indol induce la expresión del sistema de eflujo de múltiples fármacos *acrAB toIC* de *Salmonella*, por lo que el indol actúa como señalizador en la comunicación intra como interespecie (Nikaido *et al.*, 2012). Se reporta que *Vibrio cholera* produce indol durante la fase de crecimiento estacionario, al igual que *Proteus vulgaris*, *Providencia* spp y *Morganella* spp. También lo producen bacterias de interés médico como: *Klebsiella oxytoca*, *Shigella dysenteriae* y *Enterococcus faecalis*, sin embargo, la mayoría de los estudios se han centrado en la producción de indol a partir de *E. coli* (Castillo, 2023).

Muchas bacterias utilizan diversos sistemas de señalización intercelular, como el sistema “quórum sensing” (QS). El QS es un tipo de comunicación que coordina la adaptación bacteriana al ambiente, y es dependiente de la densidad celular. Las moléculas de señalización incluyen N-acil-homoserina-lactonas (AHL) en bacterias Gram negativas, autoinductor 2 (AI-2) e indol, algunas bacterias producen indol en fase estacionaria (Kim & Park, 2015); en bacterias Gram negativas y positivas, péptidos señal en bacterias Gram positivas y otros (Castillo, 2022). Específicamente en *Salmonella* sp., el sistema QS incluye a las moléculas Autoinductor (AI)-1, AI-2, AI-3/Epinefrina (Epi)/Norepinefrina (NE), Factores de señal difusibles (DFS) e indol (Zhang *et al.*, 2022). Algunas de sus funciones de QS es contribuir a la virulencia bacteriana al regular la expresión de genes involucrados en la formación de biopelículas, flagelos, T3SS, adhesión e invasión bacteriana (Zhang *et al.*, 2022). El QS afecta la biosíntesis y el ensamblaje de fimbrias de *pef* al regular la expresión del locus *rck*, estas fimbrias se ensamblan a diferentes zonas de las células huésped en *Salmonella* sp (Zhang *et al.*, 2022, Quan *et al.*, 2019).

Algunas especies bacterianas comensales pueden generar Triptófano (Trp) de novo, sin embargo, su contribución general de estos microbios a la producción de Trp en el tracto intestinal es limitada. El Trp dietético ingresa al tracto intestinal y alcanza su concentración relativa más alta en el colon distal, donde ocurre la mayor parte del metabolismo proteolítico. La captación de Trp en el intestino se produce a través de proteínas del sistema de transporte. Los transportadores que facilitan la entrada y salida de aminoácidos neutros incluyen proteínas transportadoras de solutos LAT1-4, BO AT1 y TAT1. Las células epiteliales y otras células intestinales descomponen el Trp en metabolitos para ser utilizados por el tracto gastrointestinal. Una vez dentro de una célula, el Trp: 1) se recicla para la síntesis de péptidos, 2) se convierte en aminas que contienen anillos de indol (es decir, 5-HT, melatonina, N-acetil-5-HT) o 3) se desvía a la vía Kyn. Una pequeña cantidad del metabolito Trp triptamina es producida por huéspedes y microbios intestinales, y puede interactuar con los receptores AHR y 5-HT. Una pequeña proporción de Trp (estimada en alrededor del 5% de la que no se usa para la síntesis de proteínas) se convierte en serotonina (5-HT) (Grifka et al., 2021).

En las bacterias, el operón *trp* está regulado por la concentración in vivo de L-Trp. La unión de L-Trp a la proteína represora *trp* estabiliza la formación del complejo operón *trp*-represor, que bloquea eficazmente la expresión del operón y, por lo tanto, interfiere con la síntesis de L-Trp. Cuando la concentración celular de L-Trp se vuelve demasiado baja para unirse a su represor, este se disocia del operador *trp*, desencadenando la expresión de las cinco proteínas responsables de la síntesis de L-Trp, las cuales son: *trpE*, *trpD*, *trpC*, *trpB* y *trpA*. Las enzimas expresadas por *trpA* y *trpB* forman un complejo de enzimas $\alpha\beta\beta\alpha$ que lleva a cabo los dos últimos pasos en la síntesis de L-Trp (las reacciones α y β). Este complejo se denomina triptófano sintasa. (Ghosh et al., 2022).

Objetivo.

General

Establecer el efecto del indol en la expresión de genes de la isla de patogenicidad I en *Salmonella* Typhi cepa CT18.

Específicos.

- Determinar el efecto en el crecimiento de *Salmonella* Typhi CT18 de tres concentraciones de indol en tres concentraciones de glucosa en el medio M9.
- Evaluar la modificación en la expresión de genes de la Isla de patogenicidad I en *Salmonella* Typhi CT18 en concentración óptimas de indol y glucosa mediante la técnica de microarreglos.
- Evaluar los resultados obtenidos y establecer los efectos de la adición de indol.

Metas.

1. Establecer las concentraciones de indol y glucosa que modifican la expresión de genes de la isla de Patogenicidad I.
2. Escritura de un informe final.

Métodos y diseño experimental.

Este trabajo es un estudio experimental comparativo con variables independientes y dependientes. Básicamente consiste en contrastar los niveles de expresión de los genes de la isla de patogenicidad I (IP-I), en *Salmonella enterica* Typhimurium 13311 expuesta a diferentes concentraciones de indol durante su crecimiento. El objetivo central es analizar, si la presencia de indol modifica la expresión del gene *invA*, con el fin de evaluar su participación en la regulación de la virulencia en condiciones de metabolismo limitante por fuentes de carbono y aminoácidos, lo cual se ha considerado una condición que estimula los genes de la IP-I. En un primer ensayo se analizó la curva de crecimiento de *S. enterica* *Typhimurium* en medio M9

suplementado con Medio mínimo Eagle y Luria Bertanni, adicionado con tres concentraciones diferentes indol (0, 1, 2 y 3 mM). Posteriormente, bajo la condición donde la adición de indol no afectó el crecimiento de *S. Typhimurium*, se evaluó la expresión de los genes de la IP-I, mediante un ensayo de RT-PCR con el gen *invA*. Los resultados obtenidos se utilizaron para establecer si bajo condiciones limitantes de triptófano en el medio se favorece el empleo del indol para transformarlo en triptófano, y si esta actividad regula de manera distinta los genes ubicados en la isla de patogenicidad I. El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Agropecuaria del Departamento de Producción Agrícola y Animal (LMA-DPAA), de la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Xochimilco.

Cepas y condiciones de crecimiento. Se empleó una cepa de *Salmonella entérica* Typhimurium 13311. Para establecer las variaciones en la expresión de los genes de interés, las cepas fueron crecidas primeramente en medio LB y después en medio M9 (medio de inducción) a 37°C con agitación (100 rpm), para el enriquecimiento se emplearon los medios MEM (Minimum Essential Medium Eagle Modified, Sigma-Aldrich) y LB (Luria Bertanni). Las concentraciones de indol (Sigma-Aldrich) empleadas en este trabajo fueron 0, 1, 2 y 3 mM.

Cinéticas de crecimiento. En las condiciones previamente descritas se realizó una cinética de crecimiento de 5 horas de duración. Cada hora se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 595 nm. Las lecturas fueron empleadas para establecer la concentración de indol que no afectara el crecimiento de *Salmonella enterica* Typhimurium 13311. Este ensayo se realizó por quintuplicado.

Extracción de ADN de los cultivos bacterianos.

Las bacterias fueron lisadas con solución de lisis total. El lisado se colocó en microtubos de 15ml y se le adicionaron 30µl de una suspensión de partículas de sílica. El ADN unido a las partículas de sílica fue lavado con etanol al 70% y acetona. Finalmente, el ADN se recuperó en 20µl de solución TE. El ADN obtenido fue visualizado en un gel de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio para verificar su calidad y cantidad (Imagen 1). A partir de esto el ADN se cuantificó con

un nanodrop marca Thermo Scientific, para evaluar cuánto se debía diluir para su posterior uso en PCR punto final.

Extracción de ARN de los cultivos bacterianos. *Salmonella entérica* Typhi 13311 fue crecida en la concentración de indol que alteró en menor proporción su curva de crecimiento. Bajo esta condición de inducción se mantuvo el cultivo por 5 horas a 37°C con agitación (100 rpm). Posteriormente, los cultivos fueron centrifugados a 4500 RPM por 20 minutos, para recuperar la biomasa. Para la recuperación de ARN se empleó TRIZOL siguiendo los procedimientos establecidos por el fabricante. El ARN recuperado se suspendió con 30µl de agua DEPC y se evaluó su integridad en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

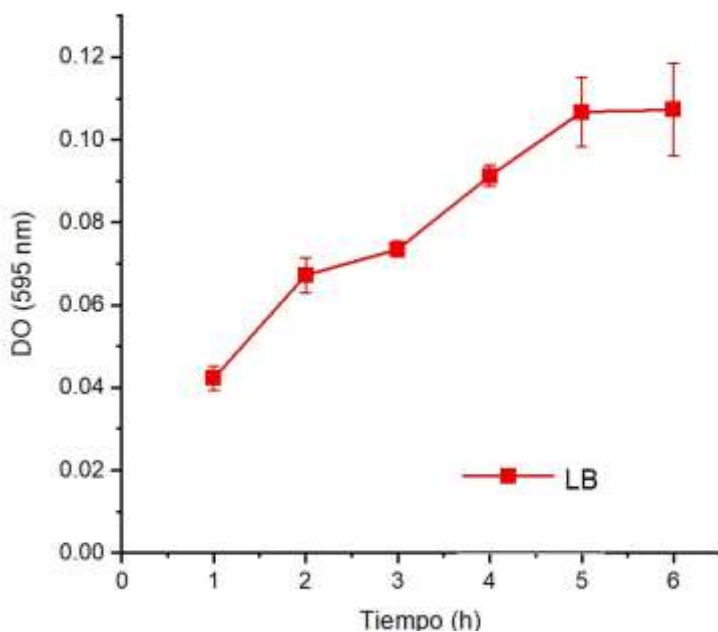
RT-PCR. Se empleó un RT-PCR para evaluar la expresión del gen *invA* (que se ubica dentro de la SPI-1), empleando el gen *rrSal* como gene normalizador. Para medir la expresión de genes, se utilizaron los siguientes iniciadores de *invA* que mide 225 pb *invA225-F* (5'-CTTTCTCTACTTAACAGTGCTCG-3'), *invA225-R* (5'-GAAAGAGCGTGGTAATTAACAG-3'), *rrSal* que mide 240 pb *rrSal240-F* (5'-CCCCAGTCATGAATCACAAAG-3') *rrSal240-R* (5'-CAAAGAGAAGCGACCTCGC-3'), *ompF* que mide 187pb *ompF187-F* (5'-ACCGGCGATAGTAAAAATGC-3') y *ompF187-R* (5'-ACTTCCGCGTATTTCAAACCC-3'), donde el gen *invA* es el gen que se evaluará y pertenece a la SPI-1; el PCR punto final se llevó a cabo con las siguientes condiciones, desnaturalización inicial 30 seg a 95°C, alineación 30 seg a 55°C, extensión 30 seg 72°C.

Análisis estadísticos. Para establecer si existieron diferencias significativas en las expresiones del gen *invA* se realizó un ANOVA. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa JMP y para el diseño de graficas se ocupó el Adobe Illustrator 10.

Resultados

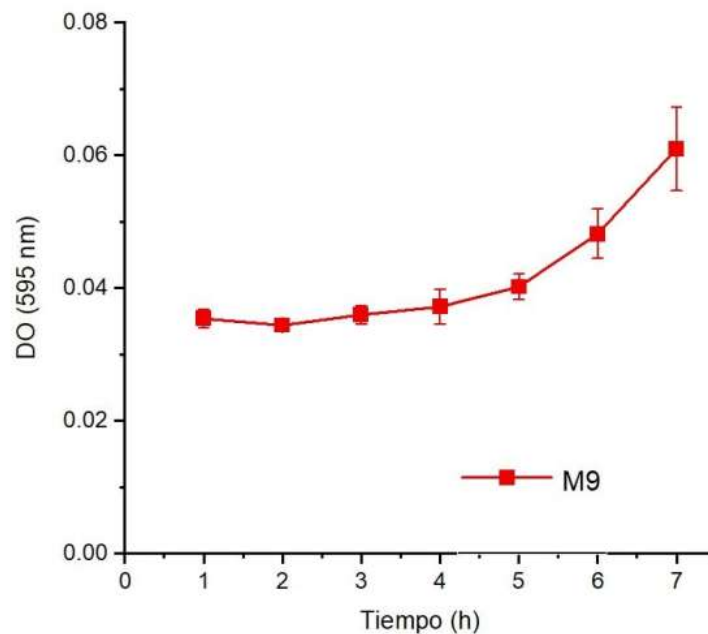
Previo a la realización de los experimentos planteados en el presente estudio para la evaluación de la expresión de genes, la cepa de *Salmonella entérica* Typhimurium 13311 fue caracterizada mediante distintas pruebas fisiológicas. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: 1) Rojo de metilo positivo, 2) Voges-Proskauer negativo 3) Citrato positivo, 4) Ácido sulfhídrico positivo, 5) Movilidad positiva, 6) urea positiva y 7) TSI reacción 3.

En un primer ensayo se evaluó el crecimiento de *Salmonella entérica* Typhimurium 13311 en medio LB, con el fin de establecer el patrón de crecimiento de esta cepa en una condición de suficiencia nutrimental, para lo cual se realizó una cinética de 6 horas con mediciones de absorbancia cada hora. En la primera hora, la densidad observada fue de $A_{585}=0.04$ y a la hora 5 fue de $A_{585}=0.106$ (Gráfica 1), es decir la densidad se duplicó al menos 4 veces.

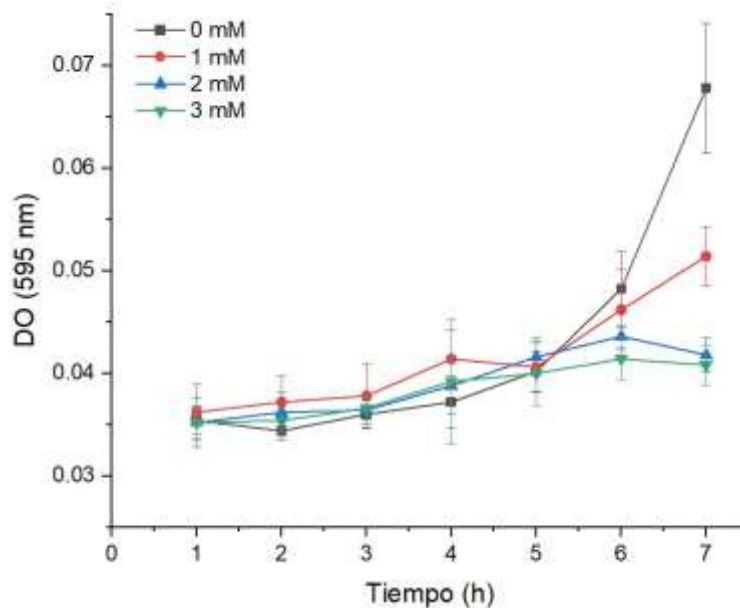


Gráfica 1. Cinética de crecimiento de *Salmonella entérica* Typhimurium 13311 en medio LB donde en un tiempo de 5 horas llegó a una fase exponencial con una $A_{585}=0.106$.

Considerando que el medio M9 podría representar un medio limitativo de crecimiento para *S. Typhimurium*, se realizaron cinéticas de crecimiento en este medio suplementado o no con caldo LB o MEM. Previo a la suplementación se realizó un cultivo de 12 horas de *S. enterica* Typhimurium 13311 en 5 mL de medio M9 (pH 7.2 HCl) suplementado solamente con dextrosa (100 mM) y posteriormente se realizaron las cinéticas en medio M9 suplementado con dextrosa y con 2% de caldo LB o 2% MEM. La cinética de crecimiento en la primera condición (medio M9 con 100 mM de glucosa) no mostró alguna tasa de crecimiento (Gráfica 2), y la absorbancia sólo mostro un ligero incremento a las 7 horas de $A_{585}=0.061$, mostrando con ello que la adición de carbohidratos no fue suficiente para permitir el crecimiento de *S. Typhimurium*. De igual forma tampoco se observó un crecimiento de la bacteria con la adición de indol (1, 2, y 3 mM) al medio M9 con 100 mM de glucosa. Los resultados obtenidos mostraron que la absorbancia promedio en todas las concentraciones de indol, incluyendo el control (sin indol) en el tiempo 0 era de $A_{585}=0.035$ y culminó en la séptima hora con valores de absorbancia de $A_{585}=0.048$, (Gráfica 3).

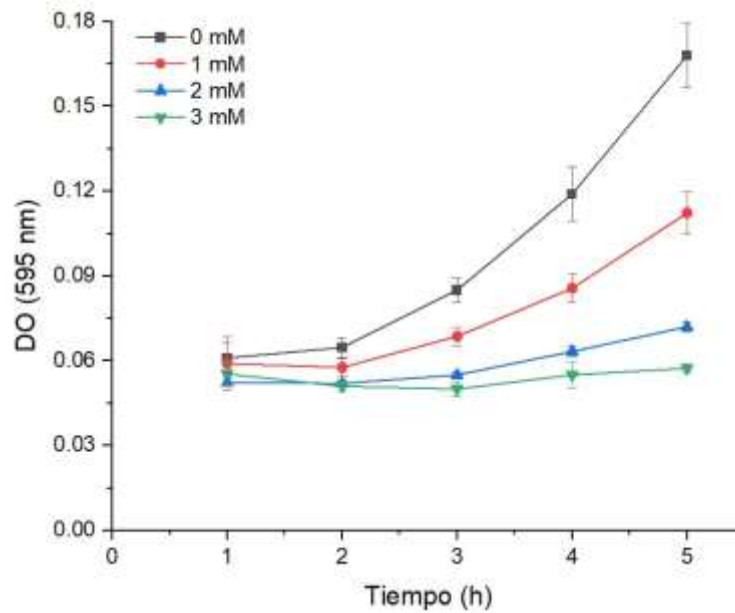


Gráfica 2. Cinética de crecimiento de *Salmonella entérica* Typhimurium 13311 en medio M9 donde en la hora 1 inició en un promedio de $A_{585}=0.035$ y en la hora 7 alcanzó un valor de $A_{585}=0.061$ en el grupo sin indol, para los otros tratamientos (1, 2, y 3 mM indol) la absorbancia fue menor. Es importante mencionar en esta parte que el crecimiento obtenido en medio M9 sin indol ($A_{585}=0.061$) es menor al observado en medio LB ($A_{585}=0.121$)

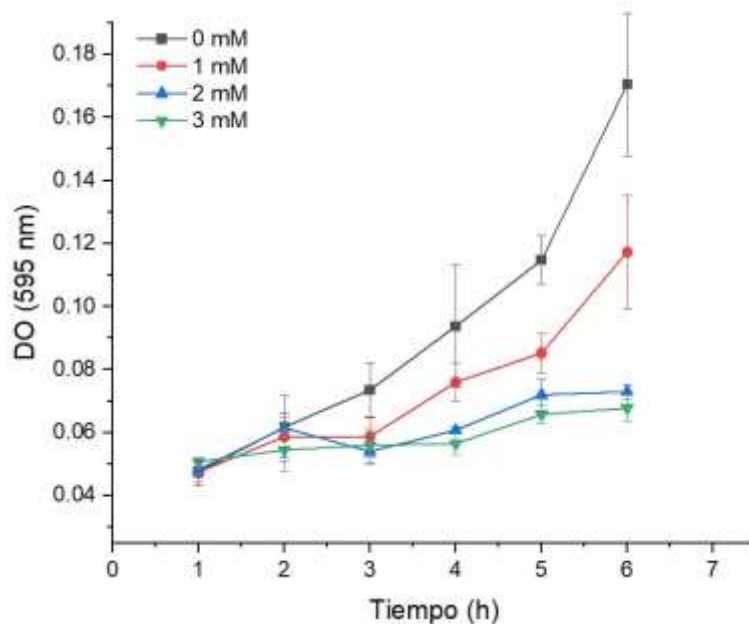


Gráfica 3. Cinética de crecimiento de *Salmonella enterica* Typhimurium 13311 en medio M9 adicionado con diferentes concentraciones de indol (0mM, 1mM, 2mM y 3mM), donde se muestra que la adición de indol modifico la cinética, ya que la concentración 2mM y 3mM se redujo el crecimiento de la bacteria $A_{585}=0.041$ a diferencia del resultado con la concentración 1mM, la cual a las 7 horas mostró un crecimiento ligero con un valor de absorbancia de $A_{585}=0.051$.

Los resultados obtenidos en las cinéticas de crecimiento con *S. enterica* Typhimurium en medio M9 suplementado con dextrosa (100 mM) y 2% de medio MEM o LB (Gráficas 4 y 5), mostraron que todas las muestras en el tiempo 1 tenía un valor promedio de absorbancia de $A_{585}=0.051$, y al final de la cinética a las 5 horas mostraban valores de absorbancia de $A_{585}=0.086$ y $A_{585}=0.117$, para medio suplementado con MEM y LB respectivamente. El análisis de estos resultados permitió establecer el efecto positivo de la suplementación con medio LB, por ello el ensayo para evaluar la expresión del gen *invA* se llevó a cabo con la suplementación de LB y para la concentración de indol se decidió la concentración 1mM, debido a que bajo esta condición la diferencia de crecimiento en medio sin indol era mínima, a diferencia de las otras dos concentraciones (2mM y 3mM) que no llegaron a superar los $A_{585}=0.100$ nm (Gráfica 5).



Gráfica 4. Cinética de crecimiento de *S. enterica Typhimurium* 13311 en medio M9 adicionado con MEM con diferentes concentraciones de indol (0, 1, 2 y 3 mM). Se observa que la absorbancia en medio suplementado con MEM en la concentración 1mM de indol a las 5 horas fue de $A_{585}=0.112$, es decir existió un aumento con la adición de MEM en comparación con el obtenido con el medio M9 solo ($A_{585}=0.06$)



Gráfica 5. Cinética de crecimiento de *S. enterica Typhimurium* 13311 en medio M9 adicionado con medio LB con diferentes concentraciones de indol (0, 1, 2 y 3 mM). Bajo esta condición se observó un mayor crecimiento en comparación con el medio MEM, por ejemplo, en la concentración 1mM la absorbancia a la hora 7 fue de $A_{585}=0.144$, la absorbancia para las otras concentraciones no superó el valor de $A_{585}=0.100$.

Previo a los ensayos de evaluación de la expresión de gene *invA*, se estandarizaron las condiciones para esta evaluación, primero se cultivó la cepa *S. enterica Typhimurium* en medio LB por 12 horas, y se le extrajo ADN con el método Sílica-Tioscianato (Figura 1).

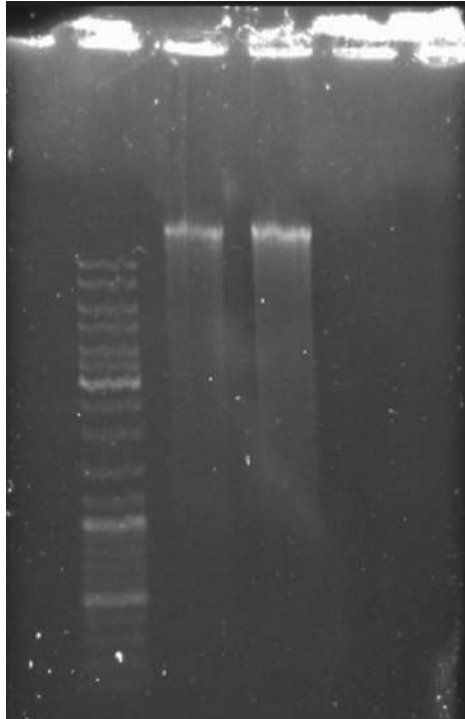


Figura 1. ADN de *S. enterica Typhimurium* 13311 extraído con el método de Sílica-Tioscianato, en gel de agarosa al 1%, se puede observar un DNA integro y sin RNA degradado.

El ADN recuperado fue utilizado para amplificar los genes *rrSal*, *invA* y *ompF*, los productos amplificados fueron observados en geles de agarosa al 1.5% teñidos con Bromuro de etidio. Los resultados obtenidos muestran una sola banda que correspondía al tamaño esperado de 240, 225 y 187 pb para *rrSal*, *invA* y *ompF*, respectivamente (figuras 2 y 3).

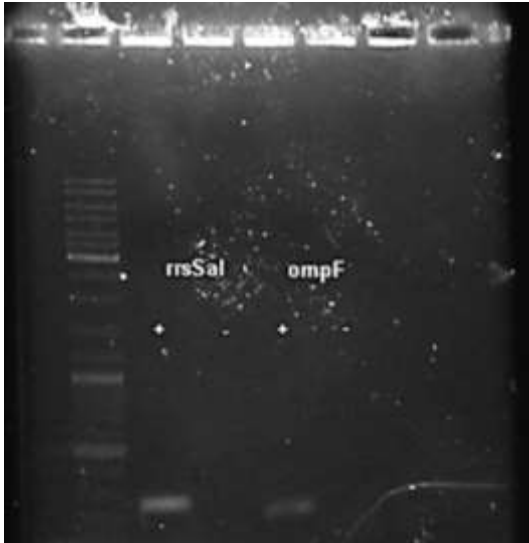


Figura 2. Producto amplificado correspondiente a un fragmento de los genes *rrSsl* y *ompF*, se observa una sola banda para cada segmento.

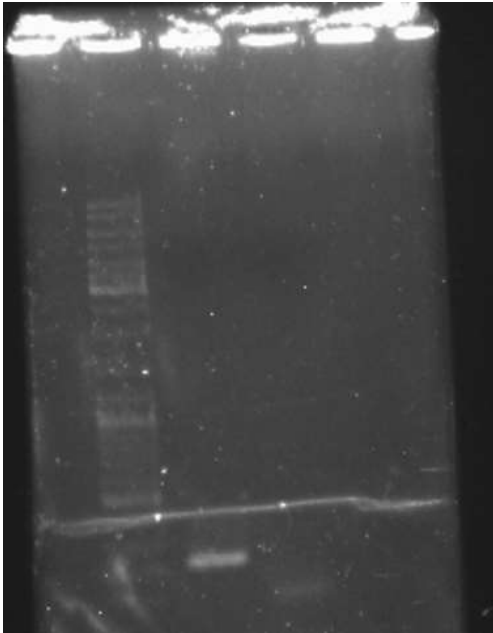


Figura 3. Producto amplificado que corresponde a un segmento del gen *invA*, se observa una sola banda.

Posteriormente, los productos de amplificados de cada gen fueron purificados y se diluidos a concentraciones de 10, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 ng/ul con el fin de establecer la concentración mínima amplificable. Los resultados obtenidos muestran que las concentraciones fueron 0.0001, 0.001 y 0.0001 ng/uL para *invA*, *ompF* y *rrSsl* respectivamente. (Figuras 4, 5, y 6).

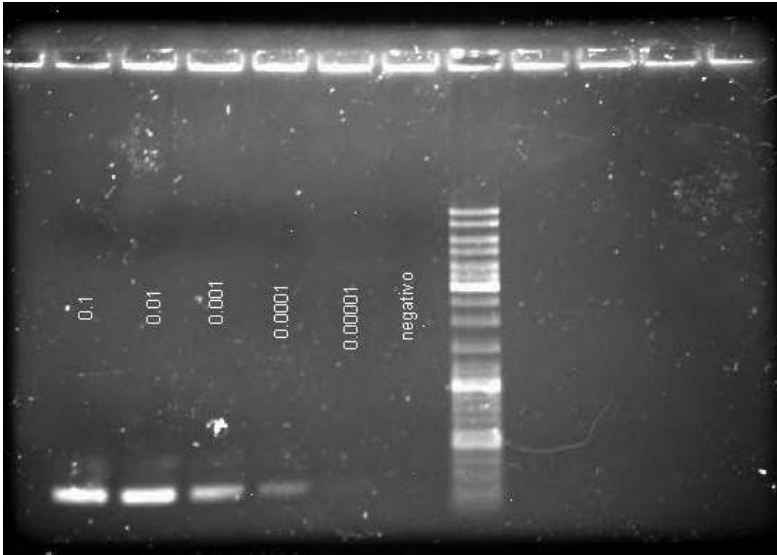


Figura 4. Amplificados obtenidos en PCR punto final con cada una de las diluciones de producto purificado del gen *rrSa*, se puede observar que la concentración mínima amplificable fue para estos iniciadores de 0.0001 ng/ul.

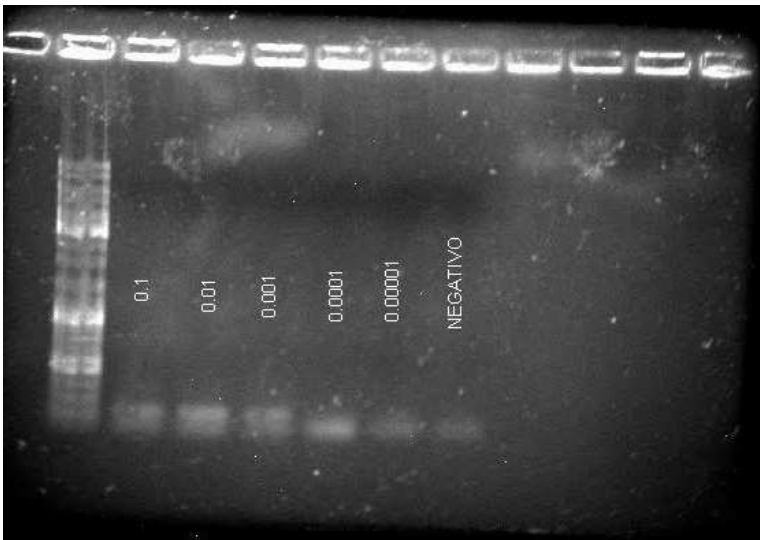


Figura 5. Amplificados obtenidos en PCR punto final con cada una de las diluciones de producto purificado del gen *ompF*, se puede observar que la concentración mínima amplificable fue 0.001 ng/ul.

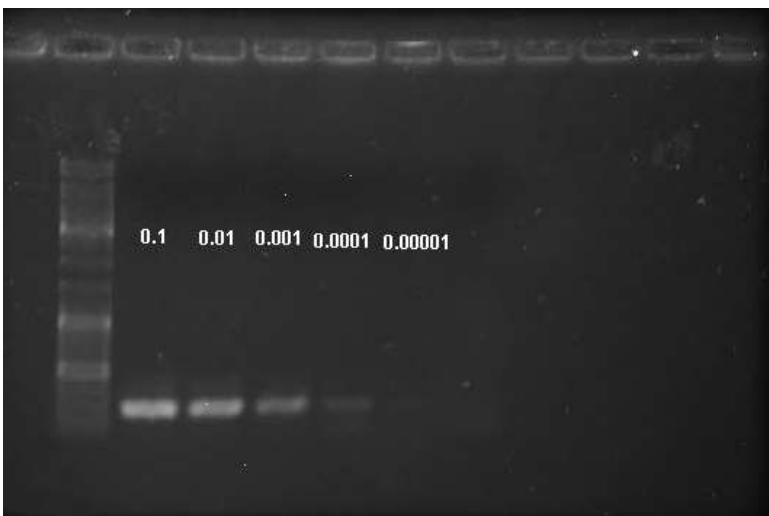
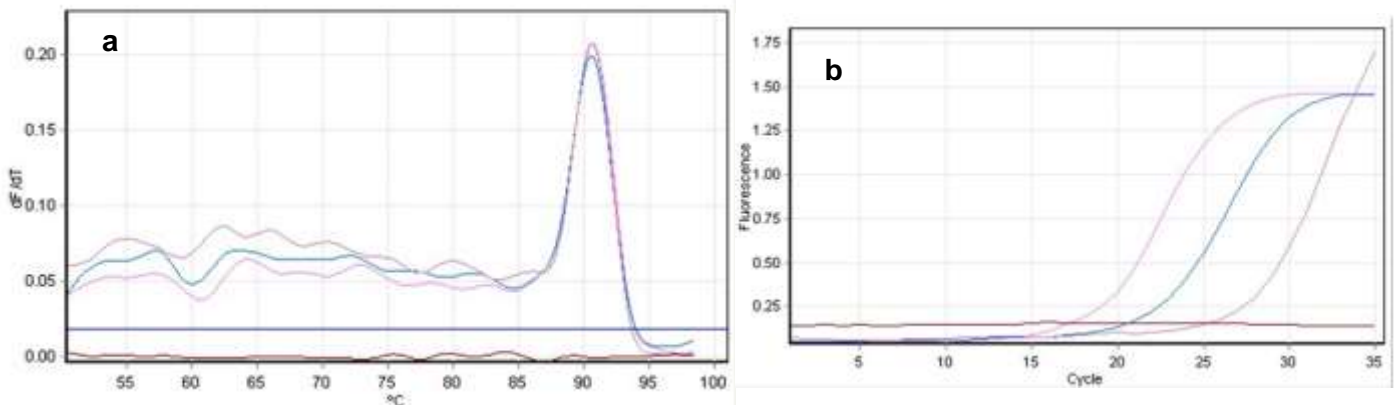


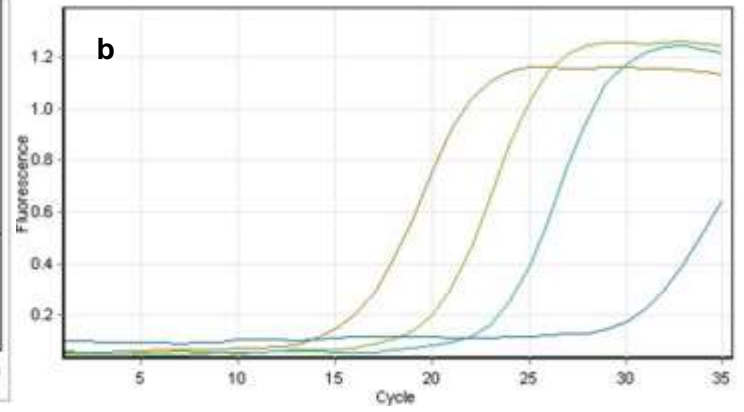
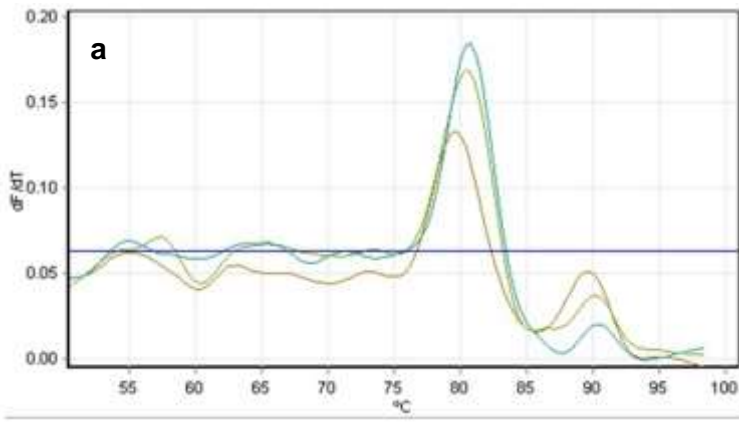
Figura 6. Amplificados obtenidos en PCR punto final con cada una de las diluciones de producto purificado del gen *invA*, se puede observar que la concentración mínima amplificable de 0.0001 ng/ul.

Posteriormente se midió la eficiencia de cada uno de los genes por medio de PCR en tiempo real. Se utilizaron las diluciones 1.0, 0.1 y 0.01 ng/ul. Las gráficas 6a, 7a y 8a, muestran los análisis de desnaturalización, donde se observa que no hubo producción de dímeros o amplificaciones inespecíficas. Asimismo, se observan curvas de CT para cada una de estas concentraciones (Gráfica 6b, 7b y 8b) y la relación lineal entre CT y concentración de ADN fue cercana al 1 (Gráfica 6c, 7c y 8c).

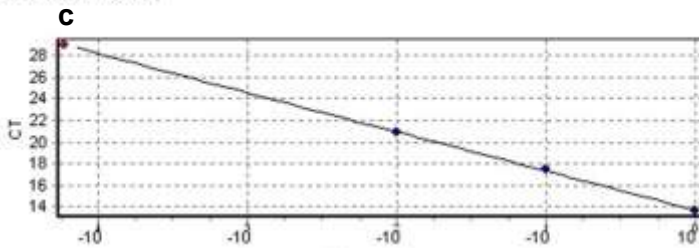
El análisis de los valores de CT obtenidos en el ensayo de PCR tiempo real, permitió establecer la eficiencia de amplificación de los genes normalizadores (rrSal y ompF) y el gen invA de la SPI-1, así como la relación inversamente proporcional entre los valores de CT y las concentraciones de 1.0, 0.1 y 0.01 ng/ul. Los valores de CT se muestran en la tabla 1. Los valores de r^2 (Tabla 3) para la curva de concentraciones de productos amplificados de rrSal, ompF e invA el cual fue de 0.98905, 0.99859 y 0.99949 respectivamente. El análisis de la eficiencia (Tabla 2) mostró que los genes normalizadores mostraban una eficiencia similar al gene en evaluación, para la evaluación de la expresión del gene invA se seleccionó como gen normalizador al gen rrSal.



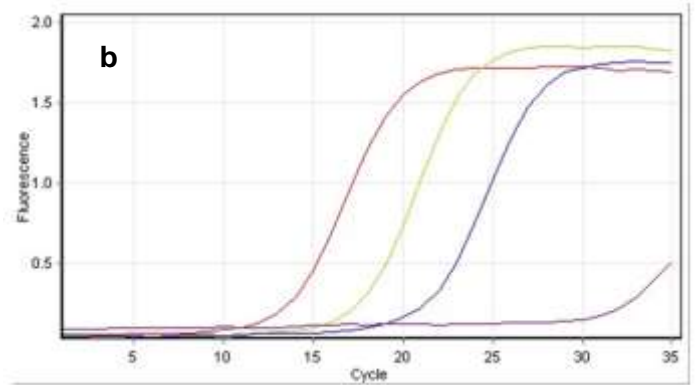
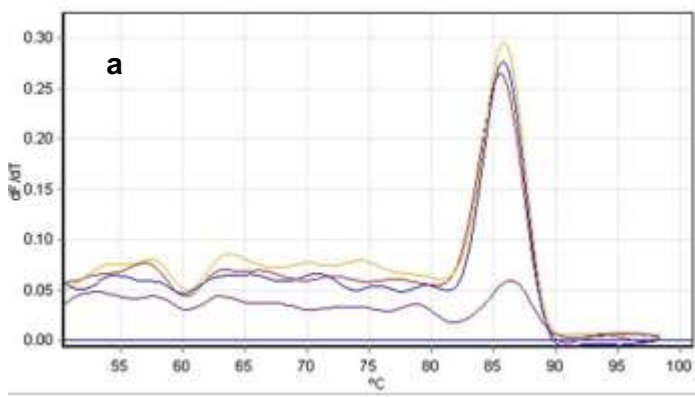
Gráfica 6. **a.** RT-PCR de las diluciones del gen rrSal, donde se observan un solo pico de cada una de las diluciones y con su respectivo control negativo el cual no se observa el pico de amplificado. **b.** HRM donde el eje Y muestra la fluorescencia y el eje X los ciclos de la reacción se ve el amplificado de cada dilución en una curva patrón con las tres diluciones. **c.** la curva estándar de las tres diluciones en el eje Y se observa la CT y el eje X con las concentraciones de ADN.



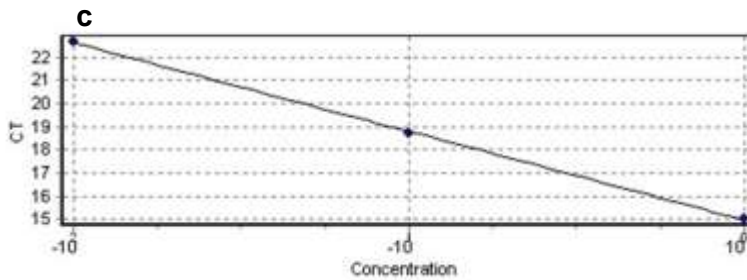
Standard Curve



Gráfica 7. **a.** RT-PCR de las diluciones del gen *ompF* donde se observan un solo pico de cada una de las diluciones, con una buena dispersión. **b.** HRM donde el eje Y muestra la fluorescencia y el eje X los ciclos de la reacción se ve el amplificado de cada dilución en una curva patrón con las tres diluciones, donde la cuarta reacción es del control negativo. **c.** La curva estándar de las tres diluciones en el eje Y se observa la CT y el eje X de las concentraciones de ADN.



Standard Curve



Gráfica 8. **a.** RT-PCR de las diluciones del gen *invA*, donde se observan un solo pico de cada una de las diluciones, con su respectivo control negativo que presenta un pico sonde se ve muy por debajo de los demás. **b.** HRM donde el eje Y muestra la fluorescencia y el eje X los ciclos de la reacción se ve el amplificado de cada dilución en una curva patrón con las tres diluciones, donde la cuarta reacción es del control negativo. **c.** La curva estándar de las tres diluciones en el eje Y se observa la CT y el eje X las concentraciones de ADN.

Tabla 1. Resultados de CT de RT-PCR de las diluciones de los genes *rrsA*, *ompF* e *invA*.

Dilución ng/ul \ Gene	Valores CT		
	<i>rrsA</i>	<i>ompF</i>	<i>invA</i>
1.0	15.66	16.99	15.01
0.1	19.12	20.66	18.69
0.01	24.12	24.07	22.67

Se observan los valores de la CT de cada uno de los genes en el análisis de RT-PCR donde hay una correlación entre los valores de CT y cada concentración de ADN.

Tabla 2. Valores de la eficiencia de los genes *rrSal*, *ompF* e *invA*, los cuales mostraron una eficiencia alta.

Gen	Eficiencia
rrSal	0.72284
ompF	0.88847
invA	0.82452

Se observan los valores de la eficacia obtenidos de las diferentes concentraciones con los tres pares de iniciadores para los genes *rrSal*, *ompF* e *invA*.

Tabla 3. Valores de la r^2 de las curvas patrón de los genes *rrSal*, *ompF* e *invA*.

Gen	Eficiencia
rrSal	0.72284
ompF	0.88847
invA	0.82452

Los valores muestran que los tres curvas tenían coeficientes de correlación cercanos a 1.

Para la evaluación de la expresión del gene *invA*, primero se extrajo ARN, para lo cual se creció la cepa de *S. enterica typhimurium* en tubos de fondo cónico de 50ml (20 ml de medio M9 adicionado con 200 μ l de caldo LB, con 100 μ l de un cultivo de 12 horas de la cepa en Medio M9). Se realizaron tres réplicas tanto del tratamiento (1mM de indol) y del control (M9), los cultivos se mantuvieron en agitación a 37°C por 5 horas, al finalizar el tiempo de incubación se centrifugó y se le dieron 5 lavados a la biomasa con TRIS (100mM con pH 6.8), se realizó la extracción de ARN con TRIZOL siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN obtenido fue visualizado en un gel de agarosa y se mantuvo a -76°C hasta su uso (Figura 7).

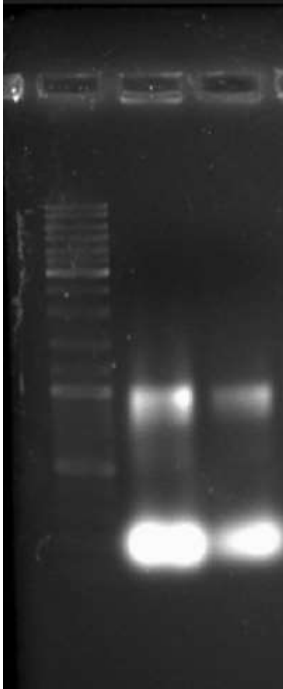
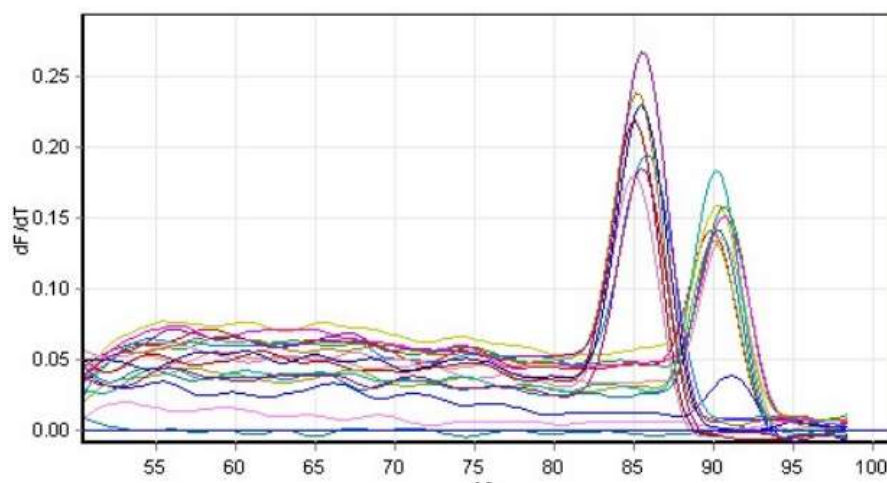


Figura 7. ARN extraído con el protocolo de Trizol, lado derecho *Salmonella typhimurium* tratada con 1mM de indol, lado izquierdo *Salmonella typhimurium* crecida en medio M9.

Con el ARN obtenido se realizó la síntesis de cDNA con el kit Jena Bioscience, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó el análisis de PCR en tiempo real utilizando 5µl cDNA sintetizado. En la gráfica 9 se muestra el análisis de desnaturalización del ensayo de evaluación de la expresión del gene *invA*. Como se aprecia en esta gráfica sólo se observan dos picos de amplificación que corresponden al gene en evaluación y su normalizador.



Gráfica 9. RT-PCR de los genes *invA* y *rrSal* de *Salmonella Typhimurium* en M9 con y sin 1mM de Indol, se observa un solo pico en todos los amplificados de ambos genes, y los controles negativos no muestran un amplificado.

Para determinar la expresión del gene *invA* ubicado en la IP-I, se utilizó el método de comparación del ciclo umbral (CT) (Livak y Schmittgen, 2001), utilizando la siguiente fórmula:

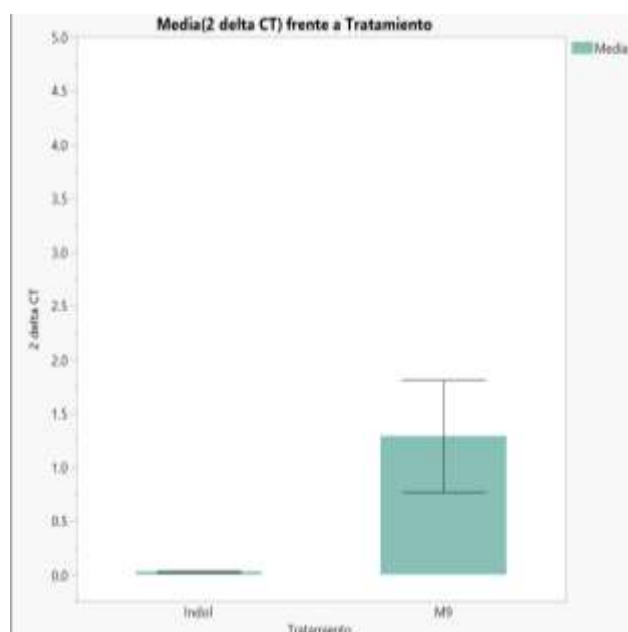
$$\Delta\Delta CT = (CT_{invA} - CT_{rrSal}) - (CT_{promedio invA} - CT_{promedio rrSal}) \text{ (Tabla 3)}$$

Los valores obtenidos se muestran en la tabla 4, con los incrementos correspondientes para cada una de las condiciones evaluadas.

		rrsal	invA	promedio rrsal	promedio invA	Incrementos	Tratamiento	Incrementos	DE	ee
M9	1	23.67	22.38	23.60	20.74	0.34	M9	1.289	0.904	0.522
M9	2	23.63	19.67			2.13				
M9	3	23.51	20.16			1.40				
Indol	1	16.94	19.37			0.03	Indol	0.029	0.010	0.006
Indol	2	16.42	19.06			0.02				
Indol	3	17.72	19.46			0.04				

Tabla 4. Valores de incrementos de CT para los genes *invA* y *rrSal* obtenidos en la RT-PCR. Se comparan los valores de CT para *Salmonella typhimurium* en medio M9 solo y adicionado con 1 mM indol. Se observa una diferencia significativa en las condiciones evaluadas.

El análisis ANOVA un factor mostró una diferencia significativa en la expresión del gene *invA* entre ambos tratamientos, la interpretación de estos resultados es que el indol induce una subexpresión del gene *invA* (Gráfica 11).



Gráfica 11. Resultados de RT-PCR. Los datos corresponden a valores medios de tres réplicas independientes de *invA*. Las barras indican la desviación estándar. Los niveles de expresión de *invA* se expresaron en relación con los medidos en la cepa *Salmonella Typhimurium* 1311 cultivada en M9 sin indol y tratada con 1mM de indol, donde la adición de indol si afecta a la expresión de este gen.

Discusión

Los resultados obtenidos en el análisis demuestran una diferencia significativa con *Salmonella typhimurium* crecida en M9 y en M9 tratada con indol a 1mM, en esta condición se observó una sobreexpresión del gene *invA*, el cual se encuentra codificado en la la SPI-1. A pesar de que la bacteria fue cultivada en medio M9, el cual es un medio mínimo en nutrientes. Para este medio el aumento en la concentración de glucosa no estimuló un mayor crecimiento y *S. Typhimurium* mantuvo un crecimiento lento en comparación con los microorganismos crecidos en medio LB. Esto puede explicarse porque este medio contiene triptona (digestión enzimática de caseína) o peptona (digestión enzimática de proteínas) y extracto de levadura (un lisado de *Saccharomyces cerevisiae*), las cuales proveen de elementos fundamentales en el crecimiento de microorganismos (Sridhar y Steele, 2016) (Gráfica 1 y 2) Resultado similares fueron reportados por Yurist *et. al.*, 2016, en su trabajo estos investigadores evaluaron el crecimiento en un medio mínimo como MOPS (Morpholinepropanesulfonic acid) y lo compararon con LB. Los resultados obtenidos mostraron que el LB produjo una biomasa mayor. Por otro lado, Blair *et al.*, 2013, compararon el uso de tres medios, utilizaron LB, MOPS y Minimum essential medium (MEM), de manera similar el crecimiento en medio LB mostró un mejor resultado. Interesantemente, la expresión de los genes de la SPI-1, en los microorganismos crecidos en medio MEM y MOPS mostró una sobreexpresión en comparación con medio LB.

En el trabajo de Sridhar y Steele, 2016, se evaluó el crecimiento de *Salmonella*, en medio M9 adicionado con casaminoácidos y glucosa (22 mM), en este trabajo la adición de casaminoácidos no fue suficiente para estimular el crecimiento de *Salmonella* en comparación con medio LB, de igual forma otros artículos reportan resultados similares (Blair *et al.*, 2013 y Yurist *et. al.*, 2016). En estos trabajos la evaluación de la expresión de los genes de la SPI-I mostraron también que la adición de indol al medio de crecimiento induce una subexpresión de los genes de la SPI-1.

Se puede agregar que aunque el medio LB es más enriquecido que el medio M9, en

este tampoco se ha observado una sobreexpresión de genes de virulencia de la SPI-1, Nikaido *et al.*, 2012 realizaron un ensayo con *Salmonella typhimurium* donde crecía en medio LB e indol a 1mM, los resultados mostraron que no se sobreexpresaba ningún gene de la SPI-1, y aunque hicieron otros ensayos con una molaridad menor (0.125, 0.25, 0.35, 0.50, 0.75 mM) de indol, no se expresaron estos genes, sin embargo, observaron la sobreexpresión de algunos genes flagelares en LB con indol 1mM, también es reportado por Nikaido *et al.*, 2008 donde observaron la expresión de genes *acrAB* el cual su expresión depende del gene flagelar *ramA*, el cual pertenece familia de activadores transcripcionales. La activación de *RamA* se ha informado que confiere resistencia de *Salmonella* a medicamentos, además se menciona que indol induce Cuatro Bombas de Eflujo Multifármaco las cuales disminuyen la acumulación celular de fármacos.

Un resultado significativo que se puede observar en la gráfica 2 es que el indol puede ser tóxico en altas concentraciones, para *Salmonella typhimurium*, Lou *et al.*, 2019 explican que durante el crecimiento de *E. coli* entre la fase exponencial y la fase estacionaria, el indol puede llegar a una concentración de hasta 60mM, donde la cantidad de indol intracelular es muy alta y este actúa como ionóforo de protones y puede inhibir el crecimiento y la división celular; por otro lado en las bacterias que no producen indol y no lo degradan o metabolizan, el exceso de indol (hasta 60mM), activan mecanismos de defensa, pero una alta concentración de indol sigue siendo tóxica e inhibe el crecimiento (Kim & Park, 2015).

Kholi *et al.*, 2018 mencionan las posibles causas del por qué el indol sería tóxico para *Salmonella*, el primero sería por el papel de *phoPQ*, este es un sistema de dos componente (TCS) que está involucrado en la adaptación al bajo nivel de magnesio, la expresión de virulencia y la resistencia a la polimixina en patógenos Gram-negativos (Hu *et al.*, 2023), se menciona que el indol tiene un efecto negativo *phoPQ* que conlleva a la subexpresión de los genes *hila*, *prgH*, *invF* y *sipC* los cual pertenece a la SPI-1 a 1mM de indol en medio LB. Otro punto que abarcan es la disminución de la motilidad de *Salmonella* donde Nikaido *et al.*, 2012, reportan que el indol reprime la expresión de genes como *FliZ* y *fliA* los cuales son genes

flagelares de *Salmonella*, explican que existe una red reguladora de FliZ y esta es reducida por la presencia de bacterias tratadas por indol, esta red regula genes de SPI-1 y genes flagelares por ello observaron la subexpresión de los genes *ramA* e *hilA*.

Kohli *et al.*, 2018 también reportan que usando *Salmonella typhimurium* crecida en LB y otra tratada con indol a 1mM se administró en ratones en los cuales se pudo observar que la cepa tratada invadió los macrófagos de murinos J774A aproximadamente 2 veces menos que los controles no tratados con indol.

La subexpresión del gene *invA* se puede interpretar como la falta de virulencia de *Salmonella* en el medio que se encuentre, ya sea en el intestino o en un tubo de ensayo, el indol inhibe en *Salmonella* tal capacidad, por lo que el indol es un señalizador para esta o una molécula que le ayude a expresar los genes de la SPI-1 y además de los genes de virulencia, también lo flagelares como se mencionó anteriormente, lo que podría decirse que limita mucho a esta bacteria.

El indol no indica la sobreexpresión de los genes de virulencia de la SPI-1, y aunque en este trabajo no se realizaron ensayos con antibióticos, Jin-Hyung & Jintae, 2010 demostraron que el indol mejora la supervivencia de *E. coli* y *Salmonella* tratadas con antibióticos en condiciones de 2mM de indol en medio LB a 37°C, esto puede deberse a la inducción de estrés oxidativo y un estado de shock en bacteriofagos; por lo tanto, los patógenos que no producen indol (como *Salmonella*) pueden beneficiarse potencialmente de la señalización mediada por indol (Jin-Hyung & Jintae, 2010; Kim & Park, 2015).

Conclusión

Salmonella presenta un efecto dosis-dependiente donde a mayor concentración de indol existe un menor crecimiento. Existe una regulación negativa de la expresión del gene *invA* de *Salmonella typhimurium* el cual es un gene que pertenece a la SPI-1, en presencia de 1 mM de indol, sin importar que se encuentre en un medio mínimo como M9.

Bibliografía.

- Castillo, R. J. (2023). Indole as a regulator of bacterial physiology. *Mexican Journal of Medical Research ICSa*. 11(21): 9-13
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*, 1(2), 581–585. doi:10.1038/nprot.2006.83
doi:10.1371/journal.pone.0159676
- dos Santos, A.M.P., Ferrari, R.G. & Conte-Junior, C.A. (2018). Virulence Factors in *Salmonella* Typhimurium: The Sagacity of a Bacterium. *Curr Microbiol* **76**, 762– 773. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1510-4>
- Ghosh, R.K., Hilario, E., Chang, C-eA., Mueller, L.J. and Dunn, M.F. (2022). Allosteric regulation of substrate channeling: *Salmonella typhimurium* tryptophan synthase. *Front. Mol. Biosci.* 9:923042. doi: 10.3389/fmolb.2022.923042
- Grifka-Walk H.M., Jenkins, B.R. and Kominsky D.J. (2021). Amino Acid Trp: The Far Out Impacts of Host and Commensal Tryptophan Metabolism. *Front. Immunol.* 12:653208. doi: 10.3389/fimmu.2021.653208
- Hu M, Zhang Y, Huang X, He M, Zhu J, Zhang Z, Cui Y, He S, Shi X. 2023. PhoPQ Regulates Quinolone and Cephalosporin Resistance Formation in *Salmonella* Enteritidis at the Transcriptional Level. *mBio*14:e03395-22.<https://doi.org/10.1128/mbio.03395-22>
- Jajere, S.M. (2019). A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Vet World.* 12(4):504-521. doi: 10.14202/vetworld.2019.504-521.

Jin-Hyung Lee & Jintae Lee. (2010). Indole as an intercellular signal in microbial communities, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 34, 4, 426–444, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00204.x>

Kim, J., & Park, W. (2015). Indole: a signaling molecule or a mere metabolic byproduct that alters bacterial physiology at a high concentration? *Journal of Microbiology*, 53(7), 421–428. doi:10.1007/s12275-015-5273-3

Kohli N, Crisp Z, Riordan R, Li M, Alaniz RC, Jayaraman A (2018) The microbiota metabolite indole inhibits *Salmonella* virulence: Involvement of the PhoPQ two-component system. *PLoS ONE* 13(1): e0190613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190613>

Kumar, A. y Sperandio, V. (2019). Indole Signaling at the Host-Microbiota- Pathogen Interface. *Host-Microbe Biology*. 10 (3) .*Microorganisms*, 10, 2211. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112211>

Blair JMA, Richmond GE, Bailey AM, Ivens A, Piddock LJV (2013) Choice of Bacterial Growth Medium Alters the Transcriptome and Phenotype of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *PLoS ONE* 8(5): e63912. doi:10.1371/journal.pone.0063912

Li, Q. 2022. Mechanisms for the Invasion and Dissemination of *Salmonella*. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. doi: 10.1155/2022/2655801. PMID: 35722038; PMCID: PMC9203224.

Liu, X., Jiang, Z., Liu, Z., Li, D., Liu, Z., Dong, X. & Yan, S. (2023). Research Progress of *Salmonella* Pathogenicity Island. *International Journal of Biology and Life Sciences*. 2; 3

Lou L, Zhang P, Piao R, Wang Y. *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and Its Complex Regulatory Network. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019 Jul 31;9:270. doi: 10.3389/fcimb.2019.00270. PMID: 31428589; PMCID:PMC6689963.

Naushad, S., Ogunremi, D., & Huang, H. (2023). *Salmonella*: A Brief Review. *IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.112948

Nikaido E, Giraud E, Baucheron S, Yamasaki S, Wiedemann A, Okamoto K, Takagi T, Yamaguchi A, Cloeckert A, Nishino K. (2012). Effects of indole on drug resistance and virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium revealed by

genome-wide analyses. *Gut Pathog.* 4(1):5. doi: 10.1186/1757-4749-4-5. PMID: 22632036; PMCID: PMC3405474.

Nikaido E, Yamaguchi A, Nishino K. (2008). AcrAB multidrug efflux pump regulation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by RamA in response to environmental signals. *J Biol Chem.*283(35):24245-53. doi: 10.1074/jbc.M804544200. Epub. PMID: 18577510; PMCID: PMC2527123.

Oludairo, O.O., Kwaga, J.P.K., Abdu, P.A., Gitanjali, A., Perrets, A., Cibin, V., Lettini, A., Aiyedun, J. (2022). A Review on *Salmonella* Characteristics, Taxonomy, Nomenclature with Special Reference to Non-Typhoidal and Typhoidal Salmonellosis. *Zagazig Veterinary Journal*, ©Faculty of Veterinary Medicine. 6, 50; 161-176

Quan G, Xia P, Zhao J, Zhu C, Meng X, Yang Y, Wang Y, Tian Y, Ding X, Zhu G. 2019. Fimbriae and related receptors for *Salmonella* Enteritidis. *Microb Pathog.* doi: 10.1016/j.micpath.2018.10.025. Epub 2018 Oct 19. PMID: 30347261.

Sridhar S, Steele-Mortimer O. (2016). Inherent Variability of Growth Media Impacts the Ability of *Salmonella* Typhimurium to Interact with Host Cells. *PLoS ONE* 11(6): e0157043. doi:10.1371/journal.pone.0157043

Sun, H., Wan, Y., Du, P., & Bai, L. (2019). *The Epidemiology of Monophasic Salmonella Typhimurium. Foodborne Pathogens and Disease.* 20, 20. doi:10.1089/fpd.2019.2676

Yurist-Doutsch S, Arrieta M-C, Tupin A, Valdez Y, Antunes LCM, Yen R, et al. (2016) Nutrient Deprivation Affects *Salmonella* Invasion and Its Interaction with the Gastrointestinal Microbiota. *PLoS ONE* 11(7): e0159676.

Zarkan, A., Liu, J., Matuszewska, M., Gaimster, H., & Summers, D. K. (2020). *Local and Universal Action: The Paradoxes of Indole Signalling in Bacteria. Trends in Microbiology.* doi:10.1016/j.tim.2020.02.00

Zhang, X., Liu, B., Ding, X., Bin, P., Yang, Y., Zhu, G. (2022). Regulatory Mechanisms between Quorum Sensing and Virulence in *Salmonella*