



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y
BIOLÓGICAS “DR. IGNACIO CHÁVEZ”
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

Tesis:

Determinación del efecto regulador de MreB sobre la actividad de FliCDTZ/FlhCD en la función flagelar mediante la interacción con FliA en *Salmonella enterica*

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

P r e s e n t a:

QFB JOSÉ MANUEL MANRIQUEZ FLORES

Directora de tesis:

D.C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas

Co-directora de tesis:

D.C. Reyna Cristina Zepeda Gurrola

Morelia, Mich. Agosto, 2021



ÍNDICE

1. MARCO TEÓRICO	6
1.1 Clasificación del género <i>Salmonella</i>	6
1.2 Epidemiología de <i>Salmonella enterica</i>	6
1.3 Patogénesis de <i>Salmonella enterica</i>	8
1.4 Citoesqueleto en eucariotas	11
1.4.1 Filamentos de actina	11
1.4.2 Microtúbulos	12
1.4.3 Filamentos intermedios	12
1.5 Citoesqueleto en procariotas	13
1.6 Descripción estructural y funcional de la proteína del citoesqueleto bacteriano MreB	14
1.6.1 Función de la proteína MreB en <i>Salmonella enterica</i>	15
1.6.2 Papel de las proteínas FliACDTZ/FliHCD en la función flagelar de <i>Salmonella enterica</i>	17
1.7 Tipificación de <i>Salmonella enterica</i> mediante Secuencias Tipo	18
1.7.1 Reemplazo del genotipo ST19 de <i>Salmonella entérica</i> en distintas regiones geográficas	19
1.8 Motilidad diferencial en los genotipos ST19 y 213 de <i>Salmonella enterica</i>	21
1.9 Predicción <i>in silico</i> de la interacción proteína-proteína	22
1.10 Dinámica molecular	23
2. JUSTIFICACIÓN	25
3. HIPÓTESIS	26
4. OBJETIVOS	26
4.1 Objetivo General	26
4.2 Objetivos específicos	26
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	27
6. MATERIAL Y MÉTODOS	28
6.1 Material Biológico	28
6.2 Mantenimiento y cultivo de las cepas bacterianas	28
6.3 Extracción de ADN	28
6.4 Diseño de iniciadores para la amplificación de genes flagelares y proteínas MreBCD	29
6.5 Reacciones de amplificación	29
6.6 Secuenciación	31
6.7 Análisis genómico comparativo de las secuencias	31
6.8 Modelado por homología	31

6.9 Dinámica molecular	32
6.10 Predicción de interacciones proteína-proteína.....	32
6.11 Evaluación de los segundos coeficientes viriales	32
7. RESULTADOS	33
7.1 Establecimiento de un interactoma preliminar	33
7.2 Amplificación de los genes que codifican para las proteínas seleccionadas.....	33
7.3 Variaciones intergenotípicas en las proteínas seleccionadas de <i>Salmonella enterica</i>	34
7.4 Validación de los modelos generados por homología de las proteínas seleccionadas	36
7.5 Análisis genómico comparativo del gen <i>fliC</i>	38
7.6 Predicción de interacciones proteína-proteína.....	39
7.7 Simulación de dinámica molecular de MreB-FliA y MreBCD-FliA en los genotipos ST19 y ST213 de <i>Salmonella enterica</i>	41
7.8 Establecimiento de los sitios de contacto en la interacción MreBCD y FliA en <i>Salmonella Typhimurium</i>	43
7.9 Interactoma comparativo de la regulación de MreBCD sobre los elementos flagelares en los genotipos ST19 y ST213 de <i>Salmonella enterica</i>	45
7.10 Determinación del segundo coeficiente virial para las interacciones entre MreBCD y FliA en los genotipos ST19 y ST213 de <i>Salmonella Typhimurium</i>	46
8. DISCUSIÓN.....	48
9. CONCLUSIONES	53
10. BIBLIOGRAFÍA.....	54
11. ANEXOS.....	60

RESUMEN

Introducción: *S. enterica* es el agente etiológico de la salmonelosis, enfermedad que presenta una alta incidencia a nivel mundial. El genotipo secuencia tipo (ST) 19 de *S. enterica* serotipo Typhimurium, es el genotipo ancestral y más abundante a nivel mundial. Sin embargo, el genotipo ST213 reportado por primera vez en México, ha reemplazado a la ST19 en este país. Nuestro grupo de trabajo encontró que el genotipo emergente de ST213, es más resistente que el ST19 a condiciones asociadas a preservación de alimentos, presenta mayor motilidad y resistencia a antibiótico, así como mayor virulencia, lo que constituye un problema de salud pública. Por otro lado, se ha reportado la participación de proteínas del citoesqueleto bacteriano MreBCD en la motilidad de esta bacteria por su incidencia en la expresión de los genes flagelares *fliACDTZ* y *flhCD*. La relevancia de la asociación entre estas proteínas, radica en que la virulencia del microorganismo en el hospedero, está en función de factores que incluyen la motilidad mediada por flagelos (de cuya regulación se sabe poco) y del genotipo.

Objetivo general: Elucidar la participación de MreB en la función flagelar de *S. enterica* serotipo Typhimurium en los genotipos ST19 y ST213. **Metodología:** se amplificaron los genes de *mreBCD*, *fliACDTZ* y *flhCD* de *S. Typhimurium*, a partir de ADN genómico de cepas genotipo ST19 y ST213. Los amplicones se secuenciaron y se realizó la traducción *in silico*. Las secuencias aminoacídicas fueron alineadas y comparadas entre genotipos, a fin de observar diferencias que resultaran en cambios estructurales, para emplearlas en la generación de modelos tridimensionales de las proteínas seleccionadas. A partir de los modelos establecidos, se predijeron las interacciones proteína-proteína, basadas en la complementariedad geométrica, para establecer un interactoma que explicara la vía de regulación diferencial de MreBCD, sobre los factores flagelares, en dos genotipos diferentes de *S. Typhimurium*. Las interacciones MreB-FliA y MreBCD-FliA se sometieron a un análisis de dinámica molecular y de determinación de los segundos coeficientes viriales, para determinar mediante parámetros fisicoquímicos, la factibilidad de estas interacciones en ambos genotipos. Se comparó estructuralmente el gen *fliC* en 100 genomas del serotipo Typhimurium y en 100 genomas de diferentes serotipos de *S. enterica*. **Resultados:** Del total de las proteínas seleccionadas, FliA y dos flagelinas presentaron diferencias estructurales entre genotipos. El análisis BLAST arrojó que en ST19 la flagelina correspondía a FljB y en ST213 a FliC. El análisis genómico comparativo de *fliC* mostró pseudogenización del mismo en ST19, sugiriendo que en este genotipo se expresaría FljB y en ST213 FliC y FljB, explicando la mayor motilidad reportada en este último. El interactoma indicó que MreB podría regular a la totalidad de factores flagelares y de manera diferencial entre genotipos a FliA. La dinámica molecular y los segundos coeficientes viriales sugirieron la regulación de FliA por MreB en ST213 y por MreBCD en ST19, a un coeficiente osmótico mayor en este último genotipo. Estos resultados sugieren que MreB podría representar una ventaja adaptativa en el genotipo emergente, en cuanto a motilidad se refiere, coadyuvando en el desplazamiento del genotipo ancestral ST19. La ventaja de motilidad en el genotipo emergente, daría como resultado una disminución en el tiempo tanto de colonización de las células intestinales, como en la infección por el patógeno en el hospedero.

PALABRAS CLAVES: Flagelo, reemplazo, motilidad, citoesqueleto, bioinformática

ABSTRACT

Introduction: *S. enterica* is the etiological agent of salmonellosis, a disease that has a high incidence worldwide. The genotype sequence type (ST) 19 of *S. enterica* serotype Typhimurium, is the ancestral and most abundant genotype in the world. However, the ST213 genotype, first reported in Mexico, has replaced ST19 in this country. Our working group found that the emerging genotype of ST213 is more resistant than ST19 to conditions associated with food preservation, it has greater motility and resistance to antibiotics, as well as greater virulence, which constitutes a public health problem. On the other hand, the participation of proteins of the bacterial cytoskeleton MreBCD in the motility of this bacterium has been reported due to its incidence in the expression of the flagellar genes *fliACDTZ* and *flhCD*. The relevance of the association between these proteins lies in the fact that the virulence of the microorganism in the host is a function of factors that include motility mediated by flagella (about whose regulation little is known) and the genotype. **General objective:** To elucidate the participation of MreB in the flagellar function of *S. enterica* serotype Typhimurium in genotypes ST19 and ST213. **Methodology:** *S. Typhimurium* *mreBCD*, *fliACDTZ* and *flhCD* genes were amplified from genomic DNA of genotype ST19 and ST213 strains. The amplicons were sequenced and in silico translation performed. The amino acid sequences were aligned and compared between genotypes, to observe differences that resulted in structural changes, to use them in the generation of three-dimensional models of the selected proteins. From the established models, protein-protein interactions were predicted, based on geometric complementarity, to establish an interactome that explained the differential regulation pathway of MreBCD, on flagellar factors, in two different genotypes of *S. Typhimurium*. The MreB-FliA and MreBCD-FliA interactions were subjected to an analysis of molecular dynamics and the determination of the second virial coefficients, to determine by means of physicochemical parameters, the feasibility of these interactions in both genotypes. The *fliC* gene was structurally compared in 100 genomes of the Typhimurium serotype and in 100 genomes of different serotypes of *S. enterica*. **Results:** Of the total of the selected proteins, FliA and two flagellins showed structural differences between genotypes. BLAST analysis showed that flagellin corresponded to FljB in ST19 and FliC in ST213. The comparative genomic analysis of *fliC* showed pseudogenization of the same in ST19, suggesting that FljB would be expressed in this genotype and in ST213 FliC and FljB, explaining the higher motility reported in the latter. The interactome indicated that MreB could regulate all flagellar factors and FliA differentially between genotypes. Molecular dynamics and second virial coefficients suggested the regulation of FliA by MreB in ST213 and by MreBCD in ST19, at a higher osmotic coefficient in the latter genotype. These results suggest that MreB could represent an adaptive advantage in the emerging genotype, in terms of motility, contributing to the displacement of the ancestral ST19 genotype. The advantage of motility in the emerging genotype would result in a decrease in the time both of colonization of the intestinal cells, and in the infection by the pathogen in the host.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Clasificación del género *Salmonella*

Salmonella enterica es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, de forma bacilar, que mide de 2 a 5 μm de largo por 0.5 a 1.5 μm de ancho y es móvil gracias a la presencia de flagelos en disposición períttrica. El tamaño del genoma de este microorganismo va de 4460 a 4857 kb (Yap *et al.*, 2014; Andino & Hanning, 2015). El género *Salmonella* comprende a las especies *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, reconociéndose seis subespecies de esta última: Subespecie I *enterica*, subespecie II *salamae* Subespecie III *arizonae*, subespecie IIIb *diarizonae*, Subespecie IV *houtanae* y subespecie VI *indica* (Andino & Hanning, 2015).

Las especies de *Salmonella* presentan más de dos mil quinientos serotipos descritos en el esquema Kauffman- White, determinados por la composición de los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y de superficie (k). *S. enterica* subespecie *enterica* incluye al 99% de los serotipos aislados de muestras clínicas. Estos han sido establecidos con base en la porción de polisacárido de la capa de lipopolisacárido (antígeno O) y la porción de filamento del flagelo (antígeno H) presentes en la superficie celular de la bacteria. El 99% de los serotipos descritos se encuentran dentro de la especie *enterica* (Cuadro 1), la cual contiene la mayoría de los serotipos patógenos para el humano (Lavalett *et al.*, 2009).

Cuadro 1. Clasificación del género *Salmonella*

Especie/Subespecie	Número de serotipos
<i>Salmonella enterica</i>	2557
<i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> (subespecie I)	1547
<i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>salamae</i> (subespecie II)	513
<i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>arizonae</i> (subespecie III)	100
<i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>diarizonae</i> (subespecie IIIb)	341
<i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>houtanae</i> (subespecie IV)	73
<i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>indica</i> (subespecie VI)	13
<i>Salmonella bongori</i>	22
Total	2579

1.2 Epidemiología de *Salmonella enterica*

La enfermedad diarreica sigue siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad a nivel global. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente 1,900 millones de personas en todo el mundo enferman de diarrea cada año y 715,000 mueren (OMS, 2018). A nivel mundial, las infecciones gastrointestinales son una de las causas más importantes de morbimortalidad entre los lactantes y niños. Se ha estimado que, en Asia, África y Latinoamérica, la probabilidad de que un niño muera antes de los 5 años puede llegar a 50%, aunque esto depende de factores socioeconómicos y nutricionales (Hernández *et al.*, 2011). Según estas estimaciones, aproximadamente un tercio de estas infecciones se transmiten a través de los alimentos. *S. enterica* es responsable del 9% (180 millones) de las enfermedades diarreicas globales cada año, sin embargo, un número desproporcionado de muertes (298 mil, o el 41% de todas las muertes asociadas a enfermedades diarreicas) se puede atribuir a la infección por esta bacteria. Los casos de salmonelosis están relacionados con las condiciones de vida y sanitarias de un país. La mejora de las condiciones sanitarias, el sistema de evacuación de aguas residuales, la cloración de las aguas y la detección y el tratamiento de portadores, han hecho que esta enfermedad disminuya de forma importante en los países desarrollados, aunque en los países en vías de desarrollo continúa siendo un padecimiento frecuente (Hernández *et al.*, 2011). Los serotipos causales de diarrea no están distribuidos uniformemente en todo el mundo y varios de ellos designados genéricamente como *Salmonella* no tifoidea (NTS por sus siglas en inglés “Non Typhoidal *Salmonella*”) son más comunes en África (Besser, 2018).

La epidemiología de este patógeno ha variado durante las últimas décadas debido a las tendencias en la producción y el consumo de alimentos, el aumento en la industrialización y la globalización del suministro alimentario, la demanda creciente de alimentos listos para comer y los alimentos crudos o ligeramente cocidos, así como al envejecimiento de las poblaciones y el aumento reciente en la proporción de individuos inmunológicamente comprometidos y el uso de antibióticos en la producción animal (Tauxe *et al.*, 2010).

En México, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) reportó para el año 2017, una incidencia de salmonelosis de 62 casos confirmados por cada 100,000 habitantes. En 2018, la Dirección General de Epidemiología (DGE) junto con la Secretaría de Salud (SSA), reportaron 5,375,702 casos. El estado con menor incidencia de casos de

salmonelosis es Colima (43,245 casos), mientras que el Estado de México reportó la mayor incidencia de los mismos (506,823 casos). Para Michoacán, el número de casos reportados asciende a 162,722 (DGE 2018, SSA 2017).

1.3 Patogénesis de *Salmonella enterica*

La infección por *Salmonella enterica* comienza con la ingestión de alimentos contaminados. El primer obstáculo por superar dentro del huésped es el pH ácido del estómago, el cual oscila entre 1.5 y 4. Para protegerse contra el shock ácido severo, *S. enterica* activa la respuesta de tolerancia al ácido (ATR por sus siglas en inglés, “Acid Tolerance Response”), que proporciona una función homeostática inducible para mantener el pH intracelular a valores más altos que los del ambiente extracelular (Lianou *et. al.*, 2017). Después de ingresar al intestino delgado, el patógeno debe alcanzar y atravesar la mucosa intestinal antes de adherirse a las células epiteliales intestinales (Fàbrega & Vila, 2013).

Las fimbrias agregativas delgadas o Tafi (por sus siglas en inglés, “Thin Aggregates Fimbrias”), son estructuras superficiales de naturaleza proteica consideradas adhesinas que facilitan la unión de la bacteria a receptores específicos de las células del hospedero. Estas estructuras son producidas junto con celulosa (White *et al.*, 2003), polisacáridos adicionales y proteínas BapA (por sus siglas en inglés, “Biofilm Associated Protein”) para formar una matriz extracelular que enlaza a las células. El fenotipo asociado con la producción de la matriz se ha denominado morfotipo *rdar* (por sus siglas en inglés “red, dry and rough”). El control regulador de *rdar* se enfoca primariamente al nivel de expresión de *agfD*, que codifica para una proteína con función de regulador transcripcional. AgfD activa la producción de las fimbrias agregativas delgadas y polímeros de celulosa, lo que permite a las células responder rápidamente a los desafíos ambientales. Adicionalmente, el di-guanosín monofosfato cíclico (c-di-GMP), se ha involucrado en la producción de celulosa bacteriana, así como en la modificación de la superficie celular, que le permite regular la formación de biopelículas, la motilidad y la virulencia, entre otros procesos bacterianos (White *et al.*, 2003).

Poco después de la adhesión, el proceso de invasión aparece como consecuencia de las vías de señalización de la célula huésped comprometida, que conducen a reordenamientos significativos del citoesqueleto. Estas modificaciones internas interrumpen

el borde de las microvellosidades intestinales e inducen la formación subsiguiente de vacuolas de membrana o SCV (por sus siglas en inglés, “*Salmonella* Containing Vacuole”) que envuelven a la bacteria. Estas vacuolas representan el único compartimento intracelular en el que *S. enterica* sobrevive y se replica (Fàbrega & Vila, 2013).

Simultáneamente, la inducción de una respuesta secretora en el epitelio intestinal inicia el reclutamiento y la migración de los fagocitos desde el espacio submucoso hacia la luz intestinal. Este proceso está asociado con la producción de varias citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina-8 (IL-8) (Ohl & Miller, 2001; Boyen *et al.*, 2008). Las SCVs se integran inicialmente dentro de la vía endocítica temprana; sin embargo, deben desacoplarse posteriormente para evitar el suministro de enzimas lisosomales. Esta acción depende de los cambios dirigidos por la bacteria en el tráfico endocítico del huésped y para evitar, eventualmente, la fusión con lisosomas secundarios. Durante la maduración de las SCV, la bacteria induce la formación *de novo* de una malla de actina filamentosa (F-actina) alrededor de las vacuolas bacterianas, un proceso que se denomina polimerización de actina asociada a la vacuola o VAP (por sus siglas en inglés “Vacuolar Actin Polymerization”) y es importante para mantener la integridad de la membrana de la vacuola (Méresse *et al.*, 2001). Las SCVs migran posteriormente a una posición perinuclear, cerca del aparato de Golgi del hospedero, presumiblemente para facilitar la intercepción de vesículas de transporte endocítico y exocítico, a fin de obtener nutrientes y/o fragmentos de membrana. Este evento parece ser esencial para la replicación bacteriana. Además, se ha observado que el microorganismo puede inducir la formación de estructuras largas de membrana filamentosa llamadas filamentos SIF (por sus siglas en inglés, “*Salmonella*-Induced Filaments”) (Knodler *et al.*, 2003). Los SIFs son agregados tubulares a lo largo de un andamio de microtúbulos y se originan a partir de las SCVs y se extienden por toda la célula. Aunque el papel biológico de la inducción de SIF no se comprende completamente, se ha postulado que este proceso puede conducir a una mayor disponibilidad de nutrientes que, de otro modo, podrían estar limitados dentro de las SCVs (Rajashekar *et al.*, 2008). A partir de este momento, una fracción de estas SCVs se ubica en la membrana basolateral. Una vez que atraviesan el epitelio intestinal, las bacterias son fagocitadas por el hospedero (Rajashekar *et al.*, 2008).

Se ha reportado que tres tipos de fagocitos interactúan con *S. enterica*: los

neutrófilos, los monocitos inflamatorios (que se diferencian en macrófagos) y las células dendríticas (otro tipo de monocitos que funcionan como células presentadoras de antígenos). Los dos primeros tipos de células se reclutan de la sangre en respuesta a las señales inflamatorias. En términos generales, dado que la mayoría de las células bacterianas han atravesado el epitelio a través de las células M, alcanzan directamente las placas de Peyer y posteriormente los ganglios linfáticos mesentéricos, denominados MLN (por sus siglas en inglés, “Mesenteric Lymph Nodes”) a través de la linfa intestinal, muy probablemente transportada por células dendríticas (Fàbrega & Vila, 2013).

No obstante, también se tienen reportes de que las células dendríticas captan directamente las bacterias de la luz intestinal, abriendo las uniones estrechas y enviando a las células dendríticas a la luz. Los experimentos realizados por Rydstrom y Wick (2007) indican que los monocitos inflamatorios (macrófagos) son aquellos fagocitos que se acumulan predominantemente en las placas de Peyer y los ganglios linfáticos mesentéricos, seguido de los neutrófilos. Posteriormente, la bacteria es fagocitada y se internaliza nuevamente dentro de las SCVs, lo que desencadena una respuesta similar a la reportada dentro de las células epiteliales M para asegurar la supervivencia y replicación bacteriana. La migración de estos fagocitos infectados, predominantemente macrófagos, facilita la diseminación sistémica de las bacterias a través del torrente sanguíneo a varios tejidos adicionales, como el bazo y el hígado, donde este patógeno se replica preferentemente. También se ha sugerido que el acceso directo a la sangre puede darse por medio de los fagocitos infectados por *S. enterica* del lado basolateral del intestino, contribuye a la diseminación sistémica (Rydstrom & Wick, 2004). Esta hipótesis está respaldada por el hallazgo de fagocitos infectados en la sangre a los pocos minutos de la infección oral, y se atribuye a una manipulación de la motilidad de las células infectadas (Ohl & Miller, 2001).

Se han identificado elementos del citoesqueleto en bacterias, incluyendo *S. enterica*, que podrían estar involucrados en la patogénesis. Estos desempeñan funciones importantes en la morfología celular, la división celular, la segregación del ADN y el establecimiento de la polaridad celular. Sin embargo, el mecanismo molecular de la contribución del citoesqueleto bacteriano a la virulencia bacteriana es desconocido (Doble et al., 2012).

1.4 Citoesqueleto en eucariotas

El citoesqueleto es la estructura mecánica principal de la célula. Está conformado por una red de biopolímeros compleja y dinámica que comprende microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios. Tanto los filamentos individuales como la red completa no son solo elásticos simples, sino estructuras altamente tridimensionales (Pegoraro *et al.*, 2017).

Para que las células funcionen correctamente, todos los tipos de filamentos deben organizarse e interaccionar mecánicamente entre sí y con su entorno. Diversos tipos celulares tienen que cambiar su forma y moverse de un lugar a otro. Además, todas las células deben reorganizar sus componentes internos a medida que crecen, se dividen y se adaptan a las circunstancias cambiantes. Estas funciones espaciales y mecánicas dependen de un notable sistema de filamentos del citoesqueleto. Las funciones variadas del citoesqueleto dependen del comportamiento de tres familias de filamentos de proteínas, filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios. Cada tipo de filamento tiene distintas propiedades mecánicas, dinámicas y roles biológicos, pero todos comparten ciertas características fundamentales (Wickstead & Gull, 2011).

1.4.1 Filamentos de actina

La actina es una proteína globular altamente conservada que se encuentra en casi todas las células eucariotas. Esta proteína forma estructuras de andamios celulares que proporcionan a las células su forma, al mismo tiempo que desempeña otras funciones como soporte de tensión, transporte vesicular intracelular, unión celular, propiedades de adhesión y la capacidad de moverse. Además de estas funciones mecánicas bien estudiadas, la actina también desempeña un papel más sutil en la transducción de señales químicas (Heng & Koh, 2010).

El citoesqueleto de actina celular emerge del ensamblaje de la actina globular (G-actina) en filamentos de doble hélice (F-actina) (Fujii *et al.*, 2010; Oda *et al.*, 2009). La generación y el desmontaje de la F-actina tiene que ser un proceso altamente dinámico para cumplir con la diversidad de funciones de la proteína (Blanchoin *et al.*, 2014). La polimerización espontánea de G-actina en filamentos se previene por la relativa inestabilidad del dímero o trímero de actina y por proteínas de unión secuestradoras de G-actina, tales como profilina y β -timosina, respectivamente (Sept & McCammon, 2001; Xue & Robinson,

2013). Existen dos variantes de actina, la alfa y la beta. La actina beta aparece en la mayoría de las células animales, siendo la actina alfa particularmente abundante en el músculo. La actina es una proteína citosólica muy abundante, representando aproximadamente el 10% de las proteínas de dicho espacio celular. Cierta porción se encuentra formando parte de los filamentos de actina y el resto son proteínas no polimerizadas (Rottner *et al.*, 2017).

La actina es de suma importancia en la motilidad celular. Durante la polimerización de actina se produce una fuerza intracelular que hace que sobresalga una estructura delgada y plana llamada lamelipodio. La formación dinámica del lamelipodio está regulada por el ensamblaje y desmontaje local del filamento de actina (Herrmann & Aebi, 2016). Hay dos patrones de ensamblaje de filamentos de actina en el lamelipodio, ramificación y alargamiento, que promueven la formación de la red de actina en la protuberancia celular. Además, la despolimerización de actina y la desramificación se producen durante la migración, lo que facilita la remodelación dinámica de la red de actina y la extensión y retracción cíclica del lamelipodio (Herrmann & Aebi, 2016).

1.4.2 Microtúbulos

Los microtúbulos del citoesqueleto conforman el marco esquelético que da a las células eucariotas su forma y organiza su citoplasma colocando organelos, proporcionando rutas para el transporte y estableciendo la polaridad celular. En una célula en interfase, los microtúbulos del citoesqueleto son críticos para la motilidad celular y un componente clave de los cilios y flagelos. Durante la división celular, los microtúbulos se remodelan en una estructura de huso que segrega los cromosomas. Cada una de estas funciones se basa en una arquitectura citoesquelética específica, que debe ser capaz de un cambio rápido y prolongado, seguida de una eventual reanudación de un estado estable para responder al entorno celular y los cambios morfológicos durante el crecimiento y la diferenciación. Los microtúbulos están hechos de heterodímeros de α/β -tubulina, que se ensamblan en una estructura polar cilíndrica en presencia de GTP (Alfaro-Aco & Petry, 2015).

1.4.3 Filamentos intermedios

Las proteínas que pertenecen a la familia de filamentos intermedios son componentes estructurales ubicuos. Todas las proteínas de los filamentos intermedios muestran una

conformación helicoidal extendida, claramente organizada, propensa a tomar formas en espiral de dos hebras, que son los componentes básicos de estos filamentos citoesqueléticos altamente flexibles y resistentes al estrés. Las proteínas de estos filamentos están altamente cargadas, lo que representa anfolitos versátiles con múltiples funciones (Herrmann & Aebi, 2016).

El diámetro de los filamentos intermedios está en el intervalo de 10 nm y, por lo tanto, se denominaron “intermedios” entre los filamentos de actina y los microtúbulos. Estos filamentos son fibras resistentes, formadas por diversas proteínas relacionadas y dependen del tipo celular. Ejemplos de proteínas constituyentes de los filamentos intermedios, lo son la queratina y vimentina, entre otras (Herrmann & Aebi, 2016).

1.5 Citoesqueleto en procariotas

Las décadas de 1970 y 1980 vieron una extensa investigación sobre los microtúbulos y la actina. Durante este período, se llegó al consenso de que estos elementos del citoesqueleto eran exclusivos de los organismos eucariotas y que no existía nada relacionado con la tubulina o la actina en bacterias o arqueas. Este consenso fue desechado en la década de 1990, cuando una serie de descubrimientos revelaron que los procariotas presentaban homólogos de tubulina y actina, y que estos se ensamblaban en filamentos, constituyendo un citoesqueleto (Bork *et al.*, 1992; Raychaudhuri & Park, 1992; Mukherjee & Lutkenhaus, 1994).

El descubrimiento de actina bacteriana se complicó por la homología (ascendencia compartida) de la actina con otras familias de proteínas. Algunas veces, esto se indica mediante la identidad de secuencia de aminoácidos, pero a menudo esta identidad de secuencia es demasiado débil para reconocerla. La demostración definitiva de homología se dio a partir de la estructura proteica. Cuando se determinó la estructura de la actina mediante rayos X (Kabsch *et al.*, 1990), se observó que tenía un pliegue complejo que era idéntico al de la hexocinasa y también a la chaperona Hsp70. Debido a que este dominio es complejo, pero se compartió de manera precisa, se concluyó que los tres compartían una ascendencia común. Actualmente, la actina, la hexocinasa y la Hsp70 son homólogas y se consideran miembros de una superfamilia de actina (Erickson & Kozminski, 2017).

La primera sugerencia para los homólogos de actina en bacterias fue un estudio

teórico realizado por Bork y colaboradores en 1992. En este estudio, usaron las estructuras recientes de rayos X de la actina, la hexocinasa y la Hsp70 para realizar un alineamiento de secuencias basado en la estructura, que identificó cuatro secuencias cortas que se conservaron en toda la superfamilia. Posteriormente, buscaron estas secuencias en proteínas bacterianas, encontrándolas en las proteínas FtsA, MreB y ParM. Estas proteínas bacterianas presentaron mayor identidad en secuencia a Hsp70 y actina (Bork *et al.*, 1992).

La confirmación experimental de que MreB era una proteína homóloga de actina finalmente llegó nueve años después. Jones y colaboradores estudiaron la localización de MreB en bacterias mediante microscopía de luz, encontrando filamentos helicoidales que se localizaban debajo de la membrana (Jones *et al.*, 2001). En otro estudio en ese mismo año, Van den Ent y colaboradores (Van den Ent *et al.*, 2001) aislaron la proteína MreB y demostraron mediante microscopía electrónica, que ensamblaba filamentos delgados. Su descubrimiento principal fue que la cristalografía de rayos X mostró que MreB tenía el dominio de actina. Trabajos posteriores han descubierto múltiples proteínas en células procariotas homólogas a la actina, con una variedad de funciones citoesqueléticas, aunque las funciones de la mayoría son desconocidas.

Parece claro que tanto la tubulina como la actina tienen su ascendencia en bacterias y/o arqueas y proliferaron en diversas familias de filamentos del citoesqueleto. Una ironía interesante es que las funciones de la tubulina y la actina han intercambiado funciones de las bacterias a los eucariotas. Así, la proteína FtsZ, homóloga a la tubulina eucariota, forma el anillo citoquinético en las bacterias, mientras que la actina proporciona el marco citoesquelético principal en los eucariotas. Una conclusión global establece que una vez que una proteína ha adquirido la capacidad de ensamblar filamentos del citoesqueleto, estos pueden modificarse para realizar una amplia gama de funciones celulares útiles (Erickson & Kozminski, 2017).

1.6 Descripción estructural y funcional de la proteína del citoesqueleto bacteriano MreB

En 2001 Jones y colaboradores describieron que la proteína MreB, organiza estructuras helicoidales y le proporciona forma a la célula (Jones *et al.*, 2001). Esta proteína está organizada en estructuras filamentosas helicoidales que se enrollan alrededor de la célula,

debajo de la membrana celular. Así como la actina se asocia a la membrana a través de sitios de unión a fosfoinosítoles, MreB lo hace a través de fosfolípidos ácidos y algunas proteínas. Ésta le da la forma a la célula, constituyendo una red helicoidal por debajo de la membrana y participando en la síntesis de proteínas de la pared celular. La proteína MreB puede formar haces de estructura más rígida con propiedades similares a las de los filamentos intermedios (Shih *et al.*, 2006).

El gen *mreB* forma parte del operón *mre*, que también contiene genes que codifican para las proteínas MreC y MreD. El conjunto de proteínas MreB, C y D son indispensables para la viabilidad celular (Shih & Rothfield, 2006). Como se mencionó anteriormente, la proteína MreB es un homólogo bacteriano de la actina eucariota e interacciona íntimamente con MreC y MreD en bacterias bacilares (Lamas *et al.*, 2018). Se encuentra en la mayoría de las bacterias que no poseen forma esférica y es esencial para la determinación de la forma celular, pudiendo formar filamentos helicoidales alrededor del eje de la célula (Wang *et al.*, 2016).

MreB regula la síntesis de la pared celular y actúa controlando el ancho de la célula, ubicándose en los sitios iniciales de la nueva síntesis de dicha pared. Esta proteína es vital para la segregación cromosómica. La sobreexpresión de MreB puede generar filamentos helicoidales anormales y dar paso a un cromosoma anormal, lo que afecta en la división celular (Wang *et al.*, 2016). Los homólogos de MreB, tales como Mbl o ParM, regulan la forma de las células bacilares, organizando las enzimas biosintéticas de mureína en un patrón helicoidal orientado a lo largo del eje largo de la célula, lo que lleva al patrón de síntesis de mureína responsable de la forma bacteriana (Shih & Rothfield, 2006).

1.6.1 Función de la proteína MreB en *Salmonella enterica*

MreB presenta una identidad del 15% con la actina eucariota. La región más conservada de esta superfamilia de actina es el dominio ATPasa, por lo que puede polimerizar en estructuras filamentosas helicoidales importantes para la morfología celular (Bulmer *et al.*, 2012). Las proteínas del citoesqueleto bacteriano, incluyendo MreB, son reconocidas por sus funciones en la definición de la morfología celular, la división y la polaridad (Shih & Rothfield, 2006). MreB se ha implicado en la regulación de la localización polar o de la pared lateral de proteínas relacionadas con virulencia, incluidos los complejos de sistemas

de secreción, pili de tipo IV y proteínas de la motilidad. Las proteínas determinantes de la forma bacilar en *S. enterica*, MreB, MreC y MreD, no son la excepción y se codifican de forma contigua dentro del operón *mre*. Las proteínas de la membrana citoplásmica, MreC y MreD, pueden funcionar para unir MreB y la maquinaria de síntesis de peptidoglicano (Doble et al., 2012b).

Se ha señalado que la expresión de componentes importantes involucrados en la virulencia en *S. enterica*, tales como los genes relacionados con la motilidad bacteriana *flhCD*, puede verse afectada en función de las proteínas del citoesqueleto MreBCD. Esta regulación se ha relacionado con la actividad de la cinasa de respuesta a estrés RcsC. Dichas observaciones resaltan el potencial del citoesqueleto bacteriano como un objetivo para una nueva generación de terapias antimicrobianas (Doble et al., 2012).

Uno de los factores de virulencia involucrados en la fase inicial del proceso de infección, es el flagelo. El flagelo bacteriano es una estructura que desempeña un papel esencial en la motilidad, cuyos componentes principales son las proteínas denominadas flagelinas. Los flagelos son apéndices largos, capaces de rotar, con localización en la superficie bacteriana, otorgándole la capacidad de nadar en medios líquidos y desplazarse en superficies sólidas. Una vez que comienza la infección, gracias al flagelo la bacteria es capaz de percibir el sitio de invasión, células M y vellosidades del intestino delgado (Jones et al., 1992; Saini et al., 2011).

La motilidad y la quimiotaxis bacteriana están controladas por un regulador codificado por *flhD* y *flhC*, mismos que se localizan en el operón *flhDC*. Las proteínas FlhD y FlhC forman un complejo proteico que activa la transcripción de genes flagelares de clase II, que codifican para los componentes del cuerpo basal flagelar y la maquinaria de exportación de proteínas flagelares. Uno de los genes flagelares de clase II es *fliA*, el cual codifica para el factor sigma 28 de ARN polimerasa, que activa la expresión de los genes de clase III, codificantes de los componentes estructurales distales del flagelo. La cepa *MG1655* de *Escherichia coli*, enterobacteria al igual que *S. enterica*, tiene un elemento IS1 (por sus siglas en inglés “Insertion sequence 1”) en la región reguladora del promotor *flhDC*, que aumenta la expresión de estos genes y permite que esta cepa tenga hipermovilidad, en comparación con la cepa isogénica carente de este elemento (Beutin et al., 2016).

1.6.2 Papel de las proteínas FliACDTZ/FlhCD en la función flagelar de *Salmonella enterica*

La regulación y estructuración de flagelos en *S. enterica* es compleja. Los genes flagelares se organizan en 14 operones y su transcripción se organiza en una jerarquía reguladora (Fig. 1) de genes tempranos (clase I), medios (clase II) y tardíos (clase III) (Apel & Surette, 2008).

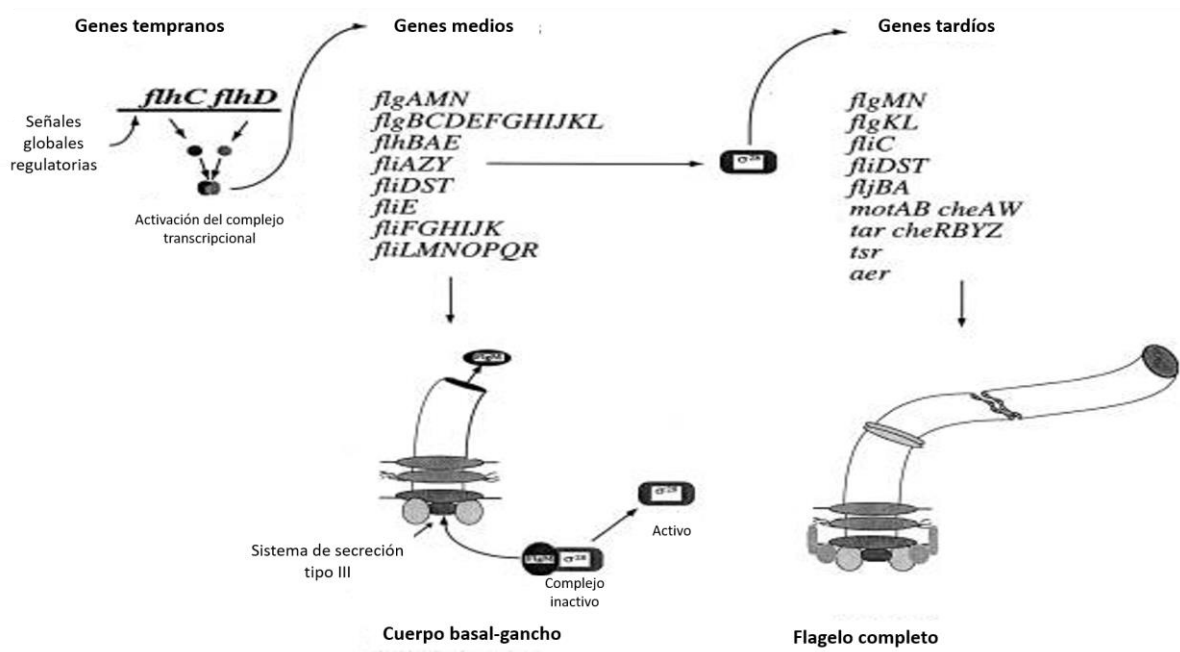


Figura 1. Jerarquía transcripcional de flagelos (Adaptado de Apel & Surette, 2008). Organización de los genes flagelares en genes tempranos, genes medios y genes tardíos.

El complejo proteico FlhCD de clase I es el regulador maestro, con FlhD y FlhC formando un heterotetrámero que se requiere para la activación transcripcional de los genes de clase II, que codifican los complejos del cuerpo basal y el gancho flagelar, además del factor de transcripción FliA. FliA por sí solo, o en conjunto con FlhCD, activa la expresión de los genes del operón de clase III, que codifican para la proteína de filamento, proteínas asociadas al gancho flagelar, proteínas motoras y de quimiotaxis. Los genes de clase III se subdividen en la clase de expresión independiente de FliA IIIa o clase IIIb (Shih *et al.*, 2006).

En 2012, Doble y colaboradores demostraron que las proteínas del citoesqueleto

MreBCD influyen directamente en la patogénesis de *S. enterica* (Doble *et al.*, 2012). Realizaron mutantes *knockout* para *mreC* ($\Delta mreC$) y *mreD* ($\Delta mreD$) en el microorganismo. Los resultados mostraron un fenotipo con forma esférica, una regulación negativa del sistema de secreción tipo 3 o T3SS (por sus siglas en inglés “Type 3 System Secretion”) de la Isla de patogenicidad 1 (SPI-1 por sus siglas en inglés “*Salmonella* Pathogenicity Island-1”), así como una reducción en la motilidad en la bacteria. Estos resultados sugieren que, respecto a la función flagelar, las proteínas MreCD pudieron incidir en la expresión de los genes que codifican para las proteínas flagelares FlhCD, debido a que se consideran reguladores maestros tanto de genes flagelares como de genes pertenecientes a la SPI-1 (Apel & Surette, 2008; Ellermeier & Slauch, 2007). La incidencia en la expresión pudo ser mediada por la cinasa RscC, que mediante fosforilación funge como sensor y regulador de la respuesta a estrés extracelular (Pando *et al.*, 2017). Cabe destacar que mutaciones *knockout* para *MreB* ($\Delta MreB$) no pudieron ser efectuadas, debido a que el gen es esencial en la mayoría de las células procariotas (Kruse *et al.*, 2005). Por tanto, en el estudio se realizó la inhibición química de MreB mediante el agente químico A22, que impide la polimerización de esta proteína, al unirse a su sitio activo y competir con el ATP, presumiblemente (Bean *et al.*, 2009). Los resultados mostraron un fenotipo esférico al igual que en las mutantes $\Delta mreC$ y $\Delta mreD$; sin embargo, la función de MreB en la regulación flagelar, no fue descrita.

1.7 Tipificación de *Salmonella enterica* mediante Secuencias Tipo

La capacidad de distinguir con precisión entre diferentes cepas de una misma especie bacteriana es de vital relevancia para la interpretación apropiada de los datos generados por los sistemas de vigilancia epidemiológica y para un mejor entendimiento de los procesos microevolutivos que llevan a la generación de cepas con mayor capacidad patogénica (Winfield & Groisman, 2004; Langridge *et al.*, 2015; Branchu *et al.*, 2018). La diversidad genética presente en las especies bacterianas patógenas del humano ha producido una diversidad proporcional de métodos de tipificación que varían ampliamente en su reproducibilidad y poder discriminatorio (Cooper & Feil, 2004).

La tipificación de secuencias multilocus (MLST por sus siglas en inglés: Multilocus Sequence Typing) se ha aplicado para la caracterización taxonómica de los principales patógenos bacterianos de humanos y se siguen desarrollando nuevos esquemas para taxones

de microorganismos patógenos y ambientales (Turner & Feil, 2007; Almeida *et al.*, 2010). La tipificación mediante MLST se basa en la secuenciación de múltiples fragmentos de genes de mantenimiento. Los aislados que poseen alelos idénticos para todos los fragmentos de genes se asignan a una secuencia tipo (ST por sus siglas en inglés “Sequence Typing”) común y los ST que comparten todos menos uno o dos alelos se agrupan en complejos clonales basados en dicha secuencia (Achtman *et al.*, 2012). En el caso de aislados de *S. enterica*, se utiliza un esquema de siete genes de mantenimiento, seleccionados sobre la base de que están dispersos alrededor del cromosoma, están flanqueados por genes de función conocida, son altamente conservados y no están sujetos a presión selectiva. Los genes utilizados son *aroC* (corismato sintasa), *dnaN* (ADN polimerasa III subunidad beta), *hemD* (uroporfirinógeno III cosintasa), *hisD* (histidinol deshidrogenasa), *purE* (fosforibosil aminoimidazol carboxilasa), *sucA* (alfa cetoglutarato deshidrogenasa) y *thrA* (aspartocinasa homoserina deshidrogenasa) (Kidgell *et al.*, 2002). Los números de alelos y secuencias tipo son asignadas de acuerdo con una base de datos MLST de acceso público. La base de datos MLST en 2020, contaba con datos de 302,006 aislados de 554 serotipos de *S. enterica* que se asignaron a 1,092 ST (<https://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/senterica>). Con estos datos se han realizado análisis en los que se ha correlacionado a la ST con ciertos hospederos y zonas geográficas (Achtman *et al.*, 2012). Al mismo tiempo, se ha establecido el genotipo ST19 como el genotipo ancestral dentro del serotipo Typhimuirum, del cual se han derivado varias STs más recientes. También, se ha comprobado que el genotipo ST19 presenta la distribución geográfica más amplia, distribuida prácticamente en todo el mundo (Achtman *et al.*, 2012).

1.7.1 Reemplazo del genotipo ST19 de *Salmonella enterica* en distintas regiones geográficas

Se ha documentado la prevalencia de ciertos genotipos de *S. enterica* serotipo Typhimurium, en determinadas regiones geográficas, así como el reemplazo del genotipo ancestral ST19. Así, en África subsahariana se ha identificado al genotipo ST313 como el responsable de desplazar al genotipo ST19, siendo responsable de la infección sistémica (Kingsley *et al.*, 2009). Interesantemente, en años recientes se ha comenzado a reportar la aparición del

genotipo ST313 fuera de África, en países como Reino Unido y Brasil (Almeida *et al.*, 2017; Ashton *et al.*, 2017).

Otro caso documentado de remplazo del genotipo ST19 es el de Guangdong, China, en donde entre 2007 y 2011 se identificaron aislados pertenecientes a la ST34 como los más prevalentes (71.1%), junto con ST19 (23.5%). De especial relevancia en salud pública asociado a dicho recambio, fue el hecho de que la mayoría de las cepas ST34 presentó resistencia a múltiples antibióticos (Wong *et al.*, 2013).

En México se ha observado que el genotipo ST213 ha desplazado al genotipo ST19 en muestras clínicas de 2002-2005 (Fig. 2) (Wiesner *et al.*, 2009).

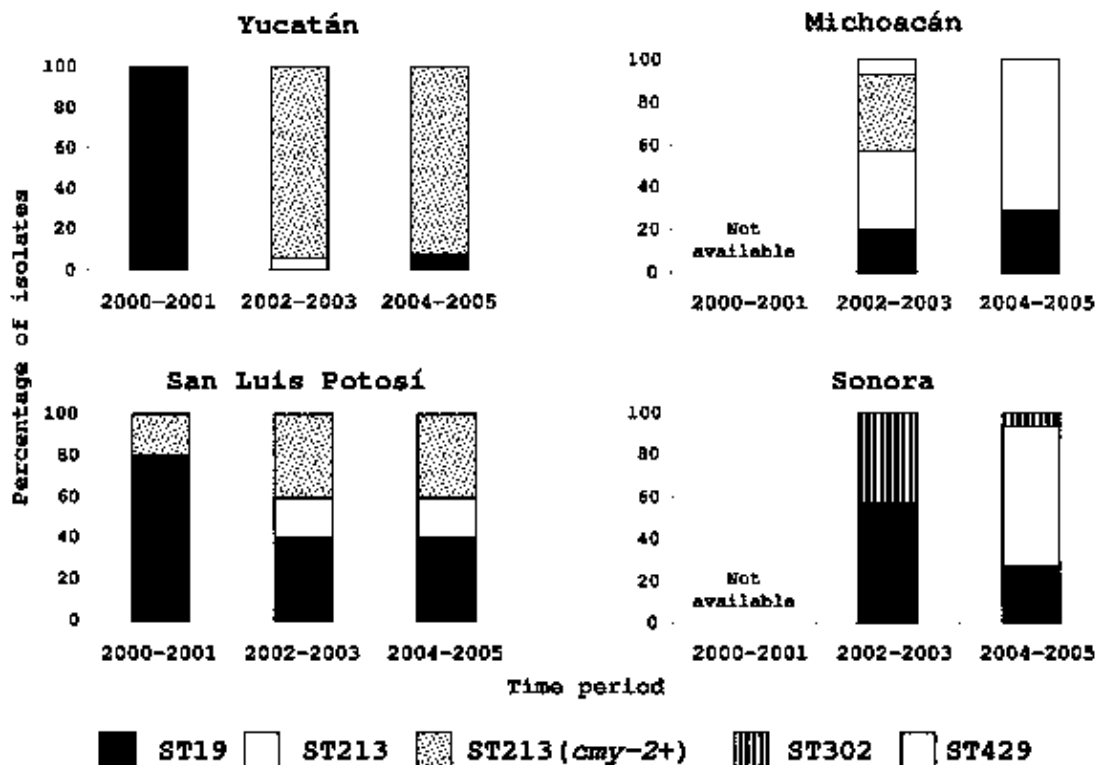


Figura 2. Distribución del porcentaje de genotipos de cepas de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium según el período de muestreo y la ubicación geográfica en México (Wiesner *et al.*, 2009). Porcentaje de aislamientos de cepas de *Salmonella enterica* en los estados de Yucatán, Michoacán, San Luis Potosí y Sonora.

Las cepas del genotipo emergente ST213 se han asociado con un fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (Wiesner *et al.*, 2009; Wiesner *et al.*, 2011). Estudiar aspectos fenotípicos y genéticos de las cepas con genotipo ST213, no solo es de relevancia

epidemiológica para México, ya que en años recientes se han detectado aislados pertenecientes a esta ST en países de Norte América, Europa y Asia (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>), lo que demuestra su éxito para dispersarse a otras regiones geográficas.

1.8 Motilidad diferencial en los genotipos ST19 y 213 de *Salmonella enterica*

Salmonella enterica posee la capacidad para desarrollar resistencia ante situaciones de estrés, por lo que puede responder a condiciones adversas de manera transitoria, a través de las llamadas respuestas de tolerancia al estrés. Las respuestas de tolerancia a estrés incluyen modificaciones estructurales y fisiológicas en la célula y están mediadas por una compleja maquinaria de regulación genética (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2015). La respuesta de *S. enterica* ante las diversas condiciones de estrés es relevante ya que interviene en la sobrevivencia y crecimiento de esta, dando paso a una afectación en la virulencia y la resistencia a antibióticos (Altier, 2005; Clements *et al.*, 2001).

En 2019, Gómez-Baltazar y colaboradores (Gómez-Baltazar, *et al.*, 2019) analizaron la motilidad de cepas pertenecientes a los genotipos ST213 y ST19 aisladas en Michoacán, México, encontrando una diferencia significativa en la capacidad de nado entre estas dos (Fig. 3). Sin embargo, a la fecha se desconocen las causas genéticas y moleculares que contribuyen a dichas diferencias, lo que representa relevancia en materia de salud pública debido a sus implicaciones epidemiológicas. Por lo que, en el presente proyecto, tiene especial interés en analizar las posibles diferencias en motilidad entre los genotipos ST213 y ST19, basándose en la predicción de interactomas, a fin de elucidar la ruta reguladora diferencial que sigue MreB sobre factores flagelares, en ambos genotipos.

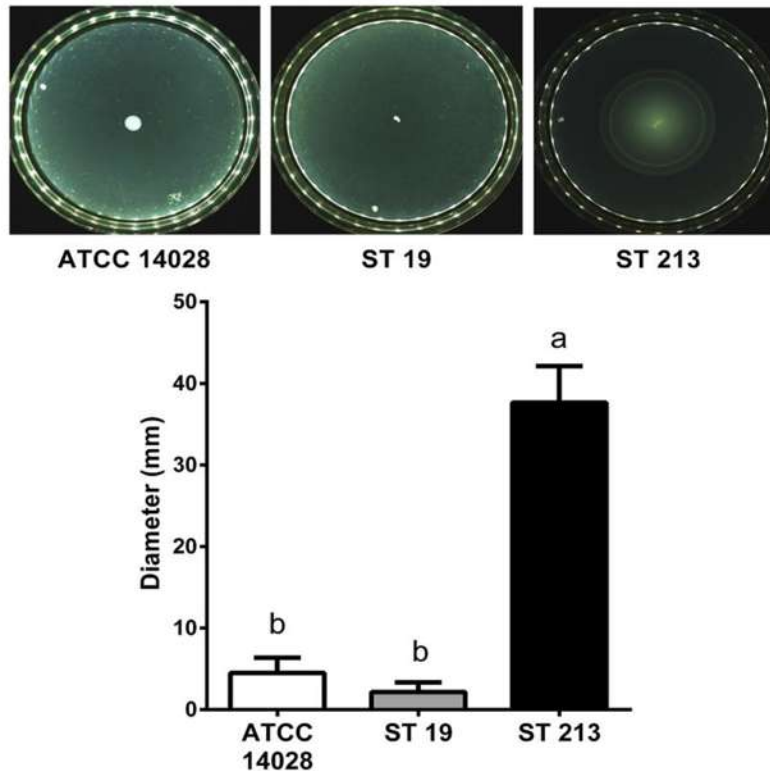


Figura 3. Ensayos de motilidad por nado en cepas de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium (Gómez-Baltazar *et al.*, 2019). Se evaluó la capacidad de desplazamiento por nado de 3 cepas de *Salmonella enterica*, una cepa de referencia ATCC14028, otra perteneciente al genotipo ST19 y otra ST213.

1.9 Predicción *in silico* de la interacción proteína-proteína

Las proteínas y sus interacciones funcionales forman la parte medular de la maquinaria celular. Su red de conectividad debe considerarse para la comprensión completa de los fenómenos biológicos. Sin embargo, la información disponible sobre las asociaciones proteína-proteína es incompleta.

Existen diversas bases de datos referentes a la predicción de interacciones proteína-proteína existentes. Un ejemplo es *STRING*, que tiene como objetivo recopilar, calificar e integrar todas las fuentes públicas de información de interacción proteína-proteína y complementarlas con predicciones computacionales, a fin de lograr una red global completa y objetiva, que incluya interacciones directas (físicas) e indirectas (funcionales). La última versión de *STRING* (11.0) trabaja con datos de 5,090 organismos (Szklarczyk *et al.*, 2018).

Cuando se requieren realizar predicciones binarias, el servidor web PRISM (por sus siglas en inglés, “Protein Interactions by Structural Matching”) permite una predicción rápida y precisa de las interacciones proteína-proteína. El algoritmo combina la similitud

estructural y explica la conservación evolutiva en las interfaces de los modelos diseñados. Los modelos predichos se almacenan en su base de datos. Dadas dos estructuras de proteínas, PRISM proporciona un modelo estructural, si se encuentra disponible una interfaz de templado coincidente (Baspinar *et al.*, 2014). En este trabajo, las herramientas antes mencionadas se emplearon para establecer un interactoma basado en interacciones físicas binarias, permitiendo predecir el mecanismo molecular de regulación diferencial que emplea MreB sobre factores flagelares en los genotipos ST19 y ST213 de *S. enterica*.

1.10 Dinámica molecular

Para predecir si la interacción entre dos moléculas puede llevarse a cabo con base en su estabilidad de unión en términos fisicoquímicos, se ha empleado la simulación por dinámica molecular. Esta herramienta caracteriza el comportamiento dinámico y la función de biomoléculas, incluidas las proteínas, lo que ha resultado útil para elucidar cascadas de señalización celular (Serçinoğlu & Ozbek, 2018). Durante la dinámica molecular, el comportamiento de las moléculas bajo diversas condiciones que se producen en el entorno celular (Mondal *et al.*, 2018). La dinámica molecular es un método eficaz para estudiar los movimientos físicos de átomos y moléculas, dado que permite predecir su interacción durante un período de tiempo fijo, lo que da una idea de la evolución dinámica del sistema. En relación con el método experimental, la simulación por dinámica molecular no solo puede mostrar la variación en la interacción molecular en función de cambios ambientales como el pH, la temperatura y las mutaciones de residuos, sino que también puede mostrar el proceso dinámico de plegamiento incorrecto y agregación de proteínas o péptidos (Do *et al.*, 2018). El resultado principal de una simulación de dinámica molecular es una trayectoria, que normalmente incluye diversas conformaciones de un sistema biomolecular (Serçinoğlu & Ozbek, 2018)

1.11 Coeficientes viriales

Salmonella enterica posee la capacidad para desarrollar resistencia ante situaciones de estrés, por lo que puede responder a condiciones adversas de manera transitoria, a través de las llamadas respuestas de tolerancia al estrés. Las respuestas de tolerancia al estrés incluyen modificaciones estructurales y fisiológicas en la célula y están mediadas por una compleja maquinaria de regulación genética (Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2015). La respuesta de *S.*

enterica ante las diversas condiciones de estrés es relevante ya que interviene en la sobrevivencia y crecimiento de esta, dando paso a una afectación en la virulencia y la resistencia a antibióticos (Altier, 2005; Clements *et al.*, 2001). En el presente estudio, se evaluaron *in silico* las condiciones de estrés que podían afectar las interacciones establecidas, analizando los coeficientes viriales, definidos como un parámetro termodinámico que describe la fuerza de interacción entre una proteína y un disolvente (Qin & Zhou, 2019).

2. JUSTIFICACIÓN

Salmonella enterica es considerado en la actualidad un patógeno de alta prioridad en salud pública a nivel global, debido al aumento en los últimos años en el aislamiento de este microorganismo a partir de alimentos contaminados de origen animal. Es una de las cuatro principales causas de enfermedades diarreicas, gastroenteritis, bacteremias y septicemias. En *S. enterica*, el remplazo de genotipos ha cobrado relevancia en salud pública, debido a la resistencia a condiciones de estrés y una mayor patogenicidad o resistencia a antibióticos por parte de los genotipos emergentes. Particularmente, en México, el genotipo ST213 ha reemplazado al genotipo ancestral ST19 de *S. enterica*, generando un problema epidemiológico mayor

S. enterica es considerada el agente causal de la salmonelosis, con una elevada tasa de infección a nivel mundial. La virulencia del microorganismo está en función de varios factores, entre ellos la motilidad mediada por flagelos, la cual es el principal objeto de estudio en el presente trabajo. Sin embargo, poco se sabe respecto a la regulación de los mismos. Recientemente, se ha analizado la participación de las proteínas del citoesqueleto bacteriano en el proceso de patogénesis en algunos microorganismos, incluyendo *Salmonella enterica*. Se ha demostrado que las proteínas del citoesqueleto MreBCD, participan directamente en la patogénesis de esta bacteria, mediante la regulación de proteínas flagelares. Sin embargo, aún no ha sido elucidado el mecanismo molecular mediante el cual MreB puede regular la función flagelar. En particular, es escaso el conocimiento que se tiene sobre las interacciones de la proteína MreB, a fin de regular las funciones flagelares involucradas en la patogénesis de *Salmonella enterica*.

La finalidad de este trabajo es contribuir a entender la participación de la proteína del citoesqueleto bacteriano MreB en la regulación diferencial de la función flagelar en los genotipos ST19 y ST213 de *Salmonella enterica*.

3. HIPÓTESIS

El análisis *in silico* predice que la proteína MreB participa en la función flagelar, regulando de forma diferencial la actividad de FliCDTZ/FlhCD, mediante la interacción con FliA, en los genotipos ST19 y ST213 de *Salmonella enterica*.

4. OBJETIVOS

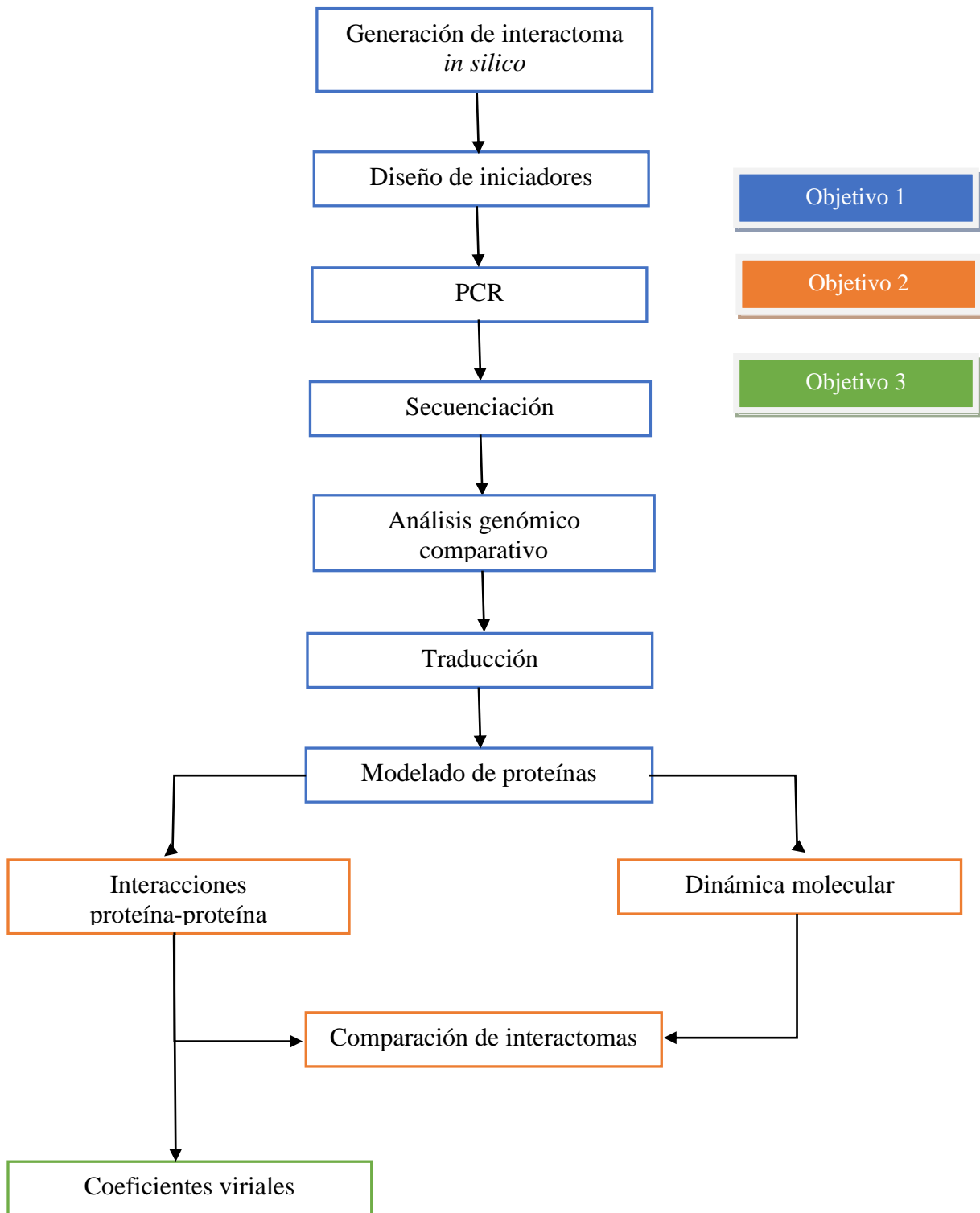
4.1 Objetivo General

Elucidar y comparar mediante un análisis bioinformático la participación de MreB en la función flagelar de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium entre los genotipos ST19 y ST213.

4.2 Objetivos específicos

- 1) Identificar y comparar las variaciones estructurales de las proteínas del citoesqueleto MreBCD y de factores flagelares en dos genotipos de *S. enterica*.
- 2) Determinar y comparar la ruta de regulación de MreBCD sobre los factores flagelares en dos genotipos de *S. enterica*.
- 3) Determinar los efectos por estrés osmótico y baja temperatura en la interacción del complejo MreBCD y FliA de los genotipos ST19 y ST 213 de *S. enterica*.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material Biológico

En este estudio se utilizaron dos cepas de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium (Cuadro 2), pertenecientes a los genotipos ST19 (SAL004) y ST213 (SAL115). Las cepas fueron aisladas de alimentos y preservadas en agar francés al iniciar el presente estudio.

Cuadro 2. Descripción de las cepas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Secuencia tipo	Producto	Municipio	Año
04	19	Queso fresco	Cd. Hidalgo	2009
115	213	Queso asadero	Tanhuato	2009

6.2 Mantenimiento y cultivo de las cepas bacterianas

Se utilizó el medio Luria Bertani (Sambrook y Russell, 2001) para el mantenimiento y resiembra de las cepas, así como para la obtención de colonias para la extracción de ADN genómico.

6.3 Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo mediante el protocolo fenol-cloroformo el cual se describe a continuación. Se colocaron en un tubo de 1.5 mL colonias de un cultivo en agar LB sólido de cada una de las cepas, para suspenderla en 400 µL de buffer de lisis (Tris-HCl 100 mM pH8.0, SDS 2%, NaCl 100 mM, EDTA 50 mM). Se agitó durante 10 min en un vórtex y posteriormente se adicionaron 400 µL de fenol-cloroformo (1:1 v/v) y se homogenizó por 5 min. Se centrifugó a 1500xg por 10 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y estéril donde el ADN se precipitó agregando el mismo volumen de isopropanol frío para después incubarlo durante 10 min a -20°C. Nuevamente se centrifugó a 1500xg por 10 min, se decantó y la pastilla recuperada se lavó con 200 µL de etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente para finalmente resuspender en 20 µL de agua desionizada.

La integridad del ADN obtenido se visualizó mediante electroforesis en geles de

agarosa al 1.5% (p/v) teñido con bromuro de etidio. El ADN se almacenó a -20°C hasta su utilización.

6.4 Diseño de iniciadores para la amplificación de genes flagelares y proteínas MreBCD

Las secuencias de los genes *mreB*, *mreC*, *mreD*, *fliA*, *fliC*, *fliD*, *fliT*, *fliZ*, *flhC* y *flhD* de *Salmonella enterica* se obtuvieron cada una en formato FASTA del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (NCBI por sus siglas en inglés “National Center Biotechnology Information”) (Anexo 1) y se alinearon en el servidor Clustal Omega del Instituto de Bioinformática Europeo (EBI por sus siglas en inglés “European Bioinformatic Institute”). Después del alineamiento se diseñaron los iniciadores tomando las secuencias que flanquean la secuencia de cada gen. Se utilizó el programa Oligo analyzer (http://molbiol-tools.ca/molecular_biology_freeware.htm) para calcular la T_m (por sus siglas en inglés “Temperature melting”) y la calidad de los iniciadores.

6.5 Reacciones de amplificación

Se estandarizaron las condiciones de amplificación de los genes *mreB*, *mreC*, *mreD*, *fliA*, *fliC*, *fliD*, *fliT*, *fliZ*, *flhC* y *flhD* utilizando el ADN de las cepas de *S. enterica* serotipo Typhimurium y los iniciadores diseñados (Cuadro 3).

Cuadro 3. Iniciadores utilizados en los ensayos de PCR

Gen	Tamaño del amplicón (pb)	Iniciadores diseñados (dirección 5'→3')
MreB	1044	MreBF: GCACATGTTGAAAAAATTCGTGG MreBR: TATCTACTCTTCGCTGAACAGGT
MreC	1053	MreCF: GCCG ATGAAGCCAATTTTATAGCCG MreCR: ATATTACCCTCCCGGCGCACG
MreD	492	MreDF: TATATGGTGGCGAGCTATCGTAG MreDR: GCGCTTATTGCACAGCAAAGTCTGCT
FliA	720	FliAF: TACATGGATAAACACTCGCTGTG FliAR: CGTCTATAACTTACCCAGTTTGG
FliB/ FliC	1518	FliCF1 DEG: ATAATGGCACAAAGTCATTAAYAC Y: C/T FliCF2 DEG: ATATCYATYCAGGMTGAAAT FliCR DEG: ATATMCTSTCTYTRCTGCGTTAA
FliD	14040	FliDF2 DEG : ATCCGCCAGYATCGTTAARGT FliDR: GCTATCAGGACTTGTTTCATAGC
FliT	369	FliTF: TATATGACCTCAACCGTGGAGTT FliTR DEG: ATATTATGARGCGCCAGRYGCRT
FliZ	552	FliZF: TATATGACGGTGCAGCAACCTAA FliZR: GCGCTTAATATATATCAGAACTGG
FlhC	585	FlhCF: TAGTATGGCATCTGAAAGTATCCT FlhCR: ATAGTTAAACAGCCTGTTCGATCT
FlhD	351	FlhDF: AGAT ATGGGAACAATGCATACATC FlhDR: TTATCATGCCCTTTTCTTACGCG

Claves: M: A/C; S: G/C; Y: C/T; R: A/G

Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un volumen final de 25 µL, conteniendo una solución reguladora (Tris-HCl 20 mM, pH 8.4; KCl 50 mM), MgCl₂ 1.5 mM, dNTP's 0.2 mM, 4 mM de cada iniciador, 10 ng de ADN y 5 U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen®, USA).

El programa de amplificación utilizado fue: desnaturalización inicial a 95°C/2 min;

30 ciclos con desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento a 60°C por 30 seg para los genes *mreC*, *mreD*, *fliA*, *fliT*, *fliZ*, *flhC* y *flhD* y a 55°C por 30 seg para los genes *mreB*, *fliC* y *fliD*, con una extensión a 72°C por 1.30 min y una extensión final a 72°C por 10 min en un termociclador Corbett®.

Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8% teñidos con bromuro de etidio y la captura fotográfica en un fotodocumentador CHEMI-DOC Molecular viewer (BIO-RAD®, USA).

6.6 Secuenciación

Los amplicones obtenidos en los ensayos de PCR se enviaron para su secuenciación por método Sanger a la empresa Elim Biopharmaceutical, Inc. (USA).

6.7 Análisis genómico comparativo de las secuencias

Las secuencias que exhibieron variaciones se sometieron a un BLAST (por sus siglas en inglés “Basic Local Alignment Search Tool”) con la herramienta del NCBI (Zhang *et al.*, 2000) para conocer el porcentaje de identidad con otros genes. Se utilizó el servidor SyntTax (Oberto *et al.*, 2013) para conocer la estructura y localización de los genes codificantes para las proteínas seleccionadas, comparándolos en 100 genomas de *S. Typhimurium* incluyendo las cepas ST19 y ST213, así como en 100 genomas de serotipos diferentes de *Salmonella enterica*.

6.8 Modelado por homología

Se realizó la traducción *in silico* de las secuencias obtenidas utilizando el servidor ExPASy-transalte tool (<https://web.expasy.org/translate>). A partir de las secuencias de aminoácidos obtenidas, se generaron los modelos tridimensionales por homología, de las proteínas MreBCD, FliACDTZ y FlhCD, empleando el servidor Swiss-Model (Waterhouse *et al.*, 2018), tomando en cuenta los siguientes parámetros: un mínimo de 25% en cobertura de la secuencia por el templado y en la identidad de alineamiento, un valor no menor a -4.0 del evaluador geométrico de la calidad (QMEAN por sus siglas en inglés “Quality Mean”) y un valor igual o mayor a 0.8 en el estimador de la calidad global del modelo (GMQE por sus siglas en inglés “Global Model Quality Estimation”). Los modelos obtenidos fueron

validados mediante gráficos de Ramachandran en el servidor RAMPAGE y refinados por simulación de dinámica molecular, mediante el servidor Galaxy (Ko *et al.*, 2012).

6.9 Dinámica molecular

La simulación por dinámica molecular se llevó a cabo entre las proteínas MreB-FliA y el complejo proteico de MreBCD-FliA (para la construcción del complejo, primero se realizó la interacción entre MreC y MreD y posteriormente, la interacción entre MreCD y MreB en ambos genotipos. La simulación por dinámica molecular se realizó durante 100 picosegundos (ps) de la interacción entre MreB-FliA y MreBCD-FliA en ambos genotipos de *S. Typhimurium* en el software de uso libre Gromacs (Abraham *et al.*, 2015). El sistema se llevó a 300 K y presión de 1 bar en donde se evaluaron dichas interacciones en relación de temperatura, presión y minimización de energía.

6.10 Predicción de interacciones proteína-proteína

Los modelos generados por homología se emplearon para predecir las interacciones proteína-proteína mediante complementariedad geométrica determinada por alineamientos estructurales y conservación evolutiva de “hot spots”, usando el servidor Prim 2.0 (Baspinar *et al.*, 2014). Los residuos de contacto de cada interfaz establecida, fueron también determinados empleando el mismo servidor.

6.11 Evaluación de los segundos coeficientes viriales

Las interacciones que se llevaron a cabo entre las proteínas MreB-FliA y el complejo proteico MreBCD-FliA se evaluaron *in silico*, simulando condiciones de estrés al variar la presión osmótica y la temperatura durante su unión, en el servidor FMAP (Qin & Zhou, 2019). La presión osmótica se varió en función de las siguientes concentraciones molares: 0.150 M, 0.171 M, 0.200 M, 0.250 M, 0.300 M, 0.400 M, 0.500 M y 0.685 M. Mientras que las variaciones de temperatura empleadas fueron las siguientes: 0°C, 4°C, 8°C, 16°C, 25°C, 30°C y 37°C.

7. RESULTADOS

7.1 Establecimiento de un interactoma preliminar

Después de elegir las proteínas del citoesqueleto y los elementos flagelares a evaluar, se diseñó un interactoma de manera preliminar empleando la base de datos String 11.0. Como resultado, String arrojó la predicción de interacciones entre los elementos del citoesqueleto MreBCD y los elementos flagelares FliACDTZ/FlhCD, a través de la posible interacción entre MreB y FliA (Fig. 4).

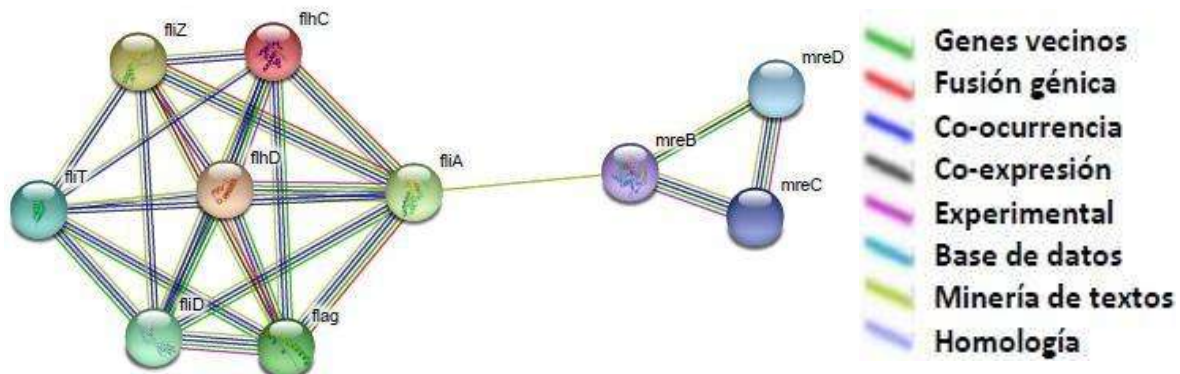


Figura 4. Interactoma de las proteínas del citoesqueleto MreBCD y los factores flagelares en *Salmonella enterica*. La predicción indica las probables interacciones proteína-proteína de MreBCD con determinados factores flagelares, a través de la interacción MreB-FliA.

7.2 Amplificación de los genes que codifican para las proteínas seleccionadas.

Se logró amplificar la totalidad de los genes seleccionados en este trabajo en la cepa de *S. enterica* serotipo Typhimurium genotipos ST19 y ST213 (Fig. 5). El peso molecular coincidió con el esperado, no mostrándose diferencia aparente, en el peso molecular de los amplicones, entre los genotipos analizados.

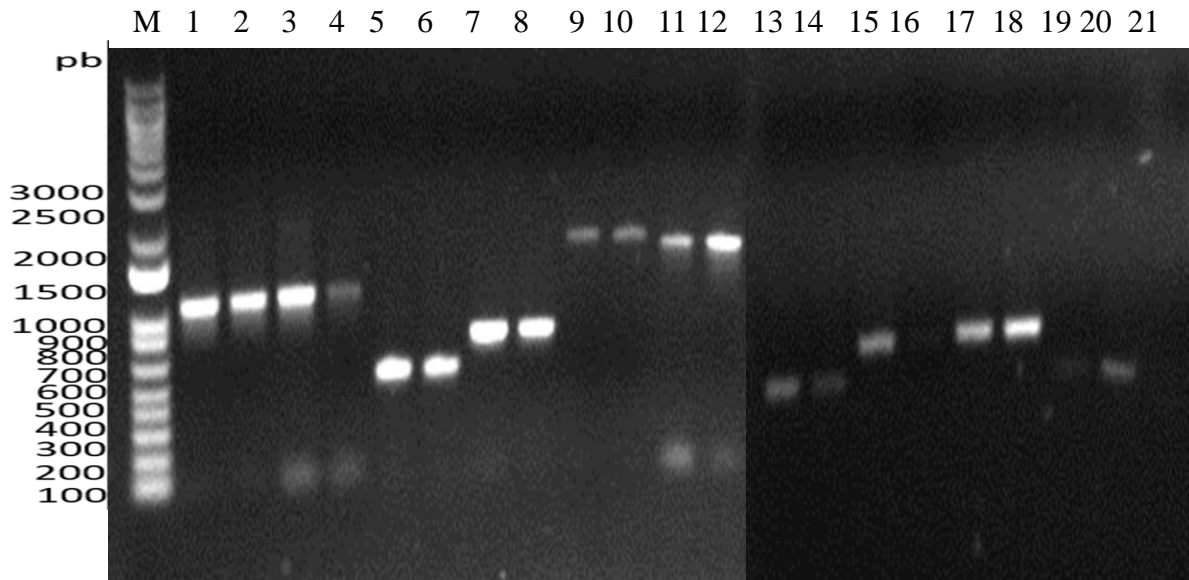


Figura 5. Productos de PCR de los genes seleccionados en este estudio. Gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio que muestra: Carril M, marcador de peso molecular ; carriles 1- 21, amplicones de los genes *mreB* (carril 1), *mreC* (carril 3), *mreD* (carril 5), *fliA* (carril 7), *fliC* (carril 9), *fliD* (carril 11), *fliT* (carril 13), *fliZ* (carril 15), *flhC* (carril 17), *flhD* (carril 19) en el genotipo ST19 y *mreB* 2, *mreC* (carril 4), *mreD* (carril 6), *fliA* (carril 8), *fliC* (carril 10), *fliD* (carril 12), *fliT* (carril 14), *fliZ* (carril 16), *flhC* (carril 18), *flhD* (carril 20) en el genotipo ST213 y control negativo (carril 21).

7.3 Variaciones intergenotípicas en las proteínas seleccionadas de *Salmonella enterica*

Las secuencias de aminoácidos obtenidas *in silico* a partir de las secuencias nucleotídicas resultantes de la secuenciación, fueron alineadas. Los alineamientos de las secuencias de las proteínas MreB, MreC, MreD, FliD, FliT, FliZ, FlhC y FlhD entre ambos genotipos no presentaron cambios de residuos, mientras que para las proteínas FliA y FliC se exhibieron diversos cambios de aminoácidos, así como inserciones y deleciones (Fig.6), en mayor medida en FliC.

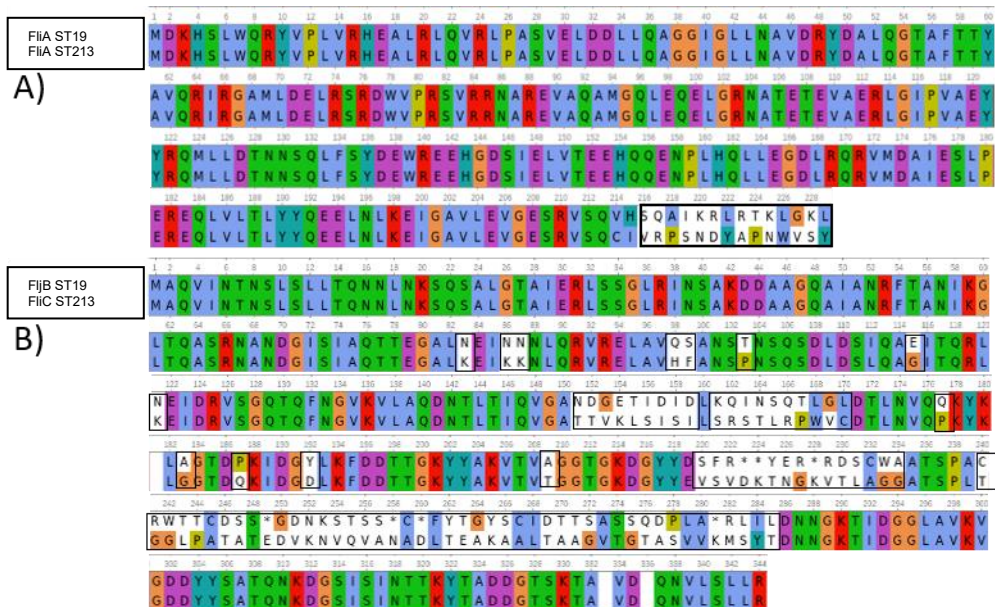


Figura 6. Variaciones aminoacídicas en proteínas flagelares y del citoesqueleto, en los genotipos ST19 y ST213 de *Salmonella enterica*. Alineamientos de las secuencias aminoacídicas de las proteínas FliA (A), FljB/FliC (B). Los recuadros en color negro indican la posición donde existen variaciones.

Dada la diferencia en el alineamiento de secuencias aminoacídicas de FliC en ambos genotipos, se realizó un análisis empleando el algoritmo BLAST, que indicó que la secuencia obtenida en el genotipo ST19 presentó mayor identidad a la proteína FljB que a FliC (Fig. 7). La comparación estructural mediante superposición de modelos generados para las proteínas FliA y FliC en ambos genotipos, se muestra en la figura 8.

Descripción	Nombre científico	Puntaje max	Puntaje total	Cobertura	E- Value	Identidad	Longitud	Núm.Acceso
phase 2 flagellin [Salmonella enterica]	Salmonella ente...	992	992	100%	0.0	99.80%	506	AAR10484.1

Figura 7. Resultados del análisis tipo BLAST para la proteína FljB en el genotipo ST19 de *S. enterica*. El BLAST de la secuencia obtenida para el genotipo ST19, mostró una identidad del 99.80% con la proteína FljB.

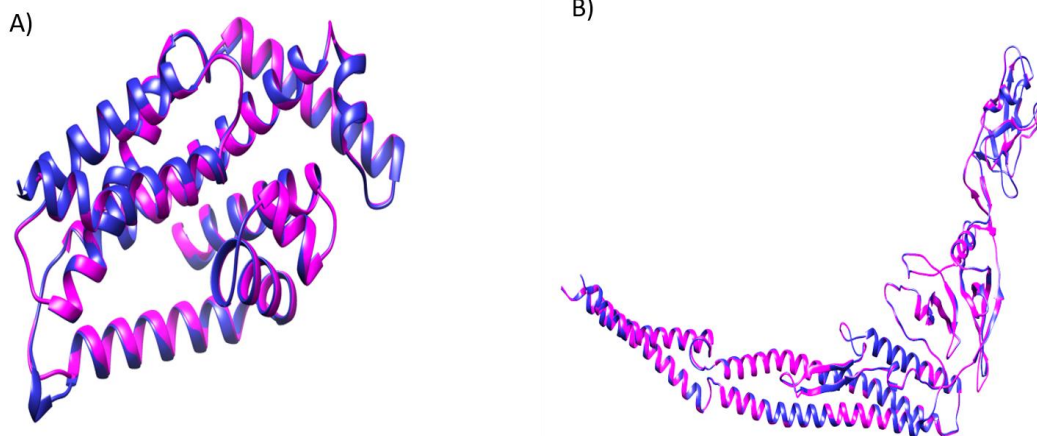


Figura 8. Comparación estructural de las proteínas FliA y FljB/FliC en los genotipos ST19 y ST213 de *S. Typhimurium*. Se muestra la superposición de los modelos generados para la proteína FliA (A) en los genotipos ST19 (en color azul) y ST213 (en color magenta). Asimismo, se indica la superposición de los modelos para FljB del genotipo ST19 (en color azul) y de FliC del genotipo ST213 (en color magenta) de *S. Typhimurium*.

7.4 Validación de los modelos generados por homología de las proteínas seleccionadas

Los modelos establecidos mediante homología para cada genotipo, fueron validados inicialmente mediante superposición con sus respectivos plantados (Fig. 9), encontrando un correcto acoplamiento en todos ellos.

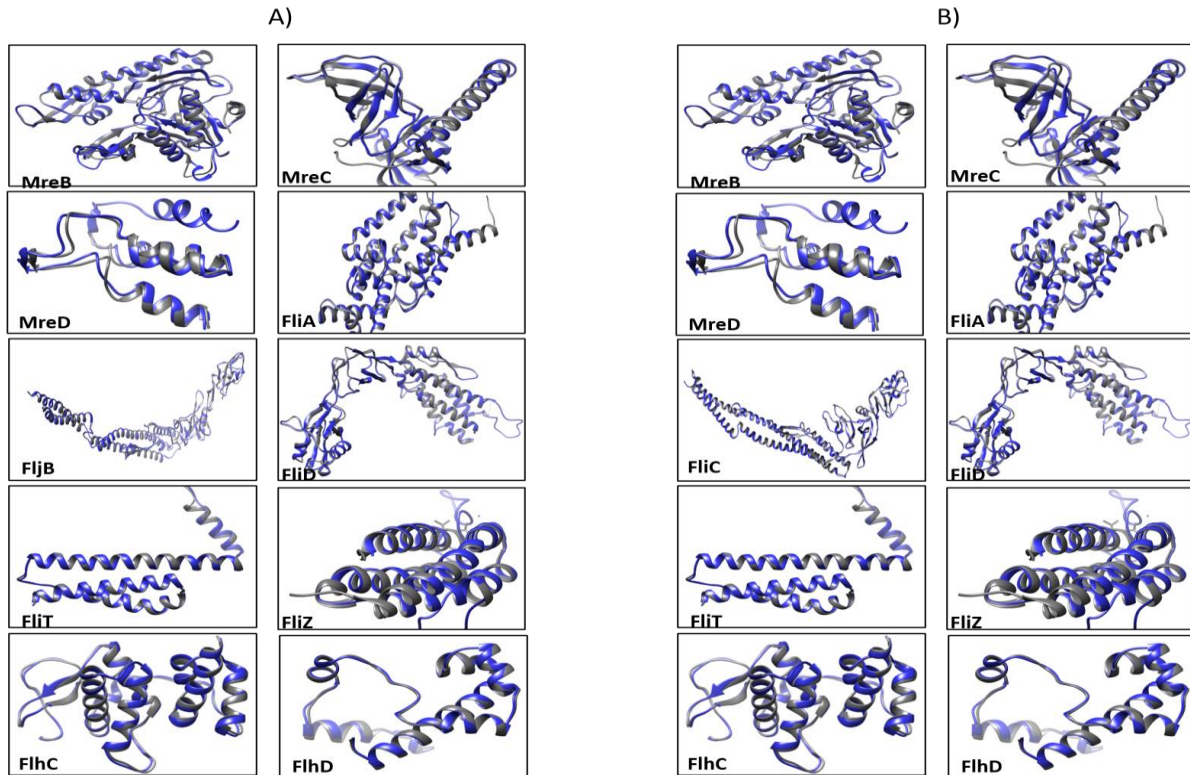


Figura 9. Modelos tridimensionales de las proteínas del citoesqueleto MreBCD y de los flagelares seleccionados en los genotipos ST19 y ST213. Se muestran los modelos tridimensionales generados tanto para el genotipo ST19 (A), como para el ST213 (B). El modelo realizado a partir de las secuencias obtenidas (en color azul) se encuentra superpuesto sobre su respectivo templado (en color gris).

Asimismo, una segunda validación de los modelos generados, mostró que los mismos presentaron entre 95.8 y 100% de residuos localizados en la región favorecida de gráficos de Ramachandran (Cuadro 4), posterior al refinamiento realizado.

Cuadro 4. Porcentaje de Ramachandran de los modelos antes y después de refinar.

	Rampage			Rampage	
	% Sin refinar	% Refinado		% Sin refinar	% Refinado
ST19 FlhC	85.7	95.8	ST213 FlhC	85.7	95.8
ST19 FlhD	95.8	96	ST213 FlhD	95.8	96
ST19 FliA	94.8	97.6	ST213 FliA	94.8	97.6
ST19 FljB	92.4	97.3	ST213 FliC	92.3	99.4
ST19 FliD	94.7	97.3	ST213 FliD	94.7	97.3
ST19 FliT	98.2	100	ST213 FliT	98.2	100
ST19 FliZ	92.6	96.2	ST213 FliZ	92.6	96.2
ST19 MreB	94.8	97.9	ST213 MreB	94.8	97.9
ST19 MreC	90.3	98.5	ST213 MreC	90.3	98.5
ST19 MreD	84.4	97.8	ST213 MreD	84.4	97.8

7.5 Análisis genómico comparativo del gen *fliC*

La identidad de las secuencias obtenidas de los genes seleccionados se confirmó mediante análisis BLAST. Como ya se mencionó anteriormente, este análisis arrojó la presencia del gen *fliC* en el genotipo ST213 y de *fljB* en el genotipo ST19. Por tanto, se realizó un análisis comparativo de ambos genes en 100 genomas de *S. enterica* pertenecientes al serotipo Typhimurium, así como en 100 genomas de diferentes serotipos. Los resultados mostraron que el gen *fljB* estaba presente en todos los genomas sin alteración en la secuencia reportada. Sin embargo, el gen *fliC* se encontró reportado como pseudogen, únicamente en el genoma del genotipo ST19 (Fig. 10) (Cepa YU15, numero de acceso CP014358.1), en comparación con el resto de los genomas analizados (Anexo 2).

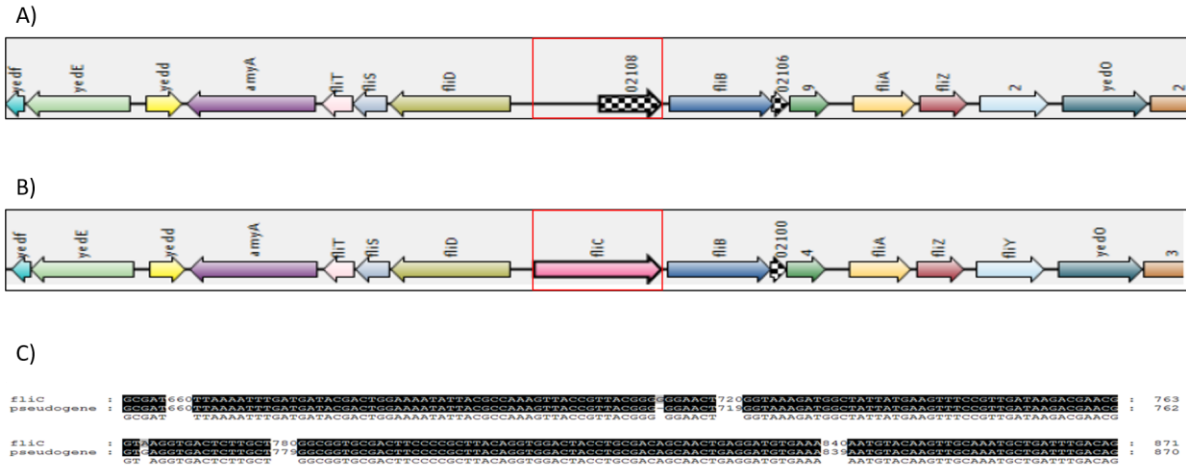


Figura 10. Localización del gen *fliC* en genotipos ST19 y ST213 de *S. enterica* serotipo Typhimurium. En el recuadro rojo se muestra el gen *fliC*, en el genotipo ST19 (A) y ST213 (B). Alineamiento entre *fliC* y el pseudogen *fliC* del genotipo ST19 (C).

7.6 Predicción de interacciones proteína-proteína

Una vez determinadas las diferencias entre genotipos en las secuencias de aminoácidos de las proteínas seleccionadas, se predijeron 48 posibles interacciones entre las mismas. Los valores subrayados en gris en el Cuadro 5, representan la interacción y el genotipo donde se obtuvo menor energía libre o ΔG (kcal/mol).

Cuadro 5. Predicción de interacciones entre las proteínas flagelares de los genotipos ST19 y ST213 de *S. Typhimurium*.

Interacción	ΔG (kcal/mol)			Interacción	ΔG (kcal/mol)		
	ST19	ST213	ST19 ST213		ST19	ST213	ST19 ST213
MreB-MreB			-25.78	MreC-FliZ			-12.38
MreB-MreC			-25.23	MreD-FliZ			0
MreB-MreD			-11.32	MreBCD-FliZ			-30.34
MreC-MreD			-33.91	MreB-FlhC			-12.37
MreB-FliA	-29.52	-27.78		MreC-FlhC			-36.14
MreC-FliA	-52.25	-28.98		MreD-FlhC			0
MreD-FliA	-24.45	-20.09		MreBCD-FlhC			0
MreBCD-FliA	-33.8	-56.21		MreB-FlhD			-27.88
MreB-FljB/FliC	-12.43	-23.61		MreC-FlhD			-37.03
MreC-FljB/FliC	-35.26	-66.44		MreD-FlhD			-64.68
MreD-FljB/FliC	-12.85	-15.2		MreBCD-FlhD			-45.44
MreBCD-FljB/FliC			0	FliA-FliD	-22.41	-7.52	
MreB-FliD			-18.72	FliA-FliT	-70.42	-57.14	
MreC-FliD			-11.56	FliA-FliZ	-12.5	-8.35	
MreD-FliD			-43.63	FliA-FlhC	-40.66	-22.22	
MreBCD-FliD			-16.8	FliA-FlhD	-23.28	-35.01	
MreB-FliT			-34.74	FliC-FliD	-8.37	-30.53	
MreC-FliT			-102.98	FliC-FliT	-47.27	-51.7	
MreD-FliT			-76.29	FliT-FliZ			-22.3
MreBCD-FliT			-48.17	FliZ-FlhD			-13.88
MreB-FliZ			-43.06	FlhC-FlhD			-66.11

En cada interacción se determinó la energía libre o ΔG (kcal/mol). Los controles positivos presentaron una ΔG de -25.78 kcal/mol y -33.91 kcal/mol para las interacciones MreB-MreB y MreC-MreD, respectivamente. El valor de ΔG más bajo lo exhibió la interacción MreC-FliT (-102.98 kcal/mol). MreD no presentó interacciones con FliZ ni con FlhC y el complejo MreBCD no presentó interacción con FljB/FliC ni FlhC. Asimismo, la predicción de interacciones exhibió que MreB, MreC, MreD y el complejo proteico MreBCD presentaron interacción con los elementos flagelares seleccionados (Fig. 11).

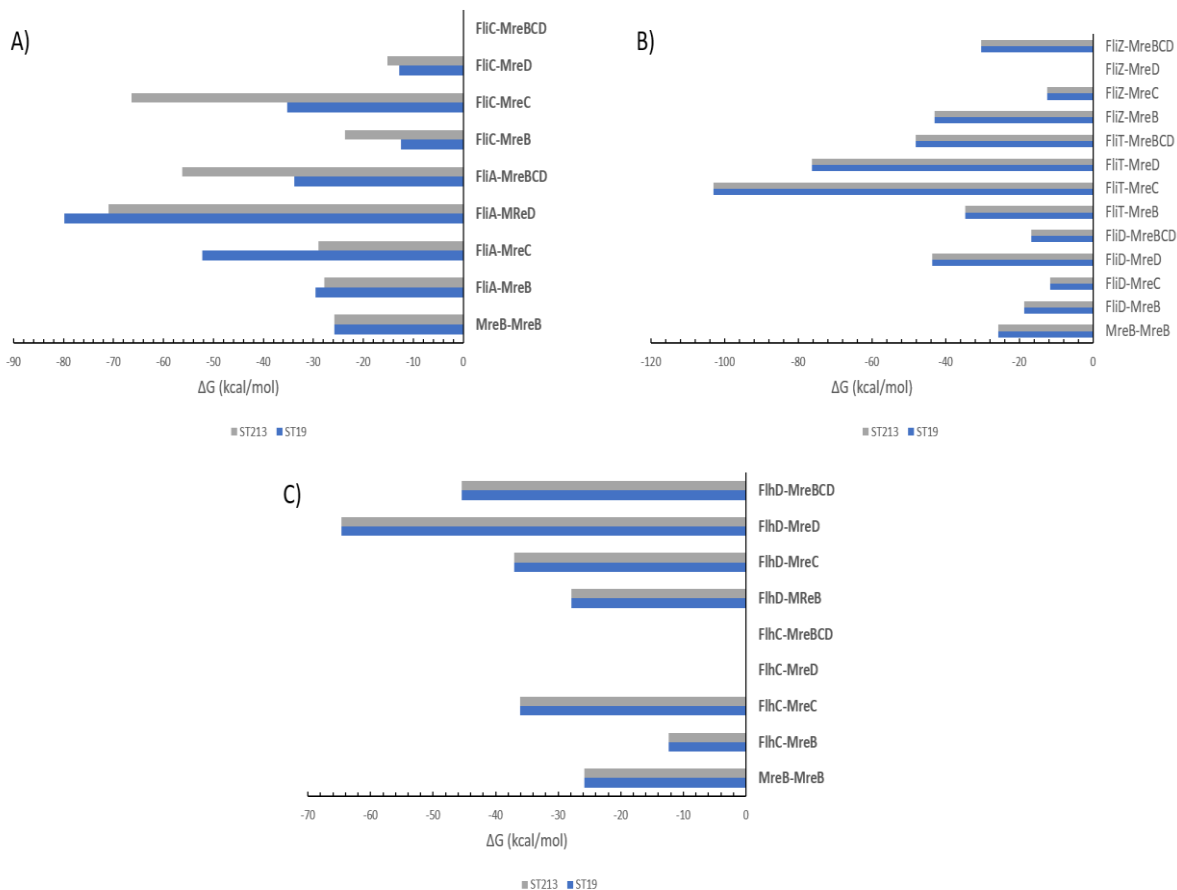


Figura 11. Interacciones de MreB con las proteínas flagelares, en los genotipos ST19 y ST213 de *S. enterica*. Se muestra la ΔG de las interacciones establecidas entre las proteínas del citoesqueleto y las proteínas flagelares, para los genotipos ST19 (azul marino) y ST213 (gris) de *S. enterica*. Se muestran las interacciones entre FliC, FliA (A), FliD, FliT, FliZ (B) y FlhC, FlhD (C) con las proteínas MreB, MreC, MreD y el complejo MreBCD.

7.7 Simulación de dinámica molecular de MreB-FliA y MreBCD-FliA en los genotipos ST19 y ST213 de *Salmonella enterica*

Con la finalidad de evaluar si termodinámicamente era factible la interacción MreB-FliA (Fig. 12) y MreBCD-FliA (Fig. 13), en ambos genotipos de *S. enterica*, se realizaron 4 simulaciones de dinámica molecular. En general, los patrones de temperatura y presión sufrieron menos variaciones en la simulación de la interacción MreB-FliA en el genotipo ST213 mientras que, en la simulación de MreBCD-FliA, los patrones de temperatura y presión variaron menos en el genotipo ST19. De esta manera, para MreB-FliA, la temperatura varió entre 299 y 300 K para el genotipo ST213 y entre 298 y 301.5 K para el genotipo ST19. La presión por su parte manejó valores de -100 a 100 bar en ambos

genotipos, sin embargo, se presentó un mayor número de variaciones de presión por unidad de tiempo en el genotipo ST19, en comparación con el ST213. La energía determinada para ambos genotipos mostró una tendencia a decrecer conforme al tiempo. Respecto a la interacción MreBCD-FliA, se presentó el efecto contrario con relación a MreB-FliA. De este modo, aunque se obtuvo una disminución de la energía de interacción en ambos genotipos, la temperatura varió entre 299 y 300 K para el genotipo ST19 y entre 298 y 301.5 K para el genotipo ST213; mientras que se presentó un mayor número de variaciones de presión por unidad de tiempo en el genotipo ST213.

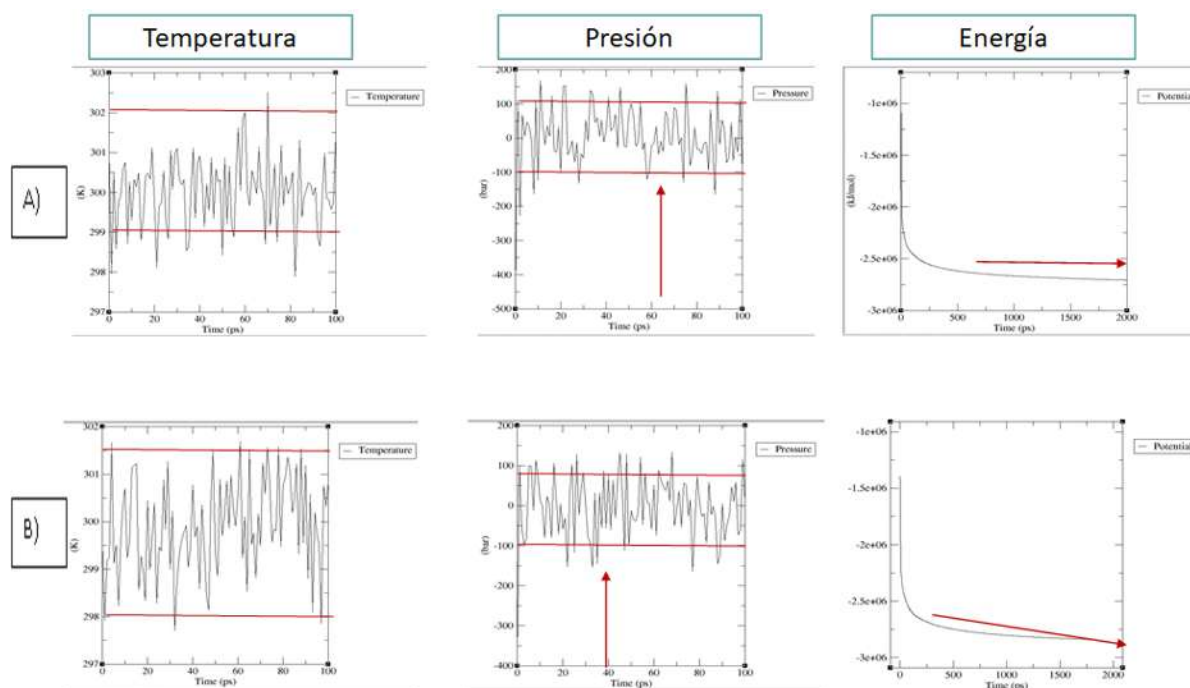


Figura 12. Dinámica Molecular de la interacción MreB-FliA. En el genotipo ST213 (A), se observa el comportamiento de temperatura, presión y energía con respecto a los valores del genotipo ST19 (B). Las flechas en rojo indican los rangos donde se encuentran los valores del sistema y la flecha roja nos indica la estabilización de la energía.

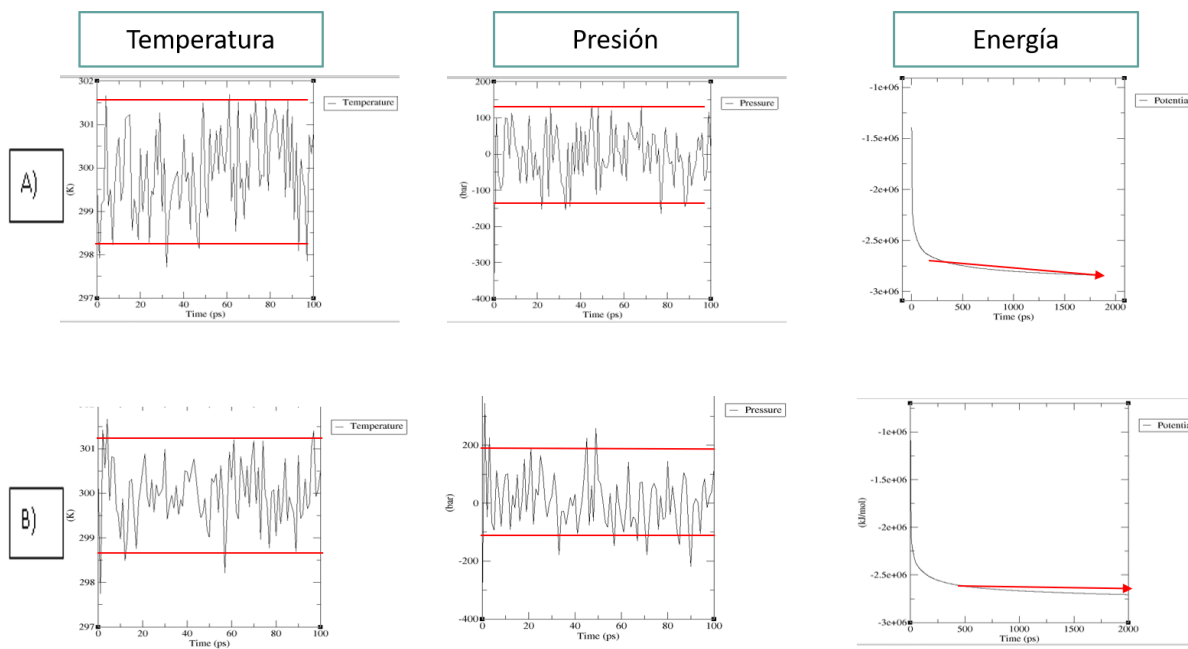


Figura 13. Dinámica Molecular de la interacción MreBCD-FliA. Comportamiento de temperatura, presión y energía para: (A) el genotipo ST213, se observa el comportamiento de con respecto a los valores del genotipo ST19 (B). Las flechas en rojo indican los rangos donde se encuentran los valores del sistema y la flecha roja nos indica la estabilización de la energía.

7.8 Establecimiento de los sitios de contacto en la interacción MreBCD y FliA en *Salmonella Typhimurium*

Por otro lado, los sitios de contacto (Fig. 14) de la interacción entre MreB y FliA variaron entre los genotipos analizados, pese a presentar un valor de ΔG similar, correspondiente a -27.78 kcal/mol en el genotipo ST213 y -29.52 en el genotipo ST19. Sin embargo, según la predicción de dinámica molecular, se encontró una mayor estabilidad en los residuos de contacto establecidos en la interfaz de la interacción MreB-FliA en el genotipo ST213.

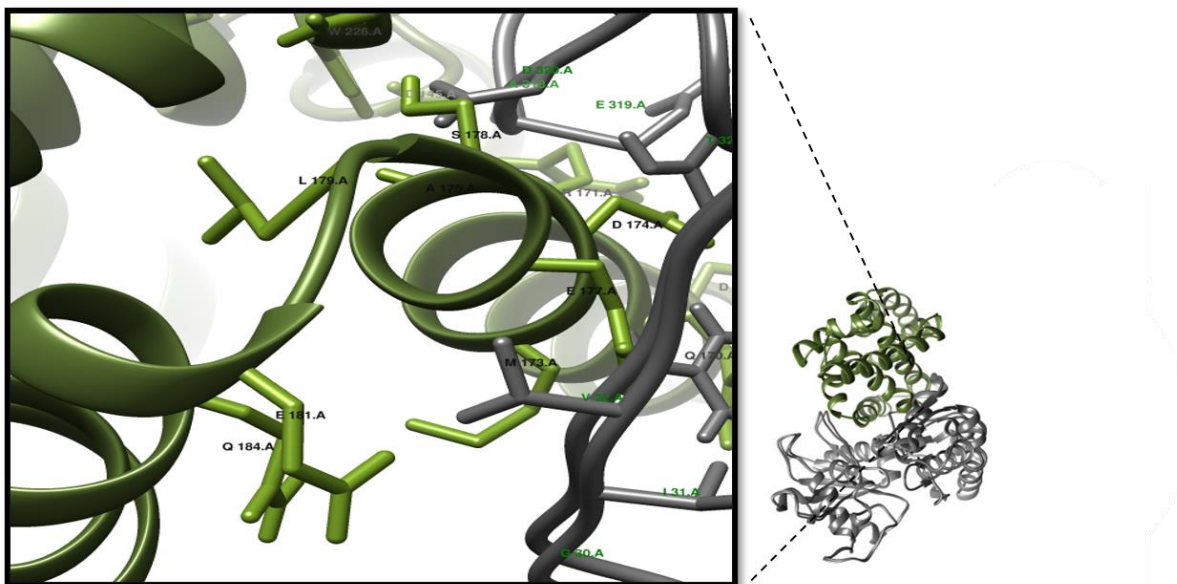


Figura 14. Sitios de contacto de la interacción MreB-FliA en los genotipos ST213 de *S. enterica*. Se muestran los diferentes sitios de contacto entre MreB y FliA en el genotipo ST213. MreB se indica en color gris y FliA en color verde.

Asimismo, se obtuvo una energía libre de -33.8 kcal/mol para la interacción comprendida entre el complejo MreBCD y FliA en el genotipo ST19, mientras que para el genotipo ST213 la energía libre fue de -56.2 kcal/mol. Sin embargo, los sitios de contacto en ambos genotipos fueron similares, aunque no llegaron a compartir residuos en las interfaces establecidas para cada uno de ellos (Fig. 15).

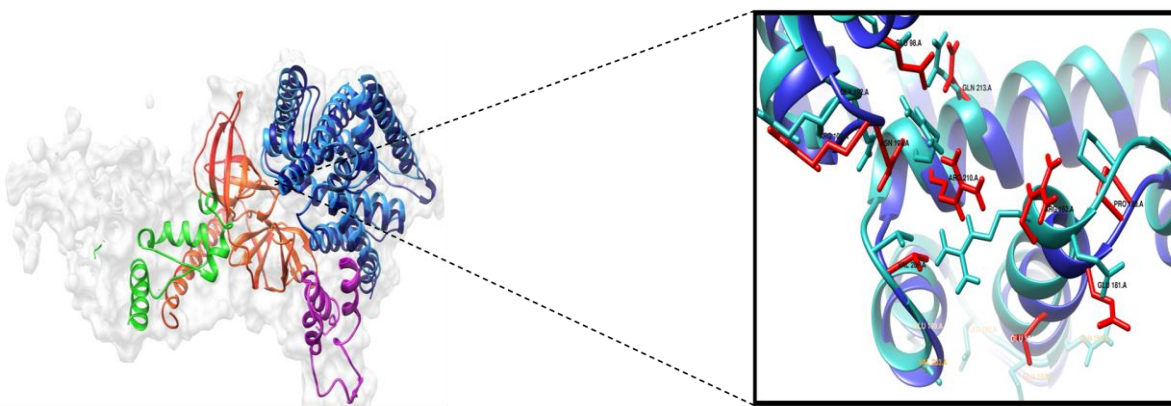


Figura 15. Superposición de los modelos para la interacción de MreBCD con FliA en el genotipo ST19 y ST 213 de *S. enterica*. Se muestra en color verde: proteína MreB del genotipo ST19; verde claro: proteína MreB del genotipo ST213; rojo: proteína MreC en el genotipo ST19; naranja: proteína MreC en el genotipo ST213; magenta intenso: proteína MreD en el genotipo ST19; magenta claro; proteína MreD en el genotipo ST213; azul marino: proteína FliA del genotipo ST19; azul celeste: FliA en el genotipo ST213. Los residuos de contacto de la interfaz se muestran en las ampliaciones.

7.8 Interactoma comparativo de la regulación de MreBCD sobre los elementos flagelares en los genotipos ST19 y ST213 de *Salmonella enterica*

A partir de la predicción de interacciones establecidas, se generó un interactoma comparativo entre los genotipos ST19 y ST213 de *S. enterica* (Fig. 16), en donde se obtuvo la misma cantidad de interacciones, pero diferente energía libre en las mismas, dadas las variaciones aminoacídicas intergenotípicas. Para la construcción del interactoma se tomó en cuenta un valor de energía libre menor a -20 (kcal/mol), además, donde existieron valores diferentes entre genotipos, si esta diferencia era mayor a 20 unidades, representamos la interacción donde hubo menor energía. Adicional a esto, se añadieron las interacciones que previamente habían sido confirmadas de manera experimental, reportadas en la literatura.

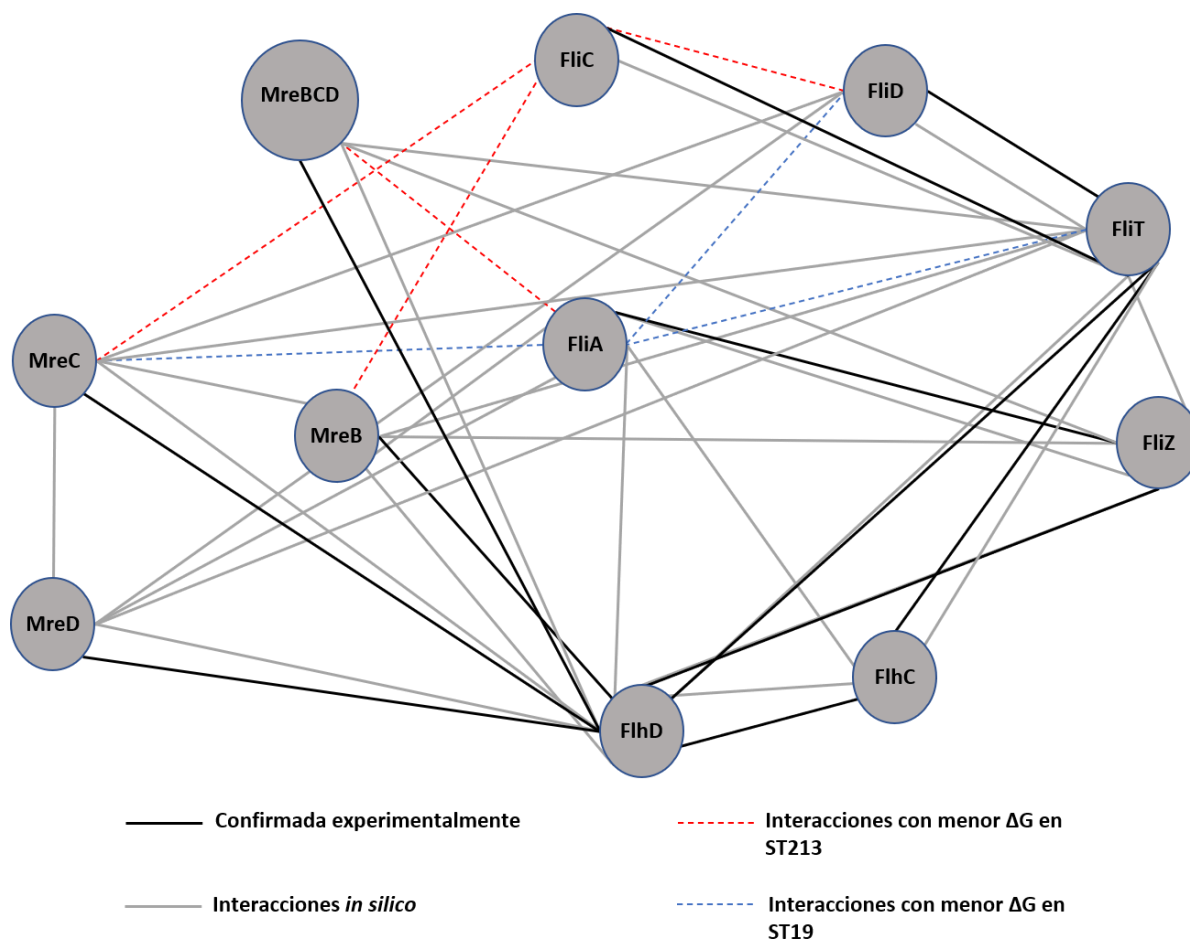


Figura 16. Interactoma de las proteínas del citoesqueleto MreBCD y las proteínas flagelares FliACDTZ/FlhCD en los genotipos ST19 y ST213 de *S. Typhimurium*. El interactoma muestra las diferencias en ΔG obtenida en las interacciones establecidas entre genotipos, además de las interacciones confirmadas de manera experimental reportadas en la literatura.

7.8 Determinación del segundo coeficiente virial para las interacciones entre MreBCD y FliA en los genotipos ST19 y ST213 de *Salmonella Typhimurium*

Partiendo de las interacciones establecidas entre MreB-FliA en el genotipo ST213 y MreBCD-FliA en el genotipo ST19, se evaluó la estabilidad de estas simulando diferentes condiciones ambientales, tales como la temperatura y la osmolaridad. Tomando en cuenta los valores base que ofrece el servidor, se graficaron y compararon los valores del segundo coeficiente virial (B_2), obtenidos para las interacciones MreB-FliA y MreBCD-FliA. La determinación de los valores de B_2 para la interacción MreB-MreB a 25°C (variando las concentraciones) y a 0.150 M (variando temperatura), fue incluida como control positivo. La interacción MreB-FliA en el genotipo ST213 presentó un valor de B_2 más cercano al obtenido en el control positivo a 0.150 M, 0.171 y 0.200 M (Fig. 17). En la interacción que involucra al complejo MreBCD-FliA, para el genotipo ST19, las concentraciones donde el valor de B_2 fue más cercano al control fueron mayores en comparación con el genotipo ST213, siendo éstas 0.400 M, 0.500 M y 0.685 M (Fig. 18).

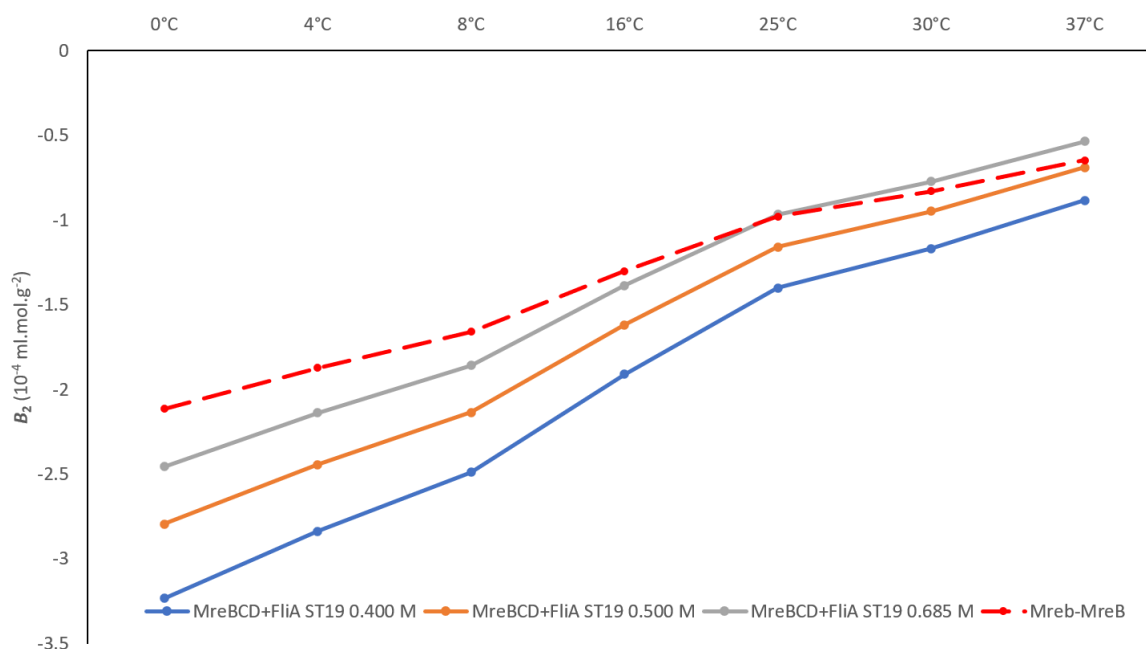


Figura 17. Evaluación de coeficientes viriales en la interacción MreBCD-FliA en los genotipos ST19. La línea roja punteada representa el control positivo para la unión entre MreB-MreB.

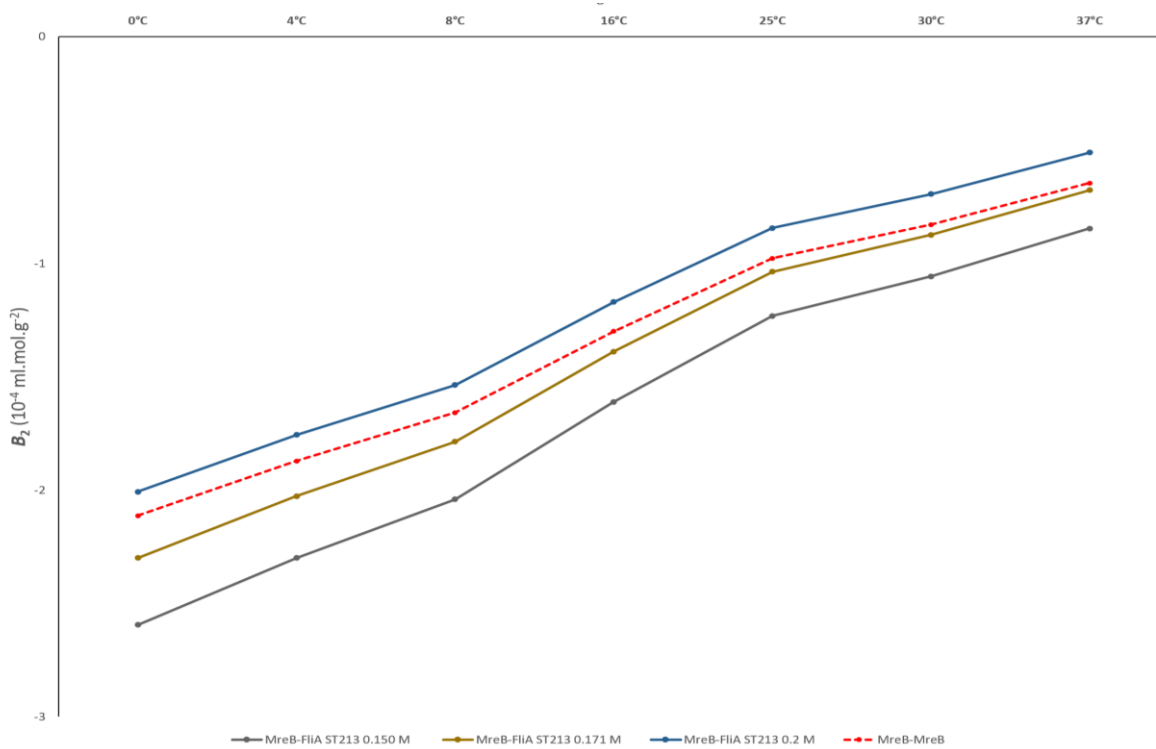


Figura 18. Evaluación de coeficientes viriales en la interacción MreB-FliA en los genotipos y ST213. La línea roja punteada representa el control positivo para la unión entre MreB-MreB.

8. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue elucidar la participación de la proteína MreB del citoesqueleto en la función flagelar de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium, realizando un análisis comparativo entre el genotipo ancestral ST19 y el genotipo emergente ST213. Por tal motivo, en la etapa inicial del trabajo se estableció un interactoma empleando la base de datos String 11.0, en el cual se encontró que los elementos flagelares FliACDTZ/FlhCD podrían interactuar a través de MreB-FliA en la cepa CT18 de *S. enterica*. Así, este trabajo se basó en dicha predicción, aplicándolo a las cepas ambientales Sal 004 y Sal 115 (Gómez-Baltazar *et al.*, 2019), pertenecientes a los genotipos ST19 y ST213, respectivamente, dada la importancia que tiene este último en materia de salud pública al reemplazar al genotipo ancestral (Wiesner *et al.*, 2009).

Los modelos generados fueron evaluados mediante gráficos de Ramachandran (representación cartográfica de una proteína) presentando una buena calidad, con un porcentaje mayor al 90% de aminoácidos en la región favorecida (Hollingsworth & Karplus, 2010). Al comparar las proteínas seleccionadas entre genotipos, las proteínas FliA y FliC exhibieron diferencias que fueron reveladas por el alineamiento de sus secuencias y por la sobreposición de los modelos generados, lo cual contribuyó a las diferencias observadas en las interacciones con el conjunto de proteínas seleccionadas para su análisis en este proyecto, incluyendo MreBCD. En el análisis tipo BLAST de las secuencias obtenidas, se observó que el gen codificante para la flagelina del genotipo ST213 correspondió a *fliC*, mientras que para el genotipo ST19 a *fljB*, gen codificante a la flagelina de segunda fase. Al realizar la búsqueda del gen *fliC* en 100 genotipos y 100 serotipos diferentes de *S. enterica*, se observó que en el genotipo ST19 no estaba reportado como gen funcional. Analizando el genoma de una cepa de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium genotipo ST19, se observó que no reportan al gen *fliC* como pseudogen (Calva *et al.*, 2015).

El hecho de que el genotipo emergente ST213 sea susceptible de expresar dos clases de flagelina, (FliC y FljB) y el genotipo ST19 solamente una (FljB), contribuiría a explicar la diferencia en la motilidad, previamente reportada entre ambos genotipos (Gómez-Baltazar *et al.*, 2019), en donde las cepas del genotipo ST213, mostraron mayor capacidad mótil en comparación con las pertenecientes al genotipo ancestral. Así, la mayor motilidad reportada para el genotipo ST213 podría ser un factor de adaptación asociado al remplazo del genotipo

fundador ST19. En ese sentido, se ha reportado que las bacterias que expresan *fliC*, muestran una ventaja significativa para la invasión de la mayoría de las líneas de células epiteliales de origen murino y humano en comparación con las bacterias que expresan FliB (Yamaguchi *et al.*, 2020).

Las diferencias en la composición de aminoácidos entre las proteínas FliA de los genotipos analizados podrían ser las responsables del cambio observado en la interacción con MreBCD en el genotipo ST19, dado que condujeron a diferencias estructurales tal como se observó en los modelos tridimensionales generados. En las predicciones establecidas, las interacciones MreB-MreB y MreC-MreD se consideraron como control positivo debido a que se ha reportado experimentalmente la homopolimerización de MreB (Colavin *et al.*, 2014; Carballido-López, 2006) y la formación del complejo MreCD (Bulmer *et al.*, 2012). La comparación del interactoma preliminar con las interacciones binarias aquí establecidas, sugirió que MreB es capaz de interactuar con MreCD y con la totalidad de elementos flagelares seleccionados en los genotipos ST19 y ST213 de *S. Typhimurium*. Posterior a esto, se determinaron los valores de ΔG de las interacciones proteína-proteína, destacando que a menor valor de energía libre, esto representa una interacción más estable y con mayor probabilidad de evento de interacción (Shih & Rothfield, 2006). Si bien en la interacción de MreB con FliA no hay una diferencia considerable de ΔG entre los genotipos, las interacciones MreB-Flagelina y MreC-Flagelina presentaron un valor de ΔG cerca de dos veces menor en el genotipo ST213 en comparación con el ST19, además de tener diferentes sitios de contacto, lo que sugiere una regulación diferencial en la motilidad, entre genotipos.

Entre las interacciones que presentaron menor energía libre en comparación con el control positivo, se encontraron las de FliC-FliD y FliC-FliT, que además tuvieron una menor ΔG en el genotipo ST213, en comparación con el genotipo ST19. Este resultado es consistente con la ΔG obtenida en la interacción MreB-FliC en ambos genotipos, lo cual podría significar una mayor estabilidad en el genotipo emergente.

Los valores reportados para todas las simulaciones aquí generadas representan una posible interacción en términos fisicoquímicos de dichas proteínas, tomando en cuenta los valores de referencia de 300 K para la temperatura y 1 bar para la presión (Hasnaim *et al.*, 2020). Sin embargo, las dinámicas establecidas para las interacciones MreB-FliA y MreBCD-FliA, tuvieron comportamientos termodinámicos opuestos en ambos genotipos,

respecto a los parámetros establecidos de temperatura, presión y energía. De este modo, pese a que la interacción MreB-FliA presentó valores similares en ambos genotipos, las interfaces resultaron opuestas en la localización espacial. Además, los resultados de la interacción MreBCD-FliA sugieren que esta favorecida en el genotipo ST213, debido al menor valor de ΔG con respecto al genotipo ST19. Sin embargo, la dinámica mostró una mayor estabilidad de la interacción en el este último. Es importante señalar que en la interacción MreBCD-FliA, MreC presentó interacción directa con FliA, mientras que MreB lo hizo únicamente con MreCD. Con base en estos resultados, es factible sugerir que en el genotipo ST19 la regulación de FliA depende de MreBCD, mientras que en el ST213 depende directamente de MreB. Lo anterior indica que, en el genotipo emergente, la interacción FliA-MreB es capaz de sustituir las funciones del complejo MreBCD- FliA, o bien, de presentar redundancia funcional con este. Esta posible versatilidad molecular-funcional podría reflejarse en la fisiología asociada al remplazo de genotipos, lo que sería susceptible de evaluar experimentalmente.

En el interactoma generado se estableció que las proteínas del citoesqueleto MreBCD interaccionaron con las proteínas FlhCD, tal como fue sugerido en estudios anteriores (Bulmer *et al.*, 2012; Doble *et al.*, 2012), lo que sustenta las predicciones aquí realizadas. Una de las interacciones documentadas previamente es la de FliT y FliD, en la que FliT funge como chaperona de FliD (Katsumi *et al.*, 2010; Aldridge *et al.*, 2010). También, ensayos *in vitro* de interacción proteína-proteína denominados ‘pull-down’, han documentado la interacción FliT-FliC en *S. enterica* (<https://www.ebi.ac.uk/intact/interaction/EBI-15850969>; Imada *et al.*, 2010), evidenciando nuevamente la veracidad de las predicciones hechas en este estudio. Asimismo, se ha reportado que FliZ regula de manera positiva el complejo transcripcional FlhDC, mientras que FliT lo hace de manera negativa (Das *et al.*, 2018; Hung *et al.*, 2012). A su vez, FliZ interacciona con el factor transcripcional FliA, a fin de permitir la activación transcripcional de los genes de clase III, que incluyen a *fliC*, *fliB*, *fliD*, *fliT* (Das *et al.*, 2018). Toda esta evidencia representa un soporte experimental, a los resultados del análisis *in silico* aquí generados, por lo que se puede sugerir con mayor confiabilidad que, el aporte de este estudio radica en el establecimiento de la posible ruta de regulación diferencial intergenotípica en la función flagelar mediada por la interacción de proteína del citoesqueleto MreB con el factor

transcripcional FliA, además de proporcionar nuevas interacciones directas e indirectas entre MreB y proteínas involucradas en la patogénesis, en ambos genotipos de *S. Typhimurium*.

Finalmente, para simular condiciones de estrés a las que es sometida *S. enterica*, tales como la preservación de alimentos con niveles altos de salinidad o baja temperatura (Sharif *et al.*, 2017), se calcularon los segundos coeficientes viriales en la interacción MreB-FliA (genotipo ST213) y MreBCD-FliA (genotipo ST19), a diferentes concentraciones molares. Los valores de B2 de estas interacciones presentaron una mayor estabilidad en el genotipo ST19 al variar la osmolaridad. Sin embargo, dado que en trabajos previos no se evaluó la motilidad en conjunto con la respuesta a estos tipos de estrés en *S. enterica* y que *in silico* no es posible determinarlo, se sugiere la evaluación experimental de estas interacciones en diferentes condiciones de estrés, a fin de determinar si en ellas interfieren los mecanismos de respuesta a estrés osmótico o por temperatura, mediados principalmente por la cinasa RcsC (Doble *et al.*, 2012), en los genotipos evaluados. De esta manera, los resultados de los segundos coeficientes viriales sugieren que, en condiciones de preservación de alimentos como salmueras o refrigeración, estas interacciones se podrían llevar a cabo como sucede con otras proteínas (McMeechan *et al.*, 2007), dados los valores negativos obtenidos (Qin & Zhou, 2019). No obstante, al variar la temperatura se observó que los valores B2 fueron drásticamente bajos, en contraste a la interacción control (MreB-MreB), esto podría significar resultados falsos positivos, tal como se ha reportado, al obtener valores menores a $-8 \times 10^{-4} \text{ml.mol.g}^{-2}$ (Dumetz *et al.*, 2009). Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, la respuesta a estrés de la bacteria no es susceptible de contemplarse en un estudio *in silico*, por lo que se requiere su comprobación experimental.

Resumiendo, la predicción de la regulación flagelar mediante el factor transcripcional FliA, puede estar en función de su interacción con MreB en el genotipo ST213 y por el complejo MreBCD en el genotipo ST19, lo cual implicaría una nueva ruta de regulación entre proteínas. Referente a la motilidad, el genotipo ST213 es capaz de expresar dos clases de flagelinas FliC/FliB mientras que en el ST19 solamente FliC, por lo cual existiría una desventaja en cuanto a motilidad se refiere (Fig. 20).

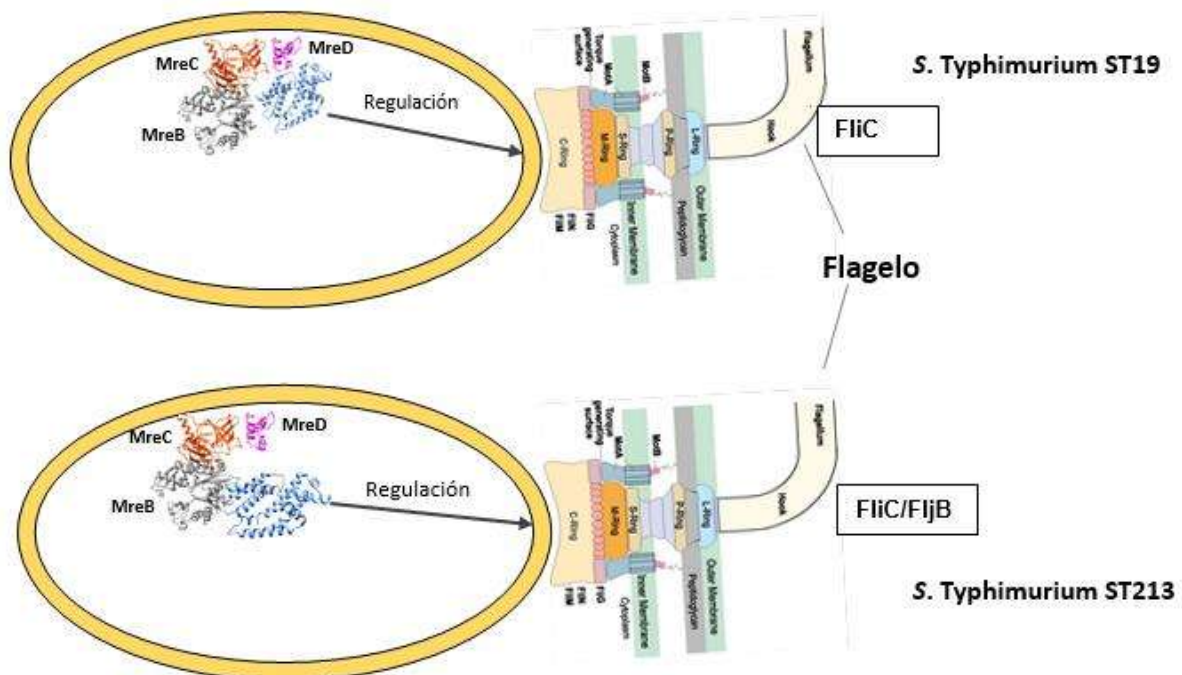


Figura 19. Descripción general de resultados obtenidos. En la parte superior de la imagen, se muestra una representación del genotipo ST19, donde FliA interacciona con el complejo MreBCD, además de expresar una sola clase de flagelina (FliC). En la parte inferior, se representa al genotipo ST213, donde FliA interacciona con la proteína MreB y es capaz de expresar dos clases de flagelinas (FliC y FljB).

9. CONCLUSIONES

Es factible que en el genotipo ST213 la proteína MreB participe en la regulación de factores flagelares, tanto mediante una interacción directa como mediada por el factor de regulación transcripcional FliA, mientras que en el genotipo ST19 la regulación de FliA dependería del complejo MreBCD, a través de la interacción con MreC.

La pseudogenización del gen *fliC* en el genotipo ST19, podría estar asociada a la baja motilidad por nado en comparación con genotipo emergente ST213.

Para determinar el efecto de las condiciones de estrés osmótico y de temperatura, sobre las interacciones en los genotipos St19 y ST213 de *S. enterica*, es necesaria la evaluación experimental.

En general, los resultados obtenidos contribuyen a explicar las bases moleculares del remplazo del genotipo ST19 por el genotipo ST213.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Achtman M., Wain J., Weill F-X., Nair S., Zhou Z., Sangal V., Krauland M. G., Hale J. L., Harbottle H., Uesbeck A., Dougan G., Harrison L. H. & Brisse, S. (2012). Multilocus Sequence Typing as a Replacement for Serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathogens*, 8(6), e1002776. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002776>
- Alfaro-Aco, R. & Petry S. (2015). Building the Microtubule Cytoskeleton Piece by Piece. *Journal of Biological Chemistry*, 290(28), 17154–17162. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.638452>
- Almeida F., Seribelli A. A., da Silva P., Medeiros M. I. C., dos Prazeres Rodrigues D., Moreira C. G., Allard M. W. & Falcão, J. P. (2017). Multilocus sequence typing of *Salmonella Typhimurium* reveals the presence of the highly invasive ST313 in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 51, 41–44. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.03.009>
- Altier C. (2005). Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *Journal of Microbiology*, 43(May), 85–92.
- Alvarez-Ordóñez A., Broussolle V., Colin P., Nguyen-The C. & Prieto M. (2015). The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: Implications for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 213, 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.004>
- Andino A. & Hanning I. (2015). *Salmonella enterica*: Survival, Colonization, and Virulence Differences among Serovars. *The Scientific World Journal*, 2015(Table 3), 1–16. <https://doi.org/10.1155/2015/520179>
- Apel D. & Surette M. G. (2008). Bringing order to a complex molecular machine: The assembly of the bacterial flagella. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(9), 1851–1858. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.005>
- Ashton P. M., Owen S. V., Kaindama L., Rowe W. P. M., Lane C. R., Larkin L., Nair S., Jenkins C., de Pinna E. M., Feasey N. A., Hinton J. C D. & Dallman, T. J. (2017). Public health surveillance in the UK revolutionises our understanding of the invasive *Salmonella Typhimurium* epidemic in Africa. *Genome Medicine*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0480-7>
- Baspinar A., Cukuroglu E., Nussinov R., Keskin O. & Gursoy, A. (2014). PRISM: A web

- server and repository for prediction of protein-protein interactions and modeling their 3D complexes. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), 285–289. <https://doi.org/10.1093/nar/gku397>
- Besser J. M. (2018). Salmonella epidemiology: A whirlwind of change. *Food Microbiology*, 71, 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.018>
- Beutin L., Delannoy S. & Fach, P. (2016). Genetic analysis and detection of fliCH1 and fliCH2 genes coding for serologically closely related flagellar antigens in human and animal pathogenic *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00135>
- Bork P., Sander C. & Valencia A. (1992). An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. 89, 7290–7294.
- Bulmer D. M., Kharraz L., Grant A. J., Dean P., Morgan F. J. E., Karavolos M. H., Doble A. C., McGhie E. J., Koronakis V., Daniel R. A., Mastroeni P. & Anjam Khan, C. M. (2012). The bacterial cytoskeleton modulates motility, type 3 secretion, and colonization in *Salmonella*. *PLoS Pathogens*, 8(1), 13–15. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002500>
- Clements M., Eriksson S., Tezcan-Merdol D., Hinton J. C. D. & Rhen, M. (2001). Virulence gene regulation in *Salmonella enterica*. *Annals of Medicine*, 33(3), 178–185. <https://doi.org/10.3109/07853890109002075>
- Doble A. C., Bulmer D. M., Kharraz L., Karavolos M. H. & Khan C. M. A. (2012). The function of the bacterial cytoskeleton in *Salmonella* pathogenesis. *Virulence*, 3, 446–449. <https://doi.org/10.4161/viru.20993>
- Ent V. Den F., Amos L. A. & Lowe J. (2001). Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature*, 413, 39–44.
- Erickson H. P. (2017). The discovery of the prokaryotic cytoskeleton: 25th anniversary (K. G. Kozminski, Ed.). *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 28, pp. 357–358. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-03-0183>
- Fàbrega A. & Vila J. (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, 26, 308–341. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-12>
- Gauger E. J., Leatham M. P., Mercado-Lubo R., Laux D. C., Conway T. & Cohen P. S.

- (2007). Role of Motility and the *flhDC* Operon in *Escherichia coli* MG1655 Colonization of the Mouse Intestine. *Infection and Immunity*, 75(7), 3315–3324. <https://doi.org/10.1128/IAI.00052-07>
- Gómez-Baltazar A., Vázquez-Garcidueñas M. S., Larsen J., Kuk-Soberanis M. E. & Vázquez-Marrufo G. (2019). Comparative stress response to food preservation conditions of ST19 and ST213 genotypes of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Food Microbiology*, 82, 303–315. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.010>
- Heng Y. & Koh C. (2010). Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(10), 1622–1633. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.04.007>
- Hernandez C. C., Guadalupe A. A. M. & Castro Escarpulli, G. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México Resumen. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 31(4), 137–151.
- Herrmann H. & Aebi U. (2016). Intermediate filaments: Structure and assembly. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018242>
- Jones, L. J. F., & Carballido-lo, R. (2001). Control of Cell Shape in Bacteria: Helical, Actin-like Filaments. *104*, 1–10. Retrieved from [papers3://publication/uuid/037D3D8B-B30C-4B11-9D9E-F0F82B4368C6](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11811811/)
- Kabsch W., Mannherz H. G., Suck D., Pai E. F. & Holmes K. C. (1990). Atomic structure of the actin: DNase I complex. *Nature*, 347(6288), 37–44. <https://doi.org/10.1038/347037a0>
- Kingsley R. A., Msefula C. L., Thomson N. R., Kariuki S., Holt K. E., Gordon M. A., Harris D., Clarke L., Whitehead S., Sangal V., Marsh K., Achtman M., Molyneux M. E., Cormican M., Parkhill J., MacLennan C. A., Heyderman R. S. & Dougan, G. (2009). Epidemic multiple drug resistant *Salmonella* Typhimurium causing invasive disease in sub-Saharan Africa have a distinct genotype. *Genome Research*, 19(12), 2279–2287. <https://doi.org/10.1101/gr.091017.109>
- Knodler L. A., Vallance B. A., Hensel M., Jäckel D., Finlay B. B. & Steele-mortimer O. (2003). *Salmonella* type III effectors PipB and PipB2 are targeted to detergent-

- resistant microdomains on internal host cell membranes. 1–20.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03598.x>
- Hasnain, M., Shoaib, M., Qadri, S., Afzal, B., Anwar, T., Abbas, S. H., Sarwar, A., Talha Malik, H. M., & Tariq Pervez, M. (2020). Computational analysis of functional single nucleotide polymorphisms associated with SLC26A4 gene. *PloS one*, *15*(1), e0225368. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225368>
- Lamas A., Miranda J. M., Regal P., Vázquez B., Franco C. M. & Cepeda A. (2018). A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. *Microbiological Research*, *206*, 60–73. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.010>
- Lavalett L., Sánchez M. M., Muñoz N., Moreno J. & Cardona-Castro N. (2009). Desarrollo y validación de una reacción en cadena de la polimerasa múltiple para la identificación de los serogrupos B, C2, D y E de *Salmonella enterica*. *Biomédica*, *29*(29), 244–52244.
- Lianou A., Nychas G-J. E. & Koutsoumanis K. P. (2017). Variability in the adaptive acid tolerance response phenotype of *Salmonella enterica* strains. *Food Microbiology*, *62*, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.011>
- Löwe J. & Amos L. A. (2009). Evolution of cytomotive filaments: The cytoskeleton from prokaryotes to eukaryotes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *41*(2), 323–329. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.08.010>
- Martins M., McCusker M. P., McCabe E. M., O’Leary D., Duffy G. & Fanning S. (2013). Evidence of Metabolic Switching and Implications for Food Safety from the Phenome(s) of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 Cultured at Selected Points across the Pork Production Food Chain. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(18), 5437–5449. <https://doi.org/10.1128/AEM.01041-13>
- Méresse S., Unsworth K. E., Habermann A., Griffiths G., Fang F., Martínez-Lorenzo M. J., Waterman S. R., Gorvel J-P. & Holden, D. W. (2001). Remodelling of the actin cytoskeleton is essential for replication of intravacuolar *Salmonella*. *Cellular Microbiology*, *3*(8), 567–577. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00141.x>
- Mukherjee A. & Lutkenhaus, J. (1994, May). Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. *Journal of Bacteriology*, *176*, 2754–2758. <https://doi.org/10.1128/jb.176.9.2754-2758.1994>

- Ohl M. E. & Miller S. I. (2001). Salmonella: A Model for Bacterial Pathogenesis. *Annual Review of Medicine*, 52(1), 259–274. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.52.1.259>
- Pegoraro A. F., Janmey P. & Weitz D. A. (2017). Mechanical properties of the cytoskeleton and cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(11), a022038. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022038>
- Rajashekar R., Liebl D., Seitz A. & Hensel M. (2008). Dynamic remodeling of the endosomal system during formation of Salmonella-induced filaments by intracellular salmonella enterica. *Traffic*, 9(12), 2100–2116. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00821.x>
- RayChaudhuri D. & Park, J. T. (1992). Escherichia coli cell-division gene ftsZ encodes a novel GTP-binding protein. *Nature*, 359(6392), 251–254. <https://doi.org/10.1038/359251a0>
- Rottner K., Faix J., Bogdan S., Linder S. & Kerkhoff, E. (2017). Actin assembly mechanisms at a glance. *Journal of Cell Science*, 130(20), 3427–3435. <https://doi.org/10.1242/jcs.206433>
- Shih Y-L. & Rothfield, L. (2006). The Bacterial Cytoskeleton. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(3), 729–754. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00017-06>
- Sundquist M., Rydström A. & Wick, M. J. (2004). Immunity to Salmonella from a dendritic point of view. *Cellular Microbiology*, 6(1), 1–11. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00336.x>
- Tauxe R. V, Doyle M. P., Kuchenmüller T., Schlundt J. & Stein, C. E. (2010). Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology*, 139(SUPPL. 1), S16–S28. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.014>
- Wang H., Xie L., Luo H. & Xie J. (2016). Bacterial cytoskeleton and implications for new antibiotic targets. *Journal of Drug Targeting*, 24(5), 392–398. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2015.1095195>
- White A. P., Gibson D. L., Collinson S. K., Banser P. A. & Kay W. W. (2003). Extracellular polysaccharides associated with thin aggregative fimbriae of Salmonella enterica serovar enteritidis. *Journal of Bacteriology*, 185(18), 5398–5407. <https://doi.org/10.1128/jb.185.18.5398-5407.2003>

- Wickstead B. & Gull, K. (2011). The evolution of the cytoskeleton. *The Journal of Cell Biology*, 194(4), 513–525. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102065>
- Wiesner M., Calva E., Fernández-Mora M., Cevallos M. A., Campos F., Zaidi M. B. & Silva C. (2011). Salmonella Typhimurium ST213 is associated with two types of IncA/C plasmids carrying multiple resistance determinants. *BMC Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-9>
- Wiesner M., Zaidi M. B., Calva E., Fernández-Mora M., Calva J. J. & Silva C. (2009). Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican salmonella enterica serovar typhimurium strains. *BMC Microbiology*, 9, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-131>
- Wong M. H. Y., Yan M., Chan E. W. C., Liu L. Z., Kan B. & Chen S. (2013). Expansion of salmonella enterica serovar typhimurium ST34 clone carrying multiple resistance determinants in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(9), 4599–4601. <https://doi.org/10.1128/AAC.01174-13>
- Yap K. P., Gan H. M., Teh C. S. J., Chai L. C. & Thong K. L. (2014). Comparative genomics of closely related serovar Typhi strains reveals genome dynamics and the acquisition of novel pathogenic elements. *BMC Genomics*, 15(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1007>

11. ANEXOS

Anexo 1. Genomas utilizados para diseño de oligos

Gen	Número de acceso (NCBI)
<i>flhC</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. NZ_MLRE01000007.1 2. NZ_MLTE01000012.1 3. NZ_MLTL01000008.1 4. NZ_MLWA01000011.1 5. BCPN01000118.1 6. BCPM01000094.1 7. CP040699.1 8. BCOY01000061.1 9. QUUI01000001.1 10. BCOJ01000142.1 11. BCOM01000052.1 12. BCPI01000062.1 13. CP007222.1 14. BCOI01000301.1 15. BCOW01000088.1 16. BCOB01000095.1 17. BCPH01000050.1 18. BCOC01000081.1 19. BCOH01000053.1 20. BCOU01000050.1
<i>flhD</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. VAKG01000001.1 2. VAKE01000001.1 3. VAKH01000001.1 4. VAKD01000001.1 5. VAKC01000001.1 6. VAKB01000001.1 7. VAJY01000001.1 8. VAJZ01000001.1 9. VAKA01000001.1

	10. VAJU01000001.1 11. VAJX01000001.1 12. VAJV01000001.1 13. VAJT01000001.1 14. VAJP01000001.1 15. VAJO01000001.1 16. VAJR01000001.1 17. VAJS01000001.1 18. VAJN01000001.1 19. VAJQ01000001.1 20. QVPQ01000001.1
<i>fliA</i>	1. CP006053.1 2. CP006631.1 3. CP014996.1 4. CP000857.1 5. CP007433.2 6. CP012349.1 7. CP007639.1 8. CP012346.1 9. CP007534.1 10. CP014665.1 11. AE014613.1 12. AL513382.1 13. CP007523.1 14. CP019649.1 15. CP012091.1 16. CP006053.1 17. CP006631.1 18. CP014996.1 19. CP000857.1 20. CP007433.2
<i>fliCfljB</i>	1. NZ_CP038609.1 2. NZ_CP038605.1 3. NZ_CP038602.1

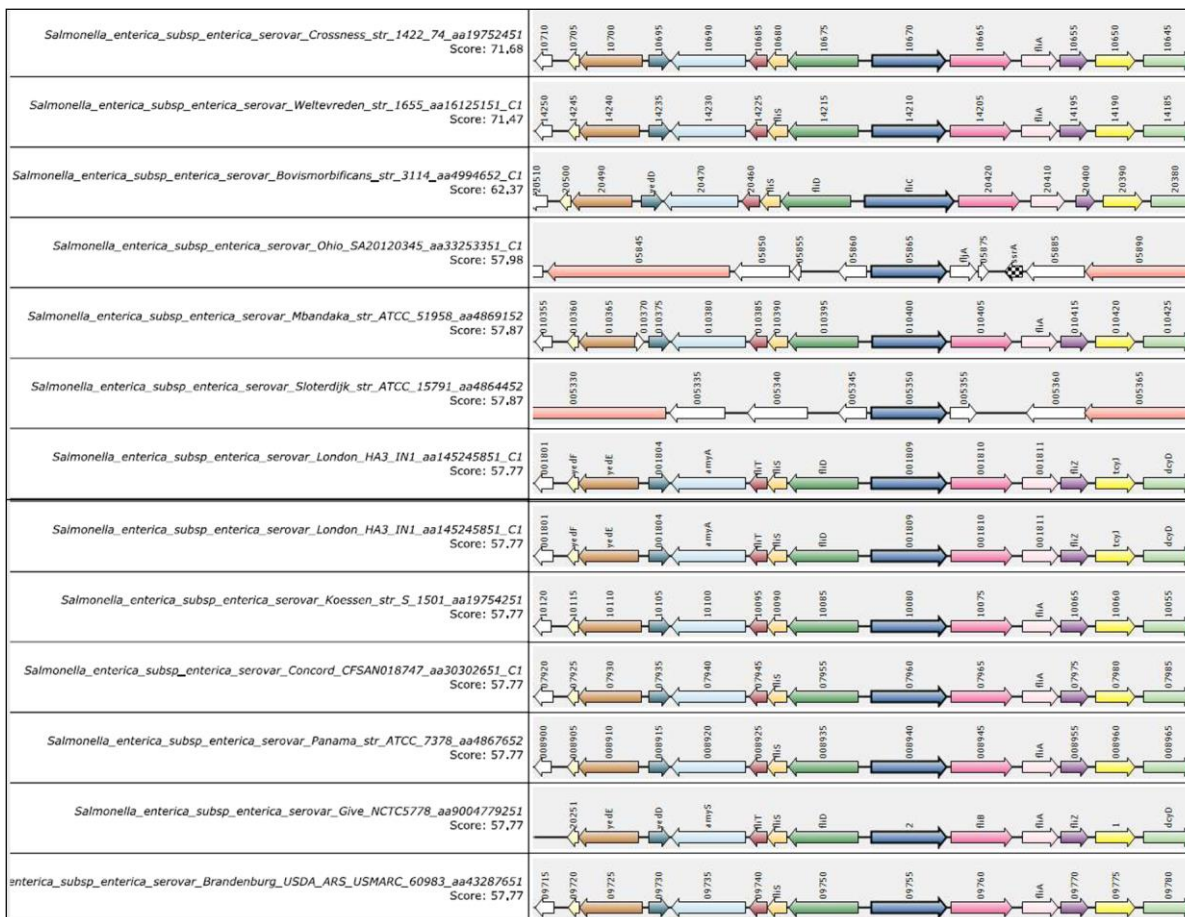
	<ol style="list-style-type: none"> 4. NC_003198.1 5. NC_003197.2 6. MF948286.1 7. KF589316.1 8. AY353542.1 9. AY353539.1 10. AY353538.1 11. AY353549.1 12. AY353548.1 13. U06226.1 14. U06198.1 15. U06206.1 16. U06204.1 17. U06197.1 18. AY353535.1 19. AY353537.1 20. U06205.1
<i>fliD</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. VCPU01000125.1 2. CP039509.1 3. VCSK01000338.1 4. VCQH01000218.1 5. VCQF01000075.1 6. VCQD01000184.1 7. VCQE01000174.1 8. VCQC01000096.1 9. VCIU01000078.1 10. NC_003198.1 11. VCIM01000070.1 12. VDBY01000067.1 13. VDBX01000219.1 14. VCQK01000030.1 15. VCQB01000086.1 16. VCPZ01000148.1 17. VCQA01000131.1

	18. VCIV01000127.1 19. VCIQ01000118.1 20. VCIP01000030.1
<i>fliT</i>	1. CP000026.1 2. CP007523.1 3. BCOZ01000112.1 4. BCPD01000074.1 5. BCOR01000057.1 6. BCOG01000064.1 7. BCPB01000083.1 8. BCOX01000099.1 9. BCOP01000039.1 10. BCOE01000054.1 11. BCOK01000014.1 12. BCPG01000063.1 13. CP006631.1 14. CP040699.1 15. BCOI01000301.1 16. BCOW01000088.1 17. BCOB01000095.1 18. BCPH01000050.1 19. BCOC01000081.1 20. BCOH01000053.1
<i>fliZ</i>	1. AB010947.1 2. NC_003198.1 3. CP007523.1 4. CP019649.1 5. CP001363.1 6. NC_003197.2 7. NZ_CP017617.1 8. CP064709.1 9. LR881463.1 10. NZ_CP013702.1 11. NZ_CP017621.1

	12. CP035547.1 13. CP032494.1 14. CP032490.1
<i>mreB</i>	1. BCPN01000166.1 2. BCPM01000073.1 3. LS483428.1 4. LS483478.1 5. UGWP01000004.1 6. UGYB01000001.1 7. LS483456.1 8. UGWQ01000001.1 9. LS483495.1 10. UGYF01000001.1 11. LS483477.1 12. UGWI01000001.1 13. UGXI01000001.1 14. LS483474.1 15. LS483475.1 16. UGWN01000001.1 17. UGWF01000003.1 18. UGWZ01000001.1 19. UGXA01000001.1 20. BCPK01000089.1
<i>mreC</i>	1. BCPN01000166.1 2. BCPM01000073.1 3. CP003278.1 4. CP000026.1 5. CP007523.1 6. BCOQ01000373.1 7. BCOV01000094.1 8. BCOT01000061.1 9. BCPE01000119.1 10. BCOO01000069.1 11. BCNZ01000117.1

	<ul style="list-style-type: none"> 12. BCPC01000061 13. BCOS01000015.1 14. BCOF01000076.1 15. BCPJ01000087.1 16. BCOA01000088.1 17. BCPA01000093.1 18. BCPL01000078.1 19. CP040699.1 20. CP032490.1
<i>mreD</i>	<ul style="list-style-type: none"> 1. BCOY01000089.1 2. CP028357.1 3. BCOQ01000373.1 4. BCOV01000094.1 5. BCOT01000061.1 6. BCPE01000119.1 7. BCOO01000069.1 8. BCNZ01000117.1 9. BCPC01000061.1 10. BCOS01000015.1 11. BCOF01000076.1 12. BCPJ01000087.1 13. BCOA01000088.1 14. BCPA01000093.1 15. BCPL01000078.1 16. CP007222.1 17. CP040380.1 18. CP037891.1 19. CP003278.1 20. CP007523.1

Anexo 2. Análisis genómico comparativo del gen *fliC*







<p><i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Waycross</i>_RSE24_aa39947351_C1 Score: 33,03</p>
<p><i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Muenchen</i>_LG26_aa96503951_C1 Score: 31,49</p>
<p><i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Tennessee</i>_str_TXSC_TXSC08_19_aa4864052 Score: 20,35</p>
<p><i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Cubana</i>_str_CFSAN002050_aa4301251_C1 Score: 20,35</p>
<p><i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Nitra</i>_S_1687_aa19756051 Score: 19,84</p>
<p><i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar California</i>_CD_SL01_aa52224651 Score: 19,63</p>
<p><i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Havana</i>_NCTC6086_aa9006358551 Score: 19,63</p>
<p><i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Berta</i>_SA20141895_aa33248751_C1 Score: 19,63</p>
<p><i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Rissen</i>_GJ0703_2_aa110579551_C1 Score: 19,63</p>
<p><i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Senftenberg</i>_str_CFSAN004025_aa47987851_C1 Score: 19,63</p>
<p><i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Oranienburg</i>_str_0250_CFSAN001285_aa4868152 Score: 19,63</p>
<p><i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Borreze</i>_str_SA20041063_aa19753451 Score: 19,53</p>
<p><i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Agona</i>_USDA_ARS_USMARC_76341_aa61652651 Score: 19,53</p>
<p><i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Pullorum</i>_str_S06004_aa4444451 Score: 19,53</p>
<p><i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis</i>_str_SA20123395_aa6259952 Score: 19,53</p>
<p><i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Blegdam</i>_str_S_1824_aa19752651 Score: 19,53</p>
<p><i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Moscow</i>_str_S_1843_aa19755551 Score: 19,53</p>
<p><i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Hillingdon</i>_str_N1529_D3_aa19753851 Score: 19,53</p>
<p><i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin</i>_CVM_22429_aa35898651_C1 Score: 19,53</p>
<p><i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Menston</i>_NCTC7836_aa9004783451 Score: 16,05</p>
<p><i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Derby</i>_Sa64_aa39318151_C1 Score: 11,66</p>

