



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Adaptación de la regulación del gen ancestral *fdng* de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mediada por HiD

**T E S I S P R O F E S I O N A L
P O R E T A P A S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

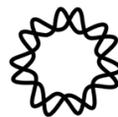
JELSY GALILEA ARELLANO HERNÁNDEZ

DIRECTOR

M.C. MARCOS ANTONIO VALDESPINO DÍAZ
Instituto de Biotecnología, UNAM

CUERNAVACA, MORELOS

SEPTIEMBRE, 2022



Instituto de
Biotecnología

El presente trabajo corresponde a los proyectos de investigación del Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, a cargo del Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán, bajo la dirección del M. C. Marcos Antonio Valdespino Díaz.

El jurado de tesis estuvo integrado por:

| | |
|------------|--|
| Presidente | Dra. María Luisa Castrejón Godínez |
| Secretario | Dra. Verónica Obregón Barboza |
| Vocal | Dra. María Luisa Barroso García |
| Vocal | Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán |
| Vocal | M.C. Marcos Antonio Valdespino Díaz |

Este estudio fue financiado con el donativo CONACYT - Problemas Nacionales no. 2017-01-5182.

Dedico este trabajo a la persona que más admiro en la vida, a quien siempre me ha enseñado a mantenerme firme ante la adversidad, a quien desde pequeña me ha enseñado a luchar para alcanzar cada sueño e ilusión, a quien siempre me ha brindado su amor y apoyo incondicional, a quien siempre ha sido luz en mis momentos de oscuridad...

*Con todo el amor del mundo
A mi madre, Jelsy A. Hernández
Mi triunfo es tuyo; ¡Gracias por todo!*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Jelsy y Styve, por ser los autores principales del humano en que me he convertido, sin su amor, esfuerzo, dedicación y sacrificiós no hubiera llegado a donde ahora estoy, no hay palabras que puedan expresar todo el agradecimiento que siento.

A mis hermanas, Denis y Camila, por todo el cariño que me han dado y por todos los momentos felices que hemos compartido, siempre estaré orgullosa de haber crecido a su lado.

A mi tía Elizabeth, quien considero mi segunda madre, la persona que después de mis padres más se ha preocupado por mi, gracias por creer siempre en mi, sin el entusiasmo, inspiración y soporte que me has dado, nada hubiera sido posible.

A mis abuelos de padre y madre, agradezco el amor en sus consejos y apoyo absoluto, gracias por siempre encaminarme por el buen sendero, jamás lo hubiera logrado sin ustedes.

A Nataly D. Juárez, quien me apoyó y alentó para continuar cuando parecía que me iba a rendir, gracias por compartir con tanta ilusión este trabajo.

A mi director de tesis, el M. C. Marcos Antonio Valdespino, sin ti, tu paciencia y constancia nada de este trabajo hubiera sido posible, gracias por estar allí cuando mis horas de trabajo se hacían confusas, gracias por ser mi mentor durante estos años, he sido muy afortunada.

Al Dr. Víctor Bustamante, por darme la oportunidad de realizar este trabajo y brindarme todas las herramientas necesarias para realizar este proyecto, sin su apoyo y confianza mi estancia en el labaratorio no hubiera sido la misma.

A los miembros de mi jurado, la Dra. María Luisa Castrejón, La Dra. Verónica Obregón y a la Dra. María Luisa Barroso, por sus comentarios y criticas hacia mi trabajo, todas sus sugerencias fueron consideradas.

A todos mis compañeros de laboratorio, por brindarme su amistad y brindarme su apoyo desde que llegué al laboratorio.

A la Sra. Rebeca y Mariana, por su invaluable labor en el laboratorio, su ayuda fue especial para realizar este proyecto.

A todos mis amigos y compañeros de la Facultad de Biología por los buenos momentos que compartimos, gracias por hacer la licenciatura más divertida. En especial, unas cariñosas palabras a los que me han demostrado su apoyo y me han brindado sus ánimos y consejos durante la realización de este trabajo.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS | 9 |
| RESUMEN | 10 |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 11 |
| 1.1. <i>Salmonella</i> y su importancia..... | 11 |
| 1.2. Patogénesis | 13 |
| 1.3. Factores de virulencia de <i>Salmonella</i> | 15 |
| 1.3.1. Flagelo..... | 15 |
| 1.3.2. Adhesinas..... | 16 |
| 1.3.3. Plásmido..... | 17 |
| 1.3.4. Islas de patogenicidad de <i>Salmonella enterica</i> | 18 |
| 1.3.4.1. Isla de Patogenicidad de <i>Salmonella</i> 1 (SPI-1) | 21 |
| 1.3.4.2. Regulación de SPI-1 | 23 |
| 1.3.4.3. Regulador HilD | 25 |
| 1.4. Respiración por nitrato..... | 26 |
| II. ANTECEDENTES | 28 |
| III. JUSTIFICACIÓN | 30 |
| IV. HIPÓTESIS | 30 |
| V. OBJETIVOS | 30 |
| 5.1. Objetivo general | 30 |
| 5.2. Objetivos específicos | 31 |
| VI. MATERIALES Y MÉTODOS | 32 |
| 6.1. Purificación de plásmidos por Miniprep | 34 |
| 6.2. Preparación de células electrocompetentes | 34 |
| 6.3. Electroporación | 35 |
| 6.4. Construcción de fusiones transcripcionales al gen reportero <i>cat</i> | 35 |
| 6.5. Cultivos bacterianos para la cuantificación de la expresión de genes..... | 36 |
| 6.6. Cuantificación de la actividad enzimática de CAT (Cloranfenicol Acetil Transferasa) | 37 |
| 6.7. Ensayos de retardo en gel de DNA (EMSA's, <u>E</u> lectro <u>p</u> horetic <u>M</u> obility | |

| | |
|--|----|
| <u>Shift Assays</u>) | 38 |
| 6.8. Análisis estadístico | 39 |
| VII. RESULTADOS | 40 |
| 7.1. Contexto genómico de <i>fdnG</i> en <i>S. ser. Typhimurium</i> SL1344 y <i>E. coli</i> K-12 . | 40 |
| 7.2. La expresión del gen <i>fdnG</i> de <i>S. ser. Typhimurium</i> SL1344, pero no del gen <i>fdnG</i> de <i>E. coli</i> K-12, se regula por Hild en LB | 42 |
| 7.3. La expresión de los genes <i>fdnG</i> de <i>S. ser. Typhimurium</i> SL1344 y <i>E. coli</i> K-12 son regulados de forma diferente por el represor H-NS. | 47 |
| VIII. DISCUSIÓN | 49 |
| IX. CONCLUSIONES | 53 |
| X. PERSPECTIVAS..... | 54 |
| XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 55 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Progreso de la infección causada por <i>Salmonella enterica</i> | 14 |
| Figura 2. Diferenciación de <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella</i> serovar Typhimurium. | 20 |
| Figura 3. Representación esquemática de los genes codificados en la isla de patogenicidad 1 de <i>Salmonella</i> (SPI-1) y sus funciones putativas | 22 |
| Figura 4. Modelo de activación de SPI-1 | 24 |
| Figura 5. Contexto genómico de <i>fdnG</i> en <i>S. ser. Typhimurium</i> SL1344 y <i>E. coli</i> K-12 | 41 |
| Figura 6. Construcción de la fusión transcripcional de <i>fdnG</i> de <i>E. coli</i> al gen reportero <i>cat</i> | 44 |
| Figura 7. El gen <i>fdnG</i> de <i>S. ser. Typhimurium</i> , pero no el gen <i>fdnG</i> de <i>E. coli</i> K-12, se expresa y regula por HilD en condiciones inductoras de SPI-1..... | 46 |
| Figura 8. H-NS reprime la expresión de <i>fdnG</i> _{STm} , pero no de <i>fdnG</i> _{Ec} , en LB | 48 |
| Figura 9. Representación de la adaptación reguladora de <i>fdnG</i> por HilD en <i>S. ser. Typhimurium</i> | 49 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio | 32 |
| Tabla 2. Plásmidos utilizados en este estudio | 32 |
| Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este estudio | 33 |
| Tabla 4. Antibióticos utilizados en este estudio..... | 34 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------|---|
| CAT | Cloranfenicol acetil transferasa |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| g | Gramo |
| LB | Lysogenic Broth |
| M | Molar |
| mL | Mililitro |
| °C | Grados centígrados |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| pH | Potencial de hidrogeno |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| s | Segundo |
| SCV | Vacuolas contenedoras de <i>Salmonella</i> |
| SPI | Islas de patogenicidad de <i>Salmonella</i> |
| SST3 | Sistema de secreción tipo III |
| WT | Cepa silvestre |
| μL | Microlitro |

RESUMEN

Durante su evolución, las bacterias del género *Salmonella* han adquirido gran parte de sus genes de virulencia a través de transferencia horizontal de DNA, los cuales se encuentran mayormente agrupados en las islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI). La adquisición de estos genes ha contribuido a la divergencia evolutiva entre *Salmonella* y *Escherichia coli* a partir de un ancestro común hace aproximadamente 100 millones de años. En SPI-1 se codifica el regulador transcripcional adquirido HilD, el cual induce la expresión de los genes de SPI-1 y de otros genes que se encuentran en otras regiones del cromosoma de *Salmonella*, incluyendo algunos genes ancestrales (también presentes en *E. coli* y otras bacterias) como *fdnG*. En este estudio mostramos que la adaptación de la regulación transcripcional de *fdnG* por HilD en *S. ser. Typhimurium* involucró la ganancia de este regulador transcripcional, así como cambios *cis*-regulatorios en la región reguladora de *fdnG*. Nuestros resultados muestran que el gen *fdnG* de *S. ser. Typhimurium*, pero no el gen *fdnG* de *E. coli*, se expresa y regula por HilD en condiciones inductoras de SPI-1. Además, encontramos que en el gen *fdnG* de *S. ser. Typhimurium* también se adaptó la regulación por el represor H-NS y que HilD antagoniza la represión de H-NS para inducir la expresión de *fdnG*. Interesantemente, nuestros resultados indican que además de actuar como un factor anti-H-NS, HilD pudiera estar induciendo la expresión de *fdnG* mediante un mecanismo independiente de H-NS. En general, nuestro estudio evidencia la regulación diferencial de genes ortólogos entre bacterias cercanas evolutivamente, a través de la regulación mediada por un regulador adquirido por transferencia horizontal; y muestra la importancia que ha tenido la evolución *cis*-reguladora en la expansión del regulón de HilD.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. *Salmonella* y su importancia

El género *Salmonella*, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, comprende bacterias Gram-negativas entre las cuales se encuentran algunas bacterias patógenas que infectan tanto a animales como a humanos (dos Santos et al., 2019; Fàbrega y Vila, 2013). Las bacterias que pertenecen a este género tienen forma de bastón, son anaerobias facultativas y presentan una motilidad peritrica. *Salmonella* se divide en dos especies: *Salmonella bongori*, la cual es aislada principalmente de anfibios, reptiles y peces, es decir, de vertebrados de sangre fría, raramente asociada con infecciones humanas; y *Salmonella enterica* que es la principal causa de enfermedad en animales y humanos (Brenner et al., 2000; Fookes et al., 2011).

Salmonella enterica se divide a su vez en seis subespecies, las cuales son: (I) *S. enterica* subsp. *enterica*, (II) *S. enterica* subsp. *salamae*, (IIIa) *S. enterica* subsp. *arizonae*, (IIIb) *S. enterica* subsp. *diarizonae*, (IV) *S. enterica* subsp. *houtenae* y (VI) *S. enterica* subsp. *indica*. Sin embargo, la subespecie *enterica*, es la de mayor importancia médica, ya que casi todos los serotipos que causan enfermedades en humanos y animales pertenecen a ésta. Dentro de la subespecie *enterica* se han reportado más de 2,700 serovariantes las cuales son clasificadas según su estructura flagelar (H), somática (O) y capsular (K) (Brenner et al., 2000; Chattaway et al., 2021; Jajere, 2019).

Salmonella enterica subsp. *enterica* es capaz de generar una enfermedad sistémica, clínicamente conocida como fiebre tifoidea o fiebre entérica. Las serovariantes que la provocan son Typhi (*S. ser. Typhi*) y Paratyphi (*S. ser. Paratyphi*), las cuales son patógenos exclusivos

de humanos (Edsall et al., 1960; House et al., 2001). Las manifestaciones clínicas incluyen fiebre, dolor abdominal, diarrea transitoria o estreñimiento y ocasionalmente erupciones maculopapulares. El sello distintivo patológico de la fiebre entérica es la infiltración de células mononucleares y la hipertrofia del sistema reticuloendotelial, incluidos los parches intestinales de Peyer, los ganglios linfáticos mesentéricos, el bazo y la médula ósea. Sin tratamiento, la mortalidad es del 10 al 15% (Ohl y Miller, 2001; Raffatellu et al., 2006).

Las otras serovariantes de la subsp. enterica causan una infección intestinal localizada conocida como enterocolitis o salmonelosis, las serovariantes más importantes que la generan son Typhimurium (*S. ser. Typhimurium*) y Enteritidis (*S. ser. Enteritidis*) (Galanis et al., 2006; Hendriksen et al., 2011; Wagenaar et al., 2013). La enfermedad en humanos generalmente sigue a la ingestión de bacterias en alimentos o agua contaminados, con síntomas que ocurren entre 6 y 72 horas después del consumo. El inicio de los síntomas está marcado por un inicio agudo, calambres, dolor abdominal y diarrea con o sin sangre. Las náuseas y los vómitos también son frecuentes. Comúnmente la enfermedad afecta el íleon y también se puede generar inflamación en el intestino grueso, con infecciones raras en el yeyuno, el duodeno y el estómago; la OMS considera alrededor de 550 millones de casos de salmonelosis cada año, de los cuales aproximadamente 33 millones conllevan a la muerte (Coburn et al., 2007; Fàbrega y Vila, 2013).

Las infecciones por serovariantes no tifoideas se presentan típicamente como una enfermedad diarreica autolimitada. Sin embargo, la infección gastrointestinal por *S. ser. Typhimurium* puede evolucionar a una infección sistémica en pacientes inmunodeprimidos y en ratones de laboratorio modificados genéticamente, diseminándose a otros órganos como el bazo y el

hígado (Acheson y Hohmann, 2001; Fàbrega and Vila, 2013; Gordon, 2008). Esta capacidad de provocar ambos tipos de infecciones dependiendo del hospedero en el que se encuentre, hacen que *S. ser. Typhimurium* se tome como modelo de estudio de los mecanismos de patogenicidad de *S. enterica* (Callaway et al., 2008).

1.2. Patogénesis

La infección de *Salmonella* inicia generalmente después de la ingesta de alimentos o agua contaminada, aunque el contacto con animales domésticos y silvestres como aves de corral, ganado, reptiles y anfibios que pueden ser portadores de la bacteria, también constituye un riesgo de infección en humanos (Bueno et al., 2012; Horton et al., 2013; Jones y Falkow, 1996).

Al llegar al estómago las bacterias deben hacer frente a la acidez del medio, para lo cual activan una respuesta de tolerancia ácida que mantiene el pH intracelular por encima del pH extracelular, permitiendo su sobrevivencia (dos Santos et al., 2019; Fàbrega y Vila, 2013; Foster y Hall, 1991). Posteriormente, al entrar en el intestino delgado, las bacterias deben alcanzar y atravesar la mucosa intestinal antes de encontrarse y adherirse al epitelio latente. En ratones, las bacterias se adhieren y son asimiladas preferentemente a las células M de los parches de Peyer por endocitosis y también pueden ser fagocitadas directamente del lumen intestinal por células dendríticas (Broz et al., 2012; Haraga et al., 2008).

Salmonella también es capaz de invadir las células epiteliales no fagocíticas del intestino mediante un mecanismo que implica un sistema de secreción tipo III (SST3) ubicado en la Isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI-1; *Salmonella Pathogenicity Island*) (Hansen-Wester y

Hensel, 2001; Hueck, 1998). *Salmonella* utiliza este sistema de secreción para invadir activamente las células epiteliales a través de la inyección de proteínas efectoras en el citosol de los enterocitos, lo cual genera un rearrreglo en el citoesqueleto de actina de estos. Esto provoca invaginaciones de la membrana de los enterocitos que permiten que las bacterias sean endocitadas y se ubiquen dentro de las vacuolas contenedoras de *Salmonella* (SCV), en donde pueden sobrevivir y multiplicarse (Fàbrega y Vila, 2013; Haraga et al., 2008; López et al., 2012; Ly y Casanova, 2007). (Fig. 1).

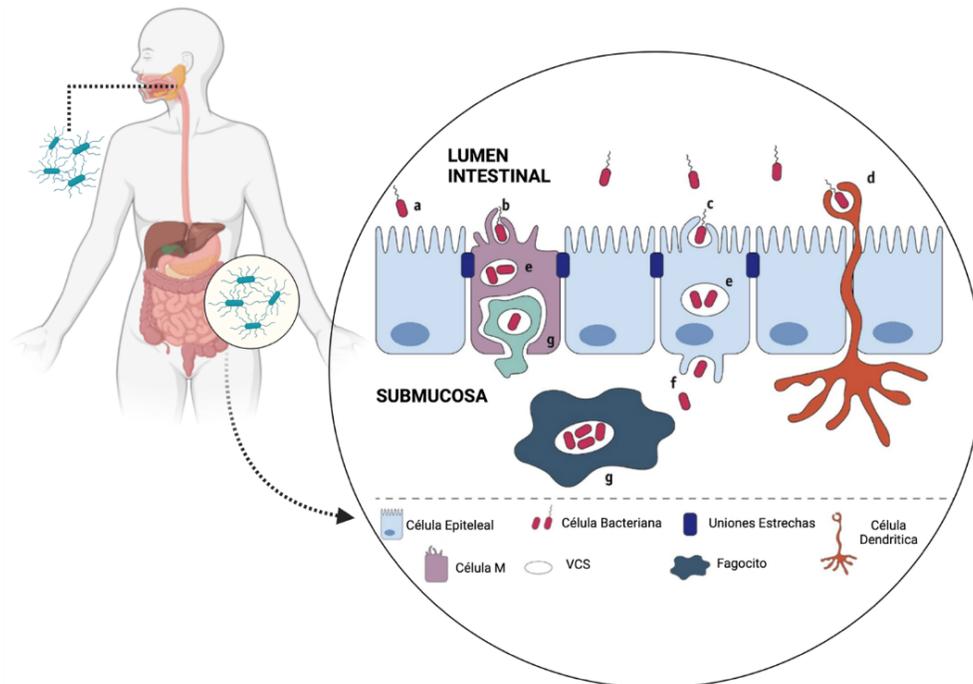


Fig. 1. Progreso de la infección causada por *Salmonella*. Al ser ingerida oralmente, *Salmonella* alcanza el lumen intestinal (a). *Salmonella* se adhiere al epitelio intestinal utilizando muchos de los factores de adherencia presentes en su superficie celular. Las proteínas efectoras se liberan dentro de los enterocitos causando cambios en su citoesqueleto que provocan invaginaciones en la membrana de estos, posibilitando la invasión de las bacterias (b-c). *Salmonella* también puede ser fagocitada directamente del lumen intestinal por células dendríticas con proyecciones que atraviesan el epitelio (d). Una vez dentro de la célula hospedera (enterocitos o fagocitos), *Salmonella* se ubica dentro de las SCV donde se multiplica (e). Después de invadir el epitelio intestinal, las bacterias son liberadas a la submucosa donde pueden ser fagocitadas por fagocitos como los macrófagos y diseminar la infección (g). (Modificado de Dos Santos et al., 2018).

Simultáneamente se induce una respuesta secretora en el epitelio intestinal e inicia el reclutamiento y la trans migración de fagocitos desde la submucosa hacia el lumen intestinal, lo anterior, asociado con la producción de varias citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina-8 (IL-8) que finalmente inducen la respuesta inflamatoria (dos Santos et al., 2019; Santos et al., 2009).

Luego que las SCVs se transportan hacia la cara basal del epitelio, las bacterias son liberadas a la submucosa. En la submucosa, las bacterias pueden ser fagocitadas por células como los macrófagos y *Salmonella* es capaz de formar nuevamente las SCVs y sobrevivir dentro de estas células, con lo cual se puede diseminar a otros órganos, como el hígado y bazo, donde preferentemente se replica causando una infección sistémica (Fàbrega y Vila, 2013; Haraga et al., 2008) (Fig. 1).

1.3. Factores de virulencia de *Salmonella*

Para llevar a cabo el proceso de infección, *Salmonella* posee muchas estrategias para competir con los mecanismos de defensa del huésped. La adquisición de factores de virulencia codificados por genes dentro de islas de patogenicidad se considera la principal fuerza impulsora en la evolución del patógeno gastrointestinal *Salmonella enterica*; mientras que otros factores de virulencia se encuentran en un plásmido (pSLT) o en otras zonas del cromosoma.

1.3.1. Flagelo

Los flagelos son apéndices giratorios y helicoidales largos que se encuentran en la superficie de la célula bacteriana y permiten a la bacteria nadar en medios líquidos y pulularse sobre

superficies sólidas. Los componentes estructurales de los flagelos incluyen principalmente tres elementos: cuerpo basal, gancho y filamento (Li y Verma, 2002; Macnab, 1999). Tras la infección, los flagelos ayudan a la bacteria a llegar al sitio de invasión, las células M, que recubren el intestino delgado (Jones et al., 1992; Saini et al., 2011). Los flagelos también se caracterizan por ser un fuerte inductor de inflamación, principalmente por la inducción de interleucina 8 (IL-8) y la activación de NF- κ B (Coburn et al., 2007; Gewirtz et al., 2001) y una cepa mutante en el sistema flagelar presenta defectos en la invasión a células epiteliales (Stecher et al., 2004).

Los principales reguladores del ensamblaje flagelar incluyen FlhD, FlhC, FliA, FliZ, FlgM, FliD y FliT (Ohnishi et al., 1992; Yanagihara et al., 1999). La expresión de los genes flagelares está bajo control de una jerarquía transcripcional de tres clases de promotores. En la parte superior de la cascada de regulación está el operón *flhDC*, que está bajo el control de un promotor de clase 1 flagelar dependiente del factor transcripcional σ 70. Se requiere un complejo FlhD₄C₂ funcional para la transcripción subsiguiente de los promotores flagelares de clase 2. Un producto génico de clase 2, σ 28 (codificado por el gen *fliA*), es un factor de transcripción sigma que dirige a la RNA polimerasa para transcribir los promotores flagelares de clase 3 y así culminar el ensamblaje del flagelo (Liu y Matsumura, 1995; Singer et al., 2014).

1.3.2. Adhesinas

Las adhesinas son estructuras que se encuentran en la superficie celular de algunas bacterias. En la mayoría de los casos, el proceso de adhesión se produce a través de interacciones receptor-ligando, donde un receptor en la superficie de un tejido está unido por un ligando en la

superficie bacteriana. El ligando, que es una proteína bacteriana especializada llamada adhesina, puede adoptar varias estructuras que se pueden dividir en dos principales grupos: adhesinas fimbriales y adhesinas no fimbriales (Gerlach et al., 2007; Rehman et al., 2019).

Las adhesinas no fimbriales son estructuras cortas monoméricas u oligoméricas y suelen ser secretadas por mecanismos autotransportadores (también conocidos como secreción tipo V). Se han descrito varias adhesinas no fimbriales en *Salmonella*: MisL, implicada en la colonización intestinal (Dorsey et al., 2005) y ShdA, necesaria para la persistencia del *S. ser. Typhimurium* en el ciego murino y para la eliminación eficaz y prolongada de la bacteria en las heces (Kingsley et al., 2002), son miembros de la familia de los autotransportadores; mientras que BapA se caracterizó como una adhesina participante en interacciones homotípicas durante la formación de biopelículas (Gerlach et al., 2007; Latasa et al., 2005).

Por otro lado, las adhesinas fimbriales son apéndices largos, poliméricos, parecidos a pelos, *Salmonella* tiene 13 loci fimbriales predichos, los cuales se inducen *in vivo* y son necesarios para entrar en el intestino. Las fimbrias de *Salmonella* atraviesan la capa mucosa para invadir el epitelio del huésped (Gerlach et al., 2007; Girard y Mourez, 2006; Prouty et al., 2004), luego se adhieren al epitelio (Dufresne et al., 2018) y a las células M (Jones et al., 1994) y ayudan a invadir los enterocitos no fagocíticos en el epitelio intestinal (Dufresne et al., 2018).

1.3.3. Plásmido

La característica más sobresaliente del plásmido de virulencia pSLT es aumentar la tasa de crecimiento de la bacteria durante la fase sistémica de la enfermedad. (Ahmer et al., 1999; Gulig

y Doyle, 1993). Este fenotipo es conferido por una región de 8 kb del plásmido que contiene los genes *spvRABCD* (Guiney et al., 1994). Los genes *spvB* y *spvC* codifican los principales factores principales de la virulencia de *S. ser. Typhimurium* expresados por plásmidos (Matsui et al., 2001). Ambos se translocan a través del sistema de secreción tipo 3 de la Isla de Patogenicidad 2 (SST3-2) a las células huésped. *SpvB* desestabiliza el citoesqueleto y se asocia con la citotoxicidad de la célula huésped (Browne et al., 2008; Tezcan-Merdol et al., 2001). *SpvC* tiene actividad fosfotreonina liasa y puede inactivar las proteínas cinasas de mamíferos Erk1/2, JNK y p38, interfiriendo algunas rutas de señalización de las células hospederas (Li et al., 2007; Mazurkiewicz et al., 2008).

Otros loci en el plásmido incluyen la región *pef* (plasmid-encoded fimbriae, por sus siglas en inglés), que ha sido implicada en la adhesión bacteriana a las células epiteliales intestinales. Otro gen interesante en el plásmido de virulencia es *tlpA*, que codifica un termómetro aparente en el sentido de que regula su propia transcripción según la temperatura (Hurme et al., 1997). Pese a los numerosos factores que sirven a *Salmonella* en cualquiera de sus etapas infectivas en el huésped, la mayoría de los genes que codifican los factores de virulencia más importantes se encuentran en islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI) (Fàbrega y Vila, 2013; Porwollik y McClelland, 2003).

1.3.4. Islas de patogenicidad de *Salmonella enterica*

Las islas de patogenicidad (PAIs, "Pathogenicity Islands" por sus siglas en inglés (Hallstrom y McCormick, 2014) son elementos genéticos en los cromosomas de un gran número de patógenos (Schmidt y Hensel, 2004). La adquisición de PAIs por transferencia horizontal de

genes permite que las bacterias adquieran rápidamente funciones complejas de virulencia de otras especies (Fàbrega y Vila, 2013; Hensel, 2004).

Aunque las PAIs son diversas en estructura y función, se observaron varias características comunes. (i) Llevan uno o más genes de virulencia. (ii) Están presentes en los genomas de una bacteria patógena pero ausentes de los genomas de un representante no patógeno de la misma especie o una especie estrechamente relacionada. (iii) Ocupan regiones genómicas relativamente grandes. La mayoría están en el rango de 10 a 200 kb. (iv) A menudo difieren del genoma central en su composición de bases guanina y citosina (G + C) y también muestran un uso diferente de codones (Gal-Mor y Finlay, 2006; Hacker et al., 1997; Hensel, 2004).

Muchos de los fenotipos de virulencia de *Salmonella enterica* están codificados por genes en PAIs, que se denominan "Islas de patogenicidad de *Salmonella*" o "SPIs". Esto incluye los fenotipos de virulencia más prominentes, como la invasión de la célula huésped y la patogénesis intracelular (Hensel, 2004; Schmidt y Hensel, 2004), por tanto, la adquisición de SPIs ha sido clave para el desarrollo de su papel como patógeno gastrointestinal. Por ejemplo, la adquisición de SPIs ha significado la ganancia de dos sistemas de secreción de tipo III (SST3-1 y SST3-2) codificados en SPI-1 y SPI-2 respectivamente, imprescindibles para la invasión del epitelio intestinal del huésped y la subsiguiente supervivencia intracelular (dos Santos et al., 2019; Haraga et al., 2008).

Estudios filogenéticos han demostrado que *Salmonella* y *Escherichia coli* divergieron de un ancestro común hace aproximadamente 100 millones de años (Bäumler et al., 1998; Doolittle et al., 1996; Porwollik y McClelland, 2003). La adquisición de islas de patogenicidad a través de la transferencia horizontal de genes ha sido uno de los principales factores en la divergencia

entre estas dos bacterias. Particularmente la ganancia de SPI-1 y SPI-2 han permitido que *Salmonella* evolucionara como un patógeno intracelular, mientras que *E. coli* permaneció como una bacteria comensal o un patógeno oportunista incapaz de invadir las células del epitelio intestinal (Bäumler, 1997; Bäumler et al., 1998; Ochman y Groisman, 1996) (Fig. 2).

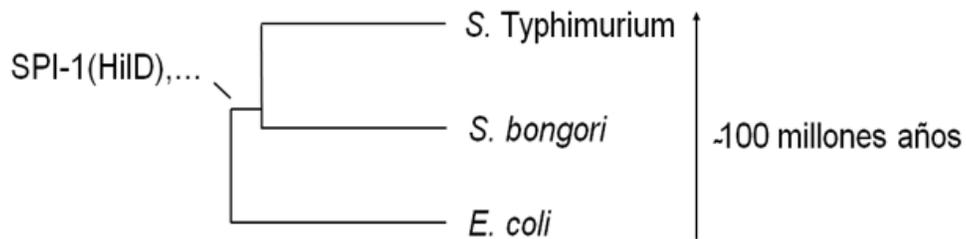


Fig. 2. Diferenciación de *Escherichia coli* y *Salmonella* serovar Typhimurium. A partir de un ancestro común *Salmonella* serovar Typhimurium divergió de *E. coli* hace aproximadamente 100 millones de años. Una de las características distintivas del género *Salmonella* ha sido la adquisición de Islas de patogenicidad como SPI-1, cuyo principal activador es el regulador transcripcional HilD, codificado en la propia SPI-1 (Modificado de Porwollik y McClelland, 2003).

Estudios filogenéticos de especies de *Salmonella* basados en el uso de NGS (Next-Generation Sequencing, por sus siglas en inglés) han demostrado diferencias entre *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, colocando al primero en términos evolutivos en una posición intermedia entre *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* (Fookes et al., 2011). Las dos especies de *Salmonella* divergieron hace 40-63 millones de años y su historia evolutiva ha dado lugar a importantes diferencias entre ellas (McQuiston et al., 2008). La separación de estas dos especies está representada por la adquisición de SPI-2 por *Salmonella enterica*, utilizada para la replicación bacteriana y la diseminación sistémica de la infección una vez que las bacterias invaden el epitelio de las células no fagocíticas y las células M (Wallis and Galyov, 2000).

En la actualidad se han descrito más de una veintena de SPIs diferentes dentro de *S. enterica*, varias de las cuales tienen un papel importante en la virulencia de *S. ser. Typhimurium* (Fàbrega y Vila, 2013; Lamas et al., 2018; Ray et al., 2022).

1.3.4.1. Isla de Patogenicidad de *Salmonella* 1 (SPI-1)

SPI-1 es una de las cinco islas de patogenicidad mejor caracterizadas de *Salmonella*. Tiene un tamaño de aproximadamente 40 kb entre genes que son consecutivos en *E. coli* K-12 y se encuentra en el centiosoma 63 en el cromosoma de *S. ser. Typhimurium*. SPI-1 está flanqueado por *fhIA* y *mutS* y consta de 39 genes; el contenido de G + C de SPI-1 es significativamente menor (42%) que el contenido promedio del genoma de *Salmonella* (52%) (Hensel, 2004; Lou et al., 2019; Mills et al., 1995).

SPI-1 codifica varias proteínas efectoras que son codificadas por los operones *sic/sip* y el gen *avrA* que son translocadas a las células huésped a través del SST3-1 (operones *prg/org* e *inv/spa*), el cual funciona como una jeringa molecular y es indispensable en la invasión dependiente de SPI-1. Además, existen otras proteínas efectoras codificadas en otras zonas del genoma, que también son inyectadas a través de este sistema de secreción (Fàbrega y Vila, 2013; Lostroh y Lee, 2001; Marcus et al., 2000; Que et al., 2013).

SPI-1 también codifica chaperonas (operón *sic/sip*), las cuales protegen las proteínas relacionadas con SPI-1 contra la degradación, evitan interacciones prematuras y median su reconocimiento por el SST3-1. Los reguladores transcripcionales HilA, HilC, HilD, InvF y SprB también están codificados en SPI-1 y su activación regula la expresión de genes que se

encuentran dentro y fuera de esta isla de patogenicidad (Fig. 3) (Banda et al., 2019; Ellermeier et al., 2005; Fàbrega y Vila, 2013; Hensel, 2004; Mills et al., 1995).

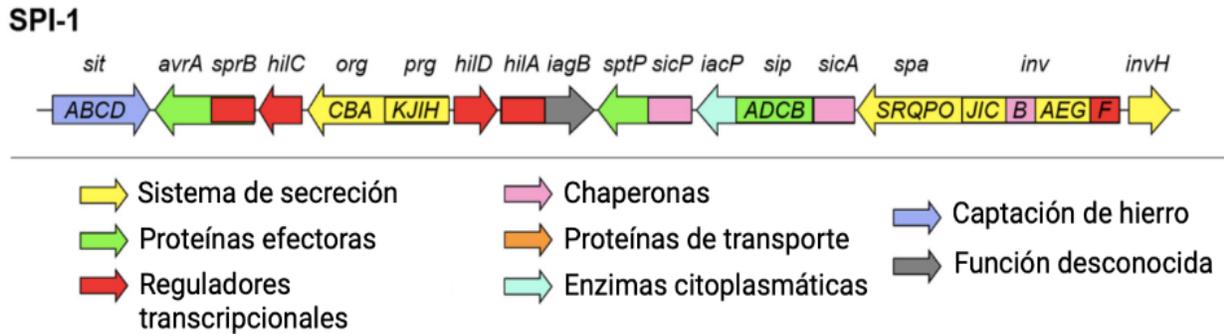


Fig. 3. Representación esquemática de los genes codificados en la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI-1) y sus funciones putativas (Adaptado de Fàbrega and Vila, 2013).

SPI-1 está presente en *S. bongori* y todas las subespecies y serotipos de *S. enterica* que han sido aislados hasta el momento. Esto llevó a la hipótesis de que SPI-1 es una adquisición bastante antigua obtenida posterior a la separación de los géneros *Escherichia* y *Salmonella* a partir de un antepasado común (Fig. 2). Se observó un alto grado de similitud de secuencia para los genes que codifican el SST3-1 en SPI-1 y el grupo de genes de invasión *mxil/spa* en el plásmido de virulencia de *Shigella* spp., lo que sugiere una ascendencia común (Hensel, 2004; Ochman y Groisman, 1996).

In vivo, los genes de SPI-1 se expresan cuando las bacterias se encuentran en el lumen intestinal o asociadas al epitelio o a enterocitos en proceso de extrusión, así como en subpoblaciones de bacterias hiperreplicativas en el citosol de células epiteliales. *In vitro*, los genes de SPI-1 se expresan durante el crecimiento en la fase estacionaria temprana en medios

de cultivo ricos en nutrientes como el medio LB, bajo condiciones que se asemejan al ambiente intestinal como lo es la baja concentración de oxígeno, la alta osmolaridad y el pH ligeramente alcalino (Altier, 2005; Fàbrega y Vila, 2013; Martínez et al., 2014).

1.3.4.2. Regulación de SPI-1

Debido a que SPI-1 contiene genes que son fundamentales para la invasión de *Salmonella*, la regulación de su expresión es crucial. En esta regulación participan reguladores que se encuentran codificados dentro y fuera de la isla (Fàbrega y Vila, 2013). En SPI-1 se encuentran los reguladores transcripcionales HilD, HilC e InvF que pertenecen a la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS (Schechter y Lee, 2001), así como HilA que es miembro de la familia de ToxR/OmpR (Bajaj et al., 1995).

HilD, HilC y RtsA (codificada en un operón ubicado en una isla integrada en tRNA^{PheU} en *S. ser. Typhimurium* y también perteneciente a la familia de reguladores AraC/XylS (Ellermeier y Slauch, 2003), forman un circuito de retroalimentación positiva que regulan la expresión de los genes de SPI-1 a través de la inducción de la expresión de *hila*, en respuesta a diversas señales intracelulares y ambientales (Ellermeier et al., 2005; Saini y Rao, 2010). HilA activa directamente la expresión de algunos genes de SPI-1, como los operones que codifican para los componentes del SST3-1, y el que codifica para InvF, regulador que a su vez activa la expresión del resto de genes de SPI-1 (Darwin y Miller, 1999; Eichelberg y Galán, 1999). El circuito formado entre HilD, HilC y RtsA también puede activar la expresión de InvF y algunas proteínas

efectoras de una manera independiente de HilA (Fig.4) (Baxter et al., 2003; Fàbrega y Vila, 2013; Narm et al., 2020).

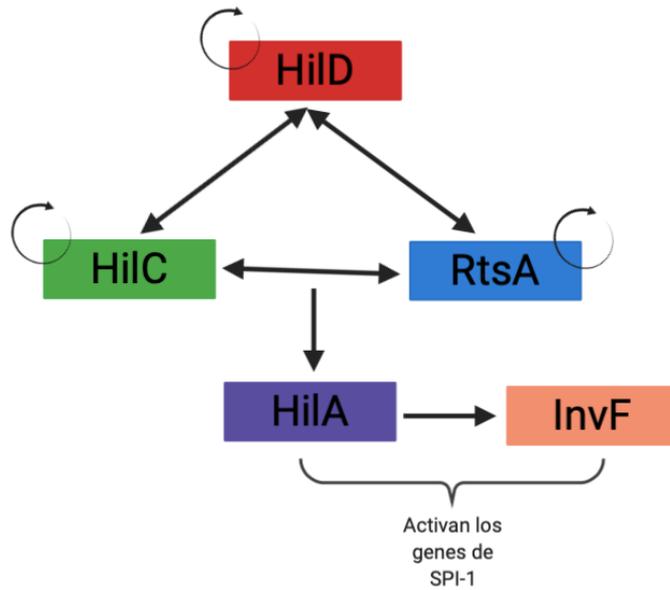


Fig. 4. Modelo de activación de SPI-1. Las flechas negras indican activación transcripcional de los genes. HilA e InvF, en acción combinada, activan al resto de los genes de SPI-1. (Modificado de Ellermeier *et al.*, 2005)

Otros reguladores codificados fuera de SPI-1 también están involucrados en la expresión de los genes de esta isla; por ejemplo, el sistema de dos componentes BarA/SirA, que es uno de varios reguladores conservados evolutivamente que regulan a SPI1 (Ahmer et al., 1999; Altier et al., 2000). Este sistema aumenta la expresión de los genes de virulencia, disminuye la expresión de genes de motilidad, participa en la formación de la biopelícula y en el almacenamiento de carbono (Teplitski et al., 2006, 2003). SirA activa los RNA reguladores CsrB y CsrC, los cuales antagonizan la represión traduccional mediada por la proteína CsrA sobre *hilD*, lo que permite la activación de SPI-1 (Martínez et al., 2014b, 2011; Pérez-Morales et al., 2021; Teplitski et al., 2006).

La proteína parecida a nucleóide H-NS juega un papel muy importante en la represión transcripcional de genes adquiridos por transferencia horizontal, como los de SPI-1. Diferentes estudios han demostrado la represión que ejerce H-NS sobre *hilA*, *hilD*, *hilC* y *rtsA* en condiciones no inductoras de SPI-1 (Olekhnovich and Kadner, 2007, 2006). Por otra parte, la proteína HilE reprime la expresión de los genes de SPI-1 al unirse e inactivar a HilD mediante una interacción proteína-proteína, la cual interfiere la dimerización de HilD e impide su interacción con el DNA (Baxter et al., 2003; Paredes-Amaya et al., 2018). Además, el sistema de dos componentes SsrA/B, codificado en SPI-2, el cual controla positivamente la expresión de los genes de SPI-2 reprime la expresión de los genes de SPI-1 cuando *Salmonella* se encuentra en un ambiente intracelular, actuando directamente sobre los genes *hilD* e *hilA* (Pérez-Morales et al., 2017).

1.3.4.3. Regulador HilD

HilD es un miembro de la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS y está codificado en SPI-1, consta de 309 aminoácidos, su tamaño es de 34.3 kDa y presenta dos dominios HTH de unión a DNA en su extremo C-terminal (Schechter y Lee, 2001).

HilD regula positivamente la expresión de varios genes, dentro y fuera de SPI-1. Sobre algunos de estos actúa directamente, contrarrestando la represión que ejerce la proteína H-NS sobre los promotores de dichos genes; y sobre otros actúa de forma indirecta a través de otros reguladores (Banda et al., 2019, 2018; Colgan et al., 2016; Martínez-Flores et al., 2016).

HilD es el principal activador de los genes de SPI-1 (Ellermeier et al., 2005; Saini et al., 2010). Sin embargo, también es capaz de regular genes fuera de dicha isla. Por ejemplo, se ha

demostrado que activa la expresión del sistema de dos componentes *ssrAB*, que regula positivamente los genes de SPI-2, esencial para la replicación y supervivencia de *Salmonella* dentro de las células hospederas, y así para la infección sistémica (Bustamante et al., 2008). El operón *flhDC*, que controla la expresión de los genes flagelares y quimiotaxis, es también regulado directamente por HilD, formando un circuito que interrelaciona la expresión de estos genes con los de SPI-1 (Singer et al., 2014). Así, HilD regula la expresión de un gran número de genes necesarios para la virulencia de *Salmonella* (Ellermeier et al., 2005; Gaviria-Cantín et al., 2017; Saini et al., 2010).

1.4. Respiración por nitrato

La microbiota intestinal tiene importantes funciones protectoras para el huésped, no obstante, las bacterias enteropatógenas son capaces de competir y contrarrestar a la microbiota gracias a estrategias de virulencia específica (Becker et al., 2015; Fàbrega y Vila, 2013). En el caso de *S. ser. Typhimurium*, se conoce que la respuesta inflamatoria generada por la bacteria proporciona, además de la alteración de la composición de la microbiota, una fuente localizada de nutrientes de alta energía. La motilidad y la quimiotaxis permiten que *Salmonella* acceda de manera eficiente a estos nutrientes y se acumule en áreas proximales, lo que resulta en una replicación más rápida y un beneficio competitivo sobre la microbiota (Rivera-Chávez et al., 2013; Stecher et al., 2008, 2007).

En *S. ser. Typhimurium*, el nitrato (NO_3^-) es preferentemente utilizado como aceptor final de electrones durante la colonización del intestino inflamado, presumiblemente debido a su alto

potencial redox estándar (Fàbrega y Vila, 2013; Lopez et al., 2012). Diversos estudios destacan la importancia del nitrato como un aceptor de electrones energéticamente valioso que favorece la colonización del lumen intestinal inflamado de ratones (Lopez et al., 2015, 2012; Rivera-Chávez et al., 2013).

El gen *sopE* de *S. ser. Typhimurium*, responsable en gran medida de la inflamación intestinal (Hapfelmeier et al., 2004; Müller et al., 2009), induce la expresión de la óxido nítrico sintetasa (iNOS, por sus siglas en ingles), una enzima que genera óxido nítrico (NO). El NO reacciona con especies reactivas de oxígeno (ROS) para formar peroxinitrito (ONOO⁻), una especie reactiva del nitrógeno con efectos bactericidas que se isomeriza rápidamente a nitrato y es producida principalmente por macrófagos (Lopez et al., 2012; Szabó et al., 2007).

Por su parte, el formiato producido a partir del piruvato durante la anaerobiosis sirve como un eficiente donador de electrones para la reducción final del nitrato a nitrito. La oxidación del formiato durante la respiración por nitrato es catalizada por el complejo enzimático formiato deshidrogenasa-N (Fdh-N) (Berg y Stewart, 1990; Wang y Gunsalus, 2003). La enzima Fdh-N es codificada por el operón *fdnGHI*, a concentraciones medias y altas de nitrato en *E. coli* K-12 su expresión está acoplada a la expresión del operón *narGHJI*, que codifica para una de las nitrato reductasa de la bacteria (Wang y Gunsalus, 2003).

II. ANTECEDENTES

Actualmente, una de las líneas de investigación de interés en el departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología, UNAM, es la identificación de nuevos factores de virulencia de *Salmonella*. Nos hemos planteado la identificación de nuevos genes regulados por HilD, así como el estudio de los mecanismos mediante los cuales HilD ejerce dicha regulación. En años recientes, gracias a estudios globales de transcriptómica y el análisis de la expresión de fusiones transcripcionales, se han identificado nuevos genes de *S. ser. Typhimurium* regulados por HilD, como son los casos de *phoH*, *yobH* y *fdnG* (Banda et al., 2019; Colgan et al., 2016; Martínez-Flores et al., 2016). Estos genes tienen la particularidad de ser genes ancestrales, lo cual significa que están presente en *Salmonella* mucho antes de la adquisición de HilD; además de encontrarse en otras bacterias tanto patógenas como no patógenas, como por ejemplo *E. coli* K-12, donde HilD no está presente y la función de estos genes no debe estar relacionada a virulencia (Berg y Stewart, 1990). Un estudio realizado por nuestro grupo demostró que HilD regula positivamente la expresión del gen ancestral *yobH* de *S. ser. Typhimurium*; y que el mismo participa en la invasión a células epiteliales HeLa y macrófagos RAW264.7. Esto sugiere que la función ancestral de *yobH* se ha reclutado para la virulencia de *S. ser. Typhimurium* a través de la regulación mediada por HilD (Banda et al., 2019). Estudios globales de transcriptómica sugieren que HilD regula la expresión de *fdnG* (Colgan et al., 2016). *fdnG* es un gen ancestral que codifica para la subunidad α de la formiato deshidrogenasa N (Fdh-N), cuyo tamaño es de 1105 aa y tiene un peso de 110.0 kD. La formiato deshidrogenasa se expresa anaeróbicamente en presencia de nitrato y está principalmente

involucrada en la transferencia de electrones del formiato al nitrato a través de una cadena de transporte electrónico (Berg and Stewart, 1990; Wang and Gunsalus, 2003).

Con base a los antecedentes que demuestran la importancia de HilD como regulador de genes de virulencia en *S. ser. Typhimurium* y la importancia de la respiración por nitrato en el establecimiento de la infección *in vivo*, nos planteamos analizar cómo se adaptó la regulación del gen *fdnG* por HilD en *S. ser. Typhimurium*.

III.JUSTIFICACIÓN

Las diferencias fenotípicas entre especies bacterianas estrechamente relacionadas suelen atribuirse a la presencia de genes especie-específicos, como aquellos que son adquiridos por transferencia horizontal. Estos genes adquiridos confieren nuevas habilidades a la bacteria receptora, teniendo un gran impacto en la evolución de bacterias patógenas, como *Salmonella*. En años recientes se ha demostrado que algunos reguladores transcripcionales adquiridos, como HilD en *Salmonella*, también regulan la expresión de genes ancestrales. Por tanto, nuestro estudio busca aportar evidencias acerca de la expansión de las propiedades de virulencia en bacterias, a través del reclutamiento de actividades celulares ancestrales, mediante el control transcripcional mediado por un regulador de virulencia, como HilD en *Salmonella*.

IV.HIPÓTESIS

La función celular del gen ancestral *fdnG* fue reclutada para la virulencia de *Salmonella enterica*, a través de la regulación transcripcional mediada por el regulador HilD.

V.OBJETIVOS

5.1. Objetivo general:

1. Determinar cómo se adaptó la regulación del gen ancestral *fdnG* mediada por HilD en *S. ser. Typhimurium*.

5.2. Objetivos específicos:

- 1) Identificar el mecanismo por el cual HilD regula positivamente la expresión de *fdnG*.
- 2) Determinar si la regulación de *fdnG* por HilD se adaptó mediante cambios en su región reguladora durante la divergencia de *S. ser. Typhimurium* y *E. coli* K-12.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas, plásmidos, oligonucleótidos y antibióticos empleados en este trabajo se enlistan en las tablas 1, 2, 3 y 4.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio

| Cepa | Descripción | Origen o referencia |
|-----------------------------|--|---------------------------|
| <u>S. ser. Typhimurium:</u> | | |
| WT | Cepa silvestre SL1344; Str ^R | (Hoiseth y Stocker, 1981) |
| $\Delta hiiD$ | Derivada de $\Delta hiiD::km$; Str ^R | (Martínez et al., 2011) |
| <u>E. coli:</u> | | |
| MG1655 | Derivada de <i>E. coli</i> K-12, cepa silvestre de laboratorio | (Jin and Gross, 1988) |
| DH10 β | Cepa de laboratorio; Str ^R | Invitrogen |
| MC4100 | Derivada de <i>E. coli</i> K-12, cepa silvestre de laboratorio; Str ^R | (Ferenci et al., 2009) |
| Δhns | Derivada de MC4100 $\Delta hns::km$; Str ^R | (Bustamante et al., 2011) |
| BL21/DE3 | Cepa para la expresión de proteínas recombinantes | Invitrogen |

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este estudio

| Plásmido | Descripción* | Origen o referencia |
|----------|---|---------------------|
| pKK232-8 | Derivado de pBR322, contiene el gen <i>cat</i> (cloranfenicol acetil transferasa) sin promotor, empleado para la construcción de fusiones transcripcionales; Amp ^R | (Brosius, 1984) |

| | | |
|---------------------------|--|--------------------------------|
| pfdnG _{STm} -cat | Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>fdnG-cat</i> de <i>S. ser. Typhimurium</i> desde -419 a +198; Amp ^R | Deyanira Pérez, 2018 |
| pfdnG _{Ec} -cat | Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>fdnG-cat</i> de <i>E. coli</i> desde -423 a +149; Amp ^R | Este estudio |
| pMPM-K6Ω | Vector de clonaje derivado de p15, contiene un promotor inducible por arabinosa; Km ^R | (Mayer, 1995) |
| pK6-HiID | Derivado de pMPM-K6Ω, expresa a HiID a través de un promotor inducible por arabinosa; Km ^R | (Martínez-Flores et al., 2016) |
| pMAL-HiID1 | Derivado de pMAL-c2X, expresa a MBP-HiID a partir del promotor <i>lac</i> ; Ap ^R | (Bustamante et al., 2008) |

* Las posiciones de las regiones contenidas en las fusiones transcripcionales son respecto a los inicios de transcripción de cada gen.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

| Nombre | Secuencia (5'-3') | Modificación |
|---|---------------------------------|--------------|
| Construcción de <i>fdnG_{STm}-cat</i>: | | |
| fdnG-Fw | CGAGGATCCTGACAAACAGTACGCTGCCT | BamHI |
| fdnG-Rv | CGAAAGCTTAGCTTATAGTTTCGCGCCTG | HindIII |
| Construcción de <i>fdnG_{Ec}-cat</i>: | | |
| fdnG _{Ec} -Fw63 | CAGGGATCCTGACGAATAACAGACTCCCGG | BamHI |
| fdnG _{Ec} -Rv64 | CGAAAGCTTAATTTGTAGTTTCGCGCCTGAG | HindIII |
| Verificación de fusiones en pKK232-8: | | |

| | |
|------------|----------------------------|
| PKKSEQ1-VB | CAA CGG TGG TAT ATC CAG TG |
| PKKSEQ2-VB | GAG GCC CTT TCG TCT TCA AG |

Tabla 4. Antibióticos utilizados en este trabajo

| | |
|----------------------|-----------|
| Estreptomicina (Str) | 100 µg/mL |
| Ampicilina (Amp) | 200 µg/mL |
| Kanamicina (Km) | 20 µg/mL |

6.1. Purificación de plásmidos por Miniprep

La purificación de los plásmidos, mencionados en la tabla 2, se realizó con ayuda del kit Zyppy Plasmid Miniprep Kit de la empresa ZYMORESEARCH No. de catálogo D4019.

6.2. Preparación de células electrocompetentes

Se prepararon inóculos de las cepas de interés en 5 mL de medio LB con los antibióticos para los que presentan resistencia y se incubaron durante toda la noche a 37°C en agitación a 200 rpm. El día posterior se transfirieron 500 µL del inóculo a un matraz de 250 mL con 50 mL de medio SOB (Super Optimal Broth) adicionado con los antibióticos adecuados (tabla 4). Los matraces se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm hasta obtener una DO₆₀₀ de 0.4-0.6. El cultivo se transfirió a tubos Falcon de 50 mL, se centrifugaron durante 8 min a 8,000 rpm a 4°C y se desechó el sobrenadante. Enseguida se lavó 2 veces la pastilla con 30 mL de agua milli Q

estéril previamente enfriada, se centrifugó en las condiciones anteriores y se desechó el sobrenadante. Posteriormente, se agregaron 30 mL de glicerol al 10% estéril previamente enfriado, se centrifugó en las mismas condiciones y se desechó el sobrenadante. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 500 μ L de glicerol al 10% estéril.

6.3. Electroporación

Se colocaron en hielo las celdas de electroporación (BIORAD). Enseguida se agregaron en un tubo Eppendorf 5 μ L del plásmido a transformar y 50 μ L de células electrocompetentes, se mezclaron y se colocaron en la celda de electroporación. A continuación, se le dio un pulso eléctrico de 2.5 kV durante 5.5 ms empleando un electroporador “*E. coli pulser*” (BIORAD). Posteriormente, se agregó 1 mL de medio SOC (Super Optimal broth + Catabolic repressor) a la celda, se mezcló y se transfirió a un tubo de ensayo, se incubaron los tubos con cultivo durante una hora a 37°C en agitación de 200 rpm. Enseguida se tomaron 200 μ L del cultivo y se sembraron en cajas Petri con medio LB solidificado con agar al 1.5% con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C durante aproximadamente 16 horas.

6.4. Construcción de las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*

Para la construcción del plásmido p $fdnG_{Ec}$ -*cat* (Tabla 2), que contiene la fusión transcripcional del gen *fdnG* de *E. coli* K-12 (*fdnG_{Ec}*) al gen reportero *cat* (*fdnG_{Ec}-cat*), primero se amplificó por PCR la región reguladora del gen *fdnG_{Ec}*, empleando los oligonucleótidos *fdnG_{Ec}*-

Fw63/fdnGEc-Rv64 (Tabla 3) y el DNA cromosomal de *E. coli* K-12 MG1655 como templado. Una muestra de 5 μ L del producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1% con solución amortiguadora TAE (Tris-Acetato-EDTA 0.5X, pH 8.0) a 110 V. Se tiñó el gel con bromuro de etidio (0.5 μ L/mg) y se observó el DNA teñido en un transiluminador de luz UV de onda corta (Bio-Rad) para comprobar que correspondiera al fragmento de DNA deseado. El resto del producto de PCR se purificó y concentró con el kit DNA Clean & Concentrator (ZYMO RESEARCH) número de catálogo D4006. Una vez purificado el DNA, se digirió, al igual que el plásmido pKK232-8 (contiene al gen *cat* sin promotor), con las enzimas de restricción BamHI y HindIII. Los DNAs digeridos se purificaron con el kit DNA Clean & Concentrator (ZYMO RESEARCH). Luego se preparó una mezcla con la cantidad necesaria del fragmento de DNA de *fdnGEc* y del plásmido pKK232-8 digeridos, de forma tal que se obtuviera una relación de entre 1:1 y 5:1 de radio molar. A esta mezcla se le añadió la enzima T4 DNA ligasa para clonar *fdnGEc* en el vector linearizado y se incubó a 22°C durante 1 h. Después se inactivó la enzima a 65°C por 10 min. Se tomaron entre 2-5 μ L de las reacciones de ligación para transformar las cepas electrocompetentes de interés.

6.5. Cultivos bacterianos para la cuantificación de la expresión de genes

Preparación de muestras de cultivos bacterianos en LB.

Se cultivaron inóculos de las cepas transformadas en 5 mL de medio LB con los antibióticos para los que presentan resistencia (Tabla 4) y se incubaron durante toda la noche a 37°C en agitación a 200 rpm. Se transfirió contenido de los preinóculos en una relación 1:50 a tubos con

5 mL de medio LB adicionados con los antibióticos adecuados (Tabla 4). Se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm y se tomaron muestras de 1.5 mL a las 6 horas de incubación. Se centrifugaron las muestras durante 2 min a 13,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Enseguida se lavaron las pastillas con 900 µL de solución de lavado TDTT (Tris-HCl, pH 7.8 50 mM, y DL-ditiotreitol 30 µM), se centrifugaron en las mismas condiciones y se desechó el sobrenadante. En caso de no llevar a cabo el ensayo inmediatamente, se guardaron las pastillas a -20°C, de lo contrario se resuspendieron en 500 µL de TDTT.

6.6. Cuantificación de la actividad enzimática de CAT (Cloranfenicol Acetil Transferasa)

Las pastillas del cultivo bacteriano resuspendidas en TDTT fueron sonicadas durante 3 min en un sonicador con pulso 10 s y periodos de reposo de 10 s entre cada pulso, obteniendo un tiempo total de sonicación de 6 min. Seguido a esto, las muestras sonicadas fueron centrifugadas durante 15 min a 13000 rpm y se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos.

Para la cuantificación de proteínas totales en los sobrenadantes obtenidos se utilizaron placas de 96 pozos, donde se agregaron por duplicado 10 µL de cada muestra por pozo, utilizando como blanco 10 µL de TDTT. Después, se añadió a cada pozo 200 µL de una mezcla de reactivos (50:1) BCA (Ácido bicinconínico) y CuSO₃, se incubó la placa durante 30 min a 37°C. Posteriormente, se calculó la concentración de proteínas totales mediante la lectura de la absorbancia a 562 nm en un lector automatizado de placas CERES.

Para calcular la actividad enzimática CAT, se colocaron 5 µL de cada muestra por duplicado en una placa de cultivo celular de 96 pozos, a continuación, se colocaron 200 µL de una mezcla

de reacción de Tris-HCL 0.1M pH 7.8, DTNB (ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) 1 mM, acetil-CoA 0.1 mM y cloranfenicol 0.1 mM. La actividad CAT se midió 20 veces durante 5 min después de agregar la mezcla de reacción.

6.7. Ensayos de retardo en gel (EMSA's, Electrophoretic Mobility Shift Assays por sus siglas en ingles)

Las regiones reguladoras del gen *fdnG_{STm}* fueron amplificadas mediante PCR con el par de oligonucleótidos *fdnG-Fw/fdnG-Rv* (Tabla 3). El producto de PCR se purificó usando el kit DNA Clean and Concentrator (Zymo Research). Como control negativo se amplificó un fragmento de la región reguladora del gen *ppK* (polifosfato cinasa), el cual no es regulado por HiID. Aproximadamente 100 ng de cada uno de los diferentes fragmentos de DNA se incubaron con concentraciones crecientes de la proteína purificada MBP-HiID, en una reacción con volumen total de 20 μ L. Las reacciones de retardo fueron realizadas en el buffer de unión que contiene Tris pH 9 10 mM, KCL 50 mM y 0.1% de Tritón X-100, incubando 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, los complejos proteína-DNA se analizaron en un gel de poliacrilamida al 6%, en condiciones no desnaturizantes, usando un amortiguador de corriente Tris-boratos-EDTA 0.5X. Para la detección de los fragmentos de DNA, los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador con luz UV de onda corta (Bio-Rad).

6.11. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA), utilizando la prueba t de Student desapareada con la corrección de Welch o un análisis de varianza de una vía (ANOVA) según correspondiera. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

VII. RESULTADOS

7.1. Contexto genómico de *fdnG* en *S. ser. Typhimurium* SL1344 y *E. coli* K-12.

fdnG es un gen ancestral que se encuentra conservado en muchas bacterias patógenas y no patógenas como lo son *S. ser. Typhimurium* y *E. coli* K-12, las cuales están evolutivamente relacionadas (Berg y Stewart, 1990; Wang y Gunsalus, 2003). Nuestro primer paso fue entonces analizar el contexto genómico de *fdnG* en *S. ser. Typhimurium* SL1344 y *E. coli* K-12. Como se observa en la Fig. 5A, el contexto genómico de *fdnG* en ambas bacterias se encuentra conservado. Solamente se observan cinco genes en *S. ser. Typhimurium* (*SL1344_RS25320*, *ompD*, *SL1344_RS07840*, *smvA* y *SL1344_RS07850*) y dos genes en *E. coli* (*yddL* y *yddK*), que son específicos de cada bacteria (Fig. 5A). Por otra parte, el gen estructural de *fdnG* y su proteína FdnG están conservadas en ambas bacterias, compartiendo una identidad de 86% y 93% respectivamente, mientras que la región intergénica corriente arriba tiene un porcentaje de identidad de 56%.

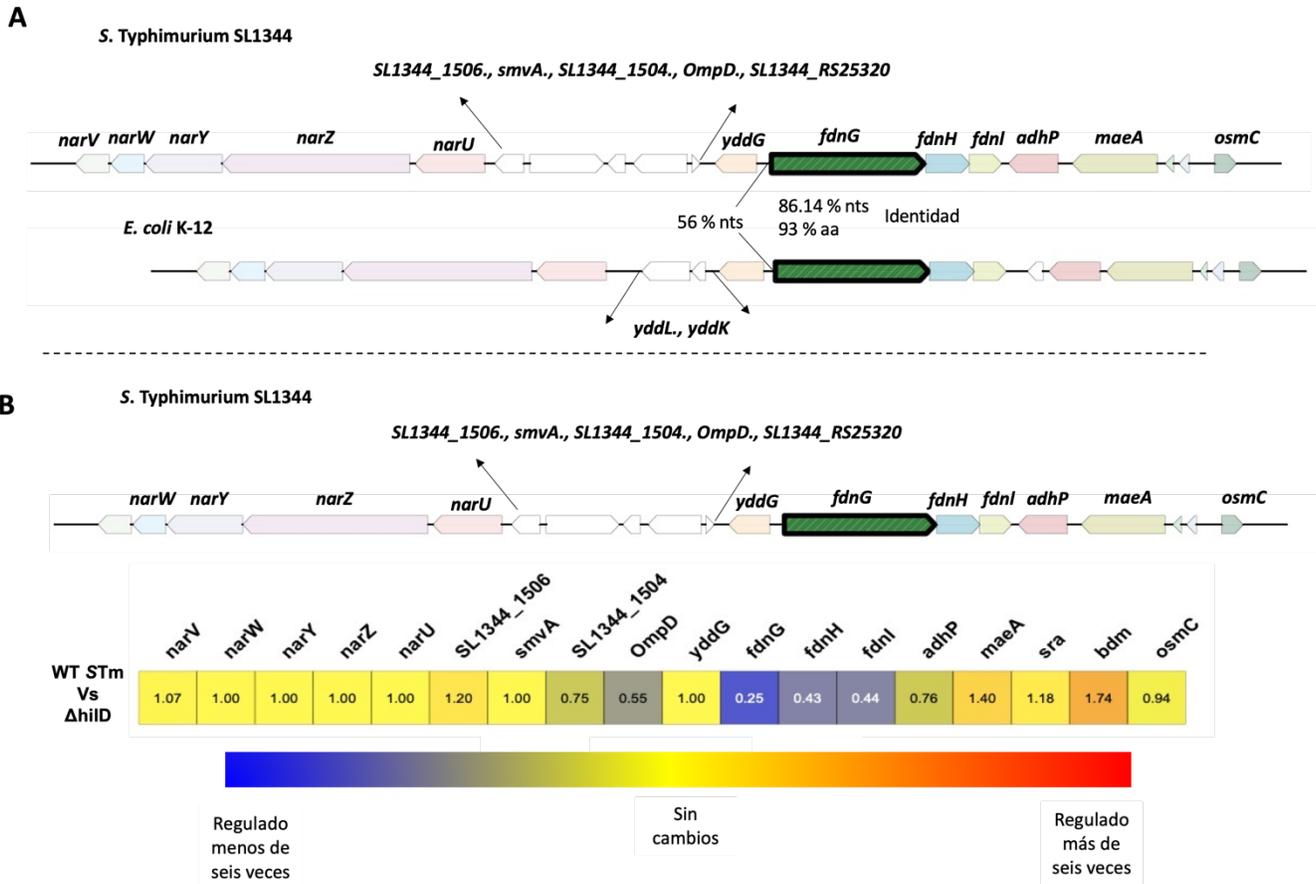


Fig.5. Contexto genómico de *fdnG* en *S. ser.* Typhimurium SL1344 y *E. coli* K-12. (A) Representación del contexto genómico de *fdnG* en *S. ser.* Typhimurium SL1344 y *E. coli* K-12. Las flechas en colores iguales representan los genes ortólogos conservados en ambas bacterias, los genes no conservados están representados en color blanco. (B) Representación de la expresión génica del contexto genómico de *fdnG*_{STm} de la mutante isogénica *S. ser.* Typhimurium Δ *hilD* (Δ *hilD*) respecto a WT *S. ser.* Typhimurium (WT STm). Los datos de expresión génica proceden de estudios de RNA-seq (Colgan *et al.*, 2016).

Por otro lado, análisis transcriptómicos previos sugieren que dentro del contexto genómico de *fdnG* solo el operón al que pertenece este gen, *fdnGHI*, es regulado por HilD en *S. ser.* Typhimurium (Colgan *et al.*, 2016) (Fig. 5B). Lo anterior indica que la adaptación de la regulación de este operón mediada por HilD es un evento específico que no se extiende a otros genes cercanos; ni siquiera al operón *narZYWV* que funcionalmente está relacionado a *fdnG*, ya que

codifica para una nitrato reductasa que también participa en la respiración por nitrato y cuya expresión es directamente proporcional a la de *fdnG* a concentraciones medias y altas de nitrato, al menos en *E. coli* (Blasco et al., 1992; Bonnefoy y Demoss, 1994; Wang et al., 1999; Wang y Gunsalus, 2003).

7.2. La expresión del gen *fdnG* de *S. ser. Typhimurium* SL1344, pero no del gen *fdnG* de *E. coli* K-12, se regula por HilD en LB

Estudios de transcriptómica sugieren que HilD regula positivamente la expresión de *fdnG* en *S. ser. Typhimurium*. Sin embargo, en una cepa comensal, como lo es *E. coli* K-12, no se encuentra el regulador transcripcional HilD (Colgan et al., 2016; Porwollik y McClelland, 2003; Wang y Gunsalus, 2003). Por tal motivo nos dimos a la tarea de determinar si la adaptación de la regulación transcripcional de *fdnG* mediada por HilD ocurrió con la adquisición de este regulador por *S. ser. Typhimurium* o si también fueron necesarios cambios en la región reguladora de *fdnG* para que se estableciera dicha regulación.

Para el análisis de la expresión de los genes *fdnG* de *S. ser. Typhimurium* y *E. coli* K-12 se construyeron fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*. La fusión de *fdnG* de *S. ser. Typhimurium* (*fdnG_{STM}-cat*) (Tabla 2) fue realizada por la Dra. Deyanira Pérez Morales y nosotros construimos la fusión transcripcional correspondiente al gen *fdnG* de *E. coli* (*fdnG_{Ec}-cat*), contenida en el vector pKK232-8 (Tabla 2). Para ello se utilizaron los oligonucleótidos *fdnG_{Ec}-Fw63* y *fdnG_{Ec}-Rv64* (Tabla 3), cuyo producto de PCR, utilizando el DNA cromosomal

de *E. coli* K-12 como templado, abarca la región comprendida entre los nucleótidos -423 a +149, respecto al inicio de transcripción de *fdnG_{Ec}*.

Para corroborar la correcta construcción de la fusión *fdnG_{Ec}-cat* (sección 6.4 de materiales y métodos) se purificó el plásmido resultante pfdnG_{Ec}-cat y se comparó su tamaño respecto al vector pKK232-8, mediante una corrida electroforética en un gel de agarosa al 1%. Como se muestra en la figura 6, el plásmido pfdnG_{Ec}-cat migró en dos conformaciones diferentes, sobre los 4000 pb y 7000 pb, respectivamente (carril 8). Por su parte, el vector pKK232-8 también migró en dos conformaciones, pero en ambos casos teniendo un menor tamaño que la conformación correspondiente en pfdnG_{Ec}-cat (carril 9), lo que sugiere que el plásmido pfdnG_{Ec}-cat tiene insertado un fragmento de DNA.

A continuación, realizamos varias reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos *fdnG_{Ec}-Fw63* y *fdnG_{Ec}-Rv64*, así como el pKKSEQ2-VB y pKKSEQ1-VB (Tabla 3), que hibridan con regiones corriente arriba y abajo del sitio de clonación múltiple del vector pKK232-8, respectivamente. El plásmido pfdnG_{Ec}-cat y el vector pKK232-8 fueron utilizados como templado de dichas reacciones de PCR. El producto de PCR, obtenido de combinar el par de oligonucleótidos pKKSEQ2-VB/pKKSEQ1-VB con el plásmido pfdnG_{Ec}-cat, migró en una posición algo menor a los 1000 pb en un gel de agarosa al 1% (Fig. 6, carril 2), mientras que la misma combinación de oligonucleótidos con el vector pKK232-8 produjo un fragmento de entre 300 pb y 400 pb (Fig. 6, carril 3). Estos resultados muestran que el fragmento amplificado a partir de pfdnG_{Ec}-cat es mayor que el amplificado a partir de pKK232-8 en algo más de 500 pb, lo que corresponde con el tamaño del inserto de la región intergénica corriente arriba de *fdnG_{Ec}* que es de 572 pb. Además, se realizaron reacciones de PCR con los pares de oligonucleótidos

fdnG_{Ec}-Fw63/pKKSEQ1-VB y pKKSEQ2-VB/*fdnG_{Ec}*-Rv64 para comprobar que el inserto en *pfdnG_{Ec}*-cat correspondiera a la secuencia de la región intergénica corriente arriba de *fdnG_{Ec}*. Como se observa en la figura 6, de ambas combinaciones de oligonucleótidos se obtuvieron fragmentos de DNA al utilizar el plásmido *pfdnG_{Ec}*-cat (carriles 4 y 6), pero no el vector pKK232-8 (carrile 5 y 7), como templado en el PCR. Esto evidencia que el plásmido *pfdnG_{Ec}*-cat contiene específicamente el fragmento de DNA que comprende a la región intergénica corriente arriba de *fdnG_{Ec}*. De igual manera, el plásmido *pfdnG_{Ec}*-cat fue secuenciado en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM, confirmándose la correcta secuencia del inserto en *pfdnG_{Ec}*-cat.

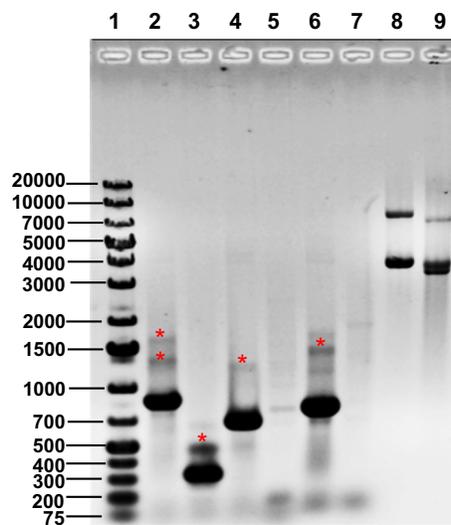


Fig.6. Construcción de la fusión transcripcional de *fdnG* de *E. coli* al gen reportero *cat*. Para corroborar la correcta construcción de la fusión *fdnG_{Ec}*-*cat* se realizaron varios PCR utilizando diferentes combinaciones de oligonucleótidos con el plásmido *pfdnG_{Ec}*-*cat* o el vector pKK232-8 como templado y fueron sometidos a una corrida electroforética en un gel de agarosa al 1%. (1) Marcador de peso molecular; (2) Oligonucleótidos PKKSEQ2-VB/PKKSEQ1-VB con *pfdnG_{Ec}*-*cat*; (3) Oligonucleótidos PKKSEQ2-VB/PKKSEQ1-VB con pKK232-8; (4) Oligonucleótidos *fdnG_{Ec}*-Fw63/PKKSEQ1-VB con *pfdnG_{Ec}*-*cat*; (5) Oligonucleótidos *fdnG_{Ec}*-Fw63/PKKSEQ1-VB con pKK232-8; (6) Oligonucleótidos PKKSEQ2-VB/*fdnG_{Ec}*-Rv64 con *pfdnG_{Ec}*-*cat*; (7) Oligonucleótidos PKKSEQ2-VB/*fdnG_{Ec}*-Rv64 con pKK232-8; (8) *pfdnG_{Ec}*-*cat*; (9) pKK232-8. Los asteriscos rojos representan bandas de DNA inespecíficas.

Una vez que contábamos con las fusiones *fdnG_{STm}-cat* y *fdnG_{Ec}-cat*, sus expresión fue analizada en medio LB en condiciones inductoras de los genes de SPI-1 (Altier, 2005; Fàbrega and Vila, 2013; Martínez et al., 2014b). La actividad específica de la fusión *fdnG_{STm}-cat* se cuantificó en la cepa silvestre de *S. ser. Typhimurium* (STm WT), así como en una cepa silvestre de *E. coli* K-12 con el vector pMPM-K6Ω (*Ec* WT+pK6) o en presencia del plásmido pK6-HiID que expresa a HiID a partir de un promotor inducible por arabinosa (*Ec* WT+pK6-HiID). La actividad de la fusión *fdnG_{Ec}-cat* se cuantificó también en las mismas cepas de *E. coli* K-12 expresando o no a HiID. La expresión de la fusión *fdnG_{STm}-cat* se indujo en la cepa STm WT, mientras que en la cepa *Ec* WT+pK6, la cual carece de HiID, la expresión de *fdnG_{STm}-cat* disminuyó significativamente (3 veces) (Fig. 7A). Sin embargo, los niveles de expresión de *fdnG_{STm}-cat* en la cepa *Ec* WT+pK6-HiID se restauraron a niveles similares a los alcanzados en la cepa silvestre de *S. ser. Typhimurium* (Fig. 7A.). Lo anterior reafirma la idea de que HiID induce la expresión de *fdnG_{STm}* y muestra que no son necesarios otros reguladores específicos de *Salmonella* para inducir la expresión de *fdnG_{STm}* en las condiciones probadas.

Interesantemente, cuando se evaluó la fusión *fdnG_{Ec}-cat* se observó que ésta no fue capaz de inducirse en estas condiciones, ni siquiera en presencia del regulador HiID (Fig. 7A.). Esto indica que HiID no regula la expresión de este gen en las condiciones estudiadas, lo que sugiere que existen diferencias en la región reguladora de los genes *fdnG* de *S. ser. Typhimurium* y *E. coli* K-12 que permitieron la adaptación de la regulación de *fdnG_{STm}* por HiID durante la divergencia de ambas bacterias.

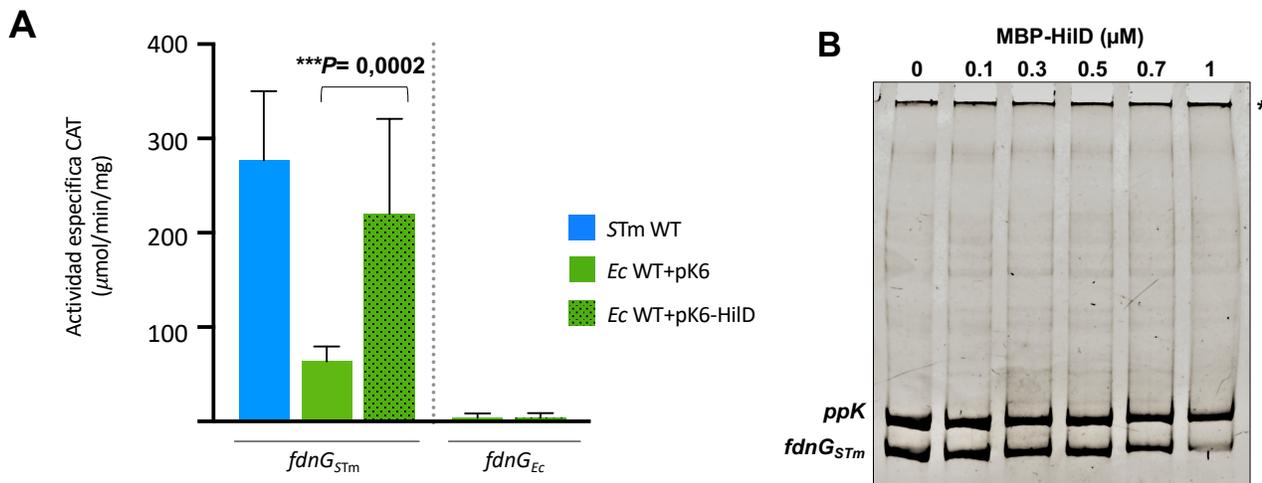


Fig.7. El gen *fdnG* de *S. ser. Typhimurium*, pero no el gen *fdnG* de *E. coli* K-12, se expresa y regula por HiID en condiciones inductoras de SPI-1. (A) La expresión de la fusión transcripcional *fdnG_{STm}-cat* se evaluó en las cepas WT de *S. ser. Typhimurium* y *E. coli* K-12 (MC4100), en presencia del vector pMPPM-K6Ω (pK6) o del plásmido pK6-HiID que expresa a HiID a partir de un promotor inducible por arabinosa. La fusión *fdnG_{Ec}-cat* se evaluó en las cepas WT de *E. coli* K-12 (MC4100) expresando o no a HiID. La expresión de HiID a partir del plásmido pK6-HiID se indujo añadiendo L-arabinosa (0.01%) a los cultivos desde el inicio. Los datos representan el promedio con la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Se indican valores estadísticamente significativos ($***P = 0,0002$). (B) La unión de la proteína MBP-HiID al fragmento de DNA contenidos en la fusión *fdnG_{STm}-cat* se analizó mediante ensayos de retardo en gel (EMSA) competitivos no radiactivos. Un fragmento de la región reguladora del gen *ppK* se utilizó como control negativo. Las muestras de estos ensayos se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 6% y se tiñeron con bromuro de etidio. Se indica con un asterisco el posible complejo DNA-MBP-HiID.

Para corroborar la regulación del *fdnG_{STm}* por HiID, realizamos ensayos de retardo en gel utilizando la proteína MBP-HiID, la cual se ha visto que es activa *in vitro* e *in vivo* (Bustamante et al., 2008; Martínez et al., 2014b; Martínez-Flores et al., 2016), junto con la región intergénica corriente arriba de *fdnG_{STm}* que está incluida en la fusión transcripcional *fdnG_{STm}-cat*. Coincidente con los ensayos de expresión transcripcional, la proteína MBP-HiID fue capaz de interactuar all fragmento contenido en la fusión *fdnG_{STm}-cat* (Fig.7B.). Estos resultados indican que HiID induce directamente la expresión de *fdnG_{STm}* al unirse a la región reguladora del gen.

En conjunto, estos resultados muestran que el gen *fdnG*_{STm}, pero no el gen *fdnG*_{Ec}, es regulado por HilD en condiciones inductoras de SPI-1; lo que sugiere que tanto la ganancia de HilD, como la diferenciación de la secuencia reguladora, llevaron al gen *fdnG*_{STm} a expresarse distintivamente en condiciones relevantes para la virulencia de *Salmonella*.

7.3. La expresión de los genes *fdnG* de *S. ser. Typhimurium* SL1344 y *E. coli* K-12 son regulados de forma diferente por el represor H-NS

HilD induce la expresión de sus genes blanco contrarrestando la represión mediada por el regulador transcripcional global H-NS, y en ausencia de este la actividad de estos genes se expresa independientemente de HilD (Banda et al., 2019; Bustamante et al., 2008).

Nosotros quisimos determinar si HilD emplea este mismo mecanismo para inducir la expresión de *fdnG* de *S. ser. Typhimurium* y para ello analizamos la expresión de la fusión transcripcional *fdnG*_{STm}-*cat* en la cepa WT de *S. ser. Typhimurium*, en las cepas *Ec* WT+pK6 y *Ec* WT+pK6-HilD, así como en una cepa de *E. coli* K-12 carente de *hns* expresando o no al regulador HilD (*Ec* Δ *hns*+pK6-HilD y *Ec* Δ *hns*+pK6, respectivamente). Como se muestra en la figura 8, la expresión de *fdnG*_{STm}-*cat* aumentó significativamente (2 veces) en la cepa *Ec* Δ *hns*+pK6 respecto a su expresión en la cepa silvestre de *E. coli* con el vector vacío y a un nivel similar al observado en la cepa silvestre de *E. coli* transformada con el plásmido pK6-HilD. Esto sugiere que H-NS actúa como un represor de la expresión de *fdnG*_{STm} y que en ausencia de H-NS la expresión de *fdnG*_{STm} se vuelve independiente de HilD. Sin embargo, la presencia del plásmido pK6-HilD aumentó aún más (3 veces) la expresión de la fusión *fdnG*_{STm}-*cat* en la mutante Δ *hns*

de *E. coli*, lo que sugiere que HilD también induce la expresión parcial del gen *fdnG_{STm}* por un mecanismo independiente de H-NS (Fig. 8). Por otro lado, la expresión del gen *fdnG_{Ec}* no fue capaz de inducirse, ni en la cepa silvestre de *E. coli* ni en la cepa Δhns (Fig. 8), lo que indica que H-NS no regula la expresión de *fdnG_{Ec}* en estas condiciones.

Estos resultados sugieren que durante la divergencia evolutiva de *S. ser. Typhimurium* y *E. coli* K-12, en la región reguladora de *fdnG_{STm}* se originaron uno o más sitios de regulación por H-NS. Así mismo, que HilD induce la expresión de *fdnG_{STm}*, en condiciones relevantes para la virulencia de *S. ser. Typhimurium*, actuando como anti represor de H-NS. Sin embargo, más estudios deben realizarse para corroborar estas hipótesis.

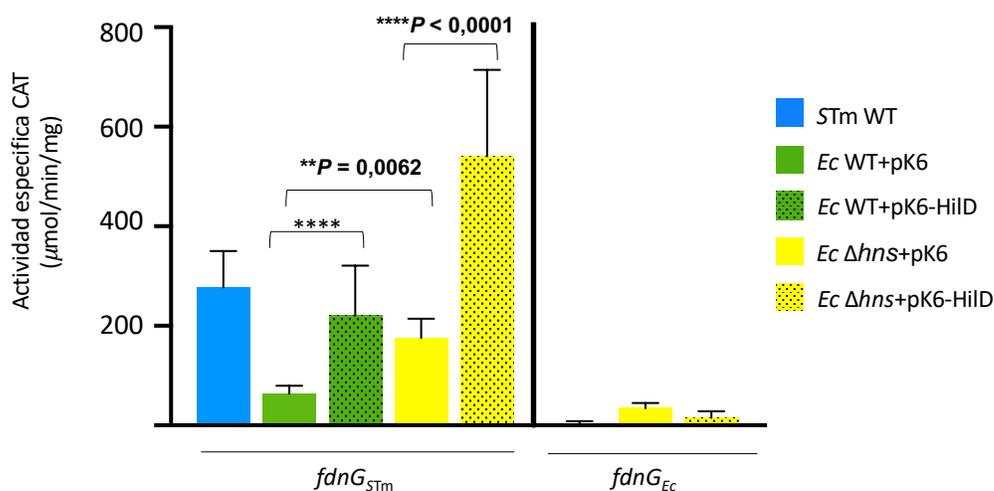


Fig.8. H-NS reprime la expresión de *fdnG_{STm}*, pero no de *fdnG_{Ec}*, en LB. La actividad específica de la fusión transcripcional *fdnG_{STm}-cat* se determinó en las cepas WT de *S. ser. Typhimurium* y *E. coli* K-12 (MC4100), así como en una cepa de *E. coli* Δhns , con el vector pMPM-K6 Ω (pK6) o con el plásmido pK6-HilD que expresa a HilD a partir de un promotor inducible por arabinosa. La actividad específica de la fusión transcripcional *fdnG_{Ec}-cat* fue evaluada en la cepa WT de *E. coli* (*Ec* WT+pK6) y en su cepa derivada Δhns transformada con el vector pMPM-K6 Ω (pK6) o con el plásmido pK6-HilD. La expresión de HilD a partir del plásmido pK6-HilD se indujo añadiendo L-arabinosa (0.01%) a los cultivos desde el inicio. Los datos representan el promedio con la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Se indican valores estadísticamente significativos (** $P = 0,0062$; **** $P < 0,0001$).

VIII. DISCUSIÓN

Estudios de transcriptómica previos indican que el regulador transcripcional exclusivo de *Salmonella*, HilD, induce la expresión del gen *fdnG* de *S. ser. Typhimurium* (Colgan et al., 2016), que es un gen ancestral presente en muchas otras bacterias como en *E. coli* (Punginelli et al., 2004; Wang y Gunsalus, 2003). En este estudio nosotros mostramos que HilD induce la expresión del *fdnG* de *S. ser. Typhimurium* y que la adaptación de esta regulación se originó por la ganancia del regulador HilD y también por cambios en la región reguladora de este gen, lo cual permitió una expresión diferencial con respecto al gen *fdnG* de *E. coli* K-12 (Fig.9).

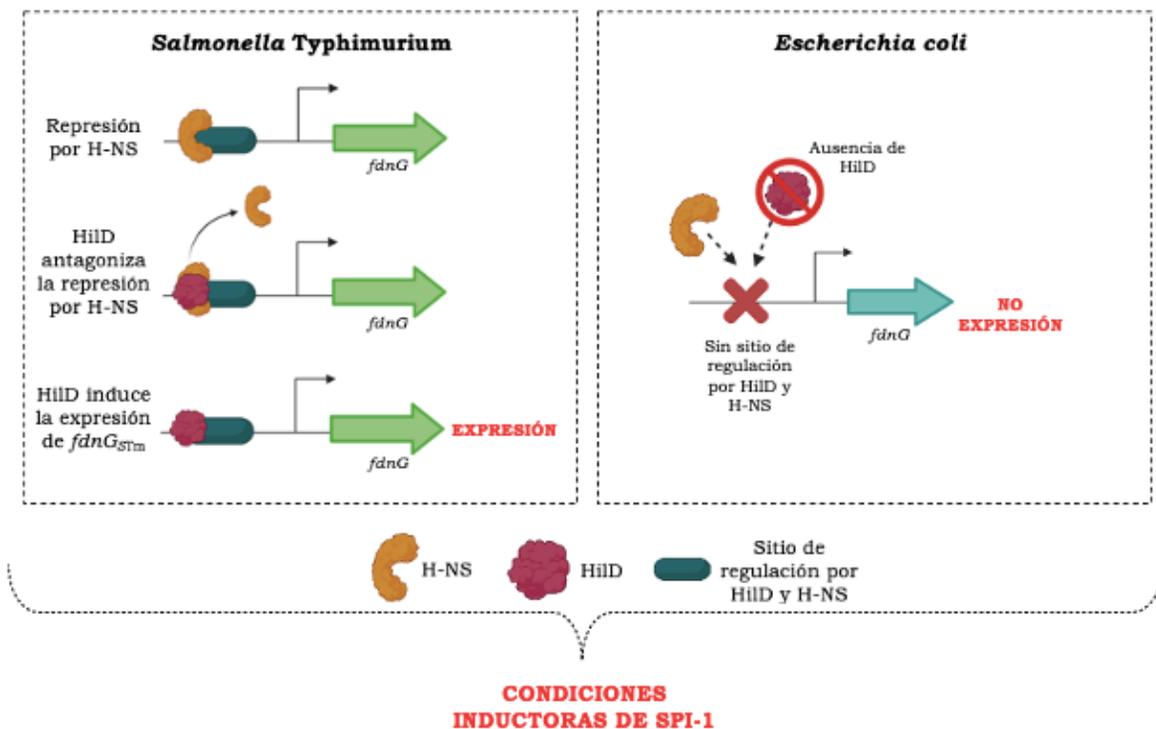


Fig.9. Representación de la adaptación reguladora de *fdnG* por HilD en *S. Typhimurium*. Se indica como la adquisición de HilD y la evolución *cis*-reguladora llevaron a una expresión y regulación diferencial de *fdnG_{STM}* respecto a *fdnG_{Ec}*, en condiciones relevantes para la virulencia de *Salmonella*.

Nuestros datos indican que en ausencia del represor H-NS, la expresión del gen *fdnG_{STm}* se vuelve independientemente de la presencia de HilD, lo que respalda que HilD induce la expresión de *fdnG_{STm}* al antagonizar el efecto negativo de H-NS, un mecanismo que emplea HilD para inducir la expresión de varios otros genes (Banda et al., 2019; Bustamante et al., 2008; Martínez et al., 2014; Valdespino-Díaz et al., 2022). Curiosamente, observamos que la sobreexpresión de HilD aumentó aún más la expresión del gen *fdnG_{STm}* en ausencia de H-NS, lo que sugiere que HilD, además de actuar como un anti represor de H-NS, podría tener un efecto adicional en la regulación de *fdnG_{STm}*; quizás antagonizando la acción de un represor adicional o mejorando la unión de la RNA polimerasa al promotor de este gen. De acuerdo con esta idea, un informe anterior indica que HilD contrarresta la represión ejercida por la proteína asociada a nucleoide Hha sobre el gen *rtsA* (Olekhnovich y KDNAer, 2007). Además, la evidencia de otro estudio sugiere que HilD recluta la RNA polimerasa en el promotor *hila* (Boddicker et al., 2003).

Por otra parte, nosotros solo encontramos una expresión de fondo del gen *fdnG_{Ec}* en condiciones inductoras de SPI-1, incluso en presencia de HilD o ausencia de H-NS. Esto nos indica que a diferencia de *fdnG_{STm}*, el gen *fdnG_{Ec}* no se regula por ninguno de estos reguladores. Estos resultados nos llevan a pensar que durante la divergencia de *Salmonella* y *E. coli* se generaron cambios *cis*-regulatorios en la región reguladora de *fdnG_{STm}* que generaron la regulación por HilD y H-NS, permitiéndole a *fdnG_{STm}* expresarse en condiciones relevantes para la virulencia de *S. ser. Typhimurium*. Consistente con esa idea, un análisis *in silico* reciente logró predecir un sitio de regulación de HilD en la región reguladora de *fdnG_{STm}*, pero no en *fdnG_{Ec}* (datos no mostrados). Sin embargo, sería conveniente realizar más análisis de la región

reguladora de los genes *fdnG* de *S. ser. Typhimurium* y *E. coli* K-12 que permitan identificar los sitios necesarios para la regulación por HilD y por H-NS en *fdnG*_{STM}.

HilD es el principal regulador de los genes de SPI-1, necesarios para la invasión de *S. ser. Typhimurium* a sus células blanco (Bustamante et al., 2008; Ellermeier et al., 2005; Saini et al., 2010). Sin embargo, *Salmonella* ha reclutado la función de varios otros genes fuera de SPI-1 para la virulencia de la bacteria, a través de la regulación transcripcional mediada por HilD, incluyendo algunos genes ancestrales (Banda et al., 2019, 2018; Colgan et al., 2016; Martínez-Flores et al., 2016; Singer et al., 2014). Por ejemplo, HilD ha reclutado la función de la motilidad para la virulencia de *S. ser. Typhimurium*, a través de la regulación positiva que ejerce sobre el operón *flhDC*, que controla la expresión de los genes flagelares y quimiotaxis; formando un circuito regulatorio que interrelaciona la expresión de estos genes con los de SPI-1 (Singer et al., 2014). Además, un estudio de nuestro grupo de trabajo determinó que HilD induce la expresión de *sprB* (se encuentra en SPI-1) al contrarrestar directamente la represión mediada por H-NS, desencadenando así la expresión de varios genes mediante el circuito regulatorio HilD-SprB, incluido el gen ancestral *yobH*, necesario para la invasión de *S. ser. Typhimurium* (Banda et al., 2019). Entonces, no es refutable pensar que la función de FdnG pueda estar siendo reclutada para la virulencia de *S. ser. Typhimurium* a través de la regulación transcripcional mediada por HilD, sobre todo cuando existen varios estudios que han demostrado que la respiración del nitrato (ruta metabólica en la que participa la formiato deshidrogenasa FdnGHI) le confiere una ventaja adaptativa a *S. ser. Typhimurium* en el intestino inflamado de ratones (Berg y Stewart, 1990; Wang y Gunsalus, 2003). Por tanto, creemos sumamente necesario analizar la posible contribución de FdnG a la virulencia de *S. ser. Typhimurium*, en cultivos celulares y modelos animales.

En conjunto, los datos de este estudio en conjunto exponen que la regulación diferencial de genes ortólogos es una fuente importante de variabilidad fenotípica entre bacterias estrechamente relacionadas, como lo son *S. ser. Typhimurium* y *E. coli* K-12. Además, aportamos evidencias de como la evolución *cis*-reguladora puede conducir al rearrreglo de circuitos de regulación transcripcional, permitiendo la expansión del regulón de reguladores adquiridos por transferencia horizontal, como el caso de HilD en *Salmonella*.

IX. CONCLUSIONES

1. El gen *fdnG* de *S. ser. Typhimurium* es regulado positivamente por HilD en condiciones relevantes para la virulencia, mientras que el gen *fdnG* de *E. coli* K-12 no se expresa ni es regulado por HilD en estas condiciones.
2. El gen *fdnG* de *S. ser. Typhimurium* es reprimido por H-NS en condiciones relevantes para la virulencia, mientras que el gen *fdnG* de *E. coli* no es regulado por H-NS en estas condiciones.
3. La adaptación de la regulación transcripcional de *fdnG*_{STM} mediada por HilD involucró la adquisición de HilD, así como cambios *cis*-regulatorios que permitieron la regulación por HilD y H-NS en condiciones relevantes para la virulencia de *Salmonella*.

X. PERSPECTIVAS

1. Determinar los sitios de regulación por HilD y H-NS en el gen *fdnG* de *S. ser. Typhimurium*.
2. Confirmar la regulación del gen *fdnG* y de la proteína FdnG de *S. ser. Typhimurium* mediada por H-NS mediante ensayos de dominancia negativa.
3. Evaluar si el gen *fdnG* de *S. ser. Typhimurium* se requiere para la invasión a células epiteliales HeLa y/o para la infección intestinal en ratones.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acheson, D., Hohmann, E.L., 2001. Nontyphoidal Salmonellosis. *Clinical Infectious Diseases* 32, 263–269. <https://doi.org/10.1086/318457>
- Ahmer, B.M.M., Tran, M., Heffron, F., 1999a. The Virulence Plasmid of *Salmonella* Typhimurium Is Self-Transmissible. *Journal of Bacteriology* 181, 1364. <https://doi.org/10.1128/jb.181.4.1364-1368.1999>
- Ahmer, B.M.M., van Reeuwijk, J., Watson, P.R., Wallis, T.S., Heffron, F., 1999b. *Salmonella* SirA is a global regulator of genes mediating enteropathogenesis. *Molecular Microbiology* 31, 971–982. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.1999.01244.X>
- Altier, C., 2005. Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *Journal of Microbiology* 43, 85–92.
- Altier, C., Suyemoto, M., Ruiz, A.I., Burnham, K.D., Maurer, R., 2000. Characterization of two novel regulatory genes affecting *Salmonella* invasion gene expression. *Molecular Microbiology* 35, 635–646. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.2000.01734.X>
- Bajaj, V., Hwang, C., Lee, C.A., 1995. *hilA* is a novel ompR/toxR family member that activates the expression of *Salmonella* Typhimurium invasion genes. *Mol Microbiol* 18, 715–727. https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.1995.MMI_18040715.X
- Banda, M.M., López, C., Manzo, R., Rico-Pérez, G., García, P., Rosales-Reyes, R., de la Cruz, M.A., Soncini, F.C., García-Del Portillo, F., Bustamante, V.H., 2018. HilD and PhoP independently regulate the expression of *grhDI*, a novel gene required for *Salmonella* Typhimurium invasion of host cells. *Sci Rep* 8, 4841. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23068-0>
- Banda, M.M., Manzo, R., Bustamante, V.H., 2019. HilD induces expression of a novel *Salmonella* Typhimurium invasion factor, YobH, through a regulatory cascade involving SprB. *Sci Rep* 9. <https://doi.org/10.1038/S41598-019-49192-Z>
- Bäumler, A.J., 1997. The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. *Trends in Microbiology* 5, 318–322. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(97\)01082-2](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)01082-2)
- Bäumler, A.J., Tsolis, R.M., Ficht, T.A., Adams, L.G., 1998. Evolution of host adaptation in *Salmonella* enterica. *Infection and Immunity* 66, 4579–4587. <https://doi.org/10.1128/iai.66.10.4579-4587.1998>
- Baxter, M.A., Fahlen, T.F., Wilson, R.L., Jones, B.D., 2003. HilE interacts with HilD and negatively regulates *hilA* transcription and expression of the *Salmonella* enterica serovar Typhimurium invasive phenotype. *Infect Immun* 71, 1295–1305. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.3.1295-1305.2003>
- Becker, C., Neurath, M.F., Wirtz, S., 2015. The Intestinal Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *ILAR J* 56, 192–204. <https://doi.org/10.1093/ILAR/ILV030>
- Berg, B.L., Stewart, V., 1990. Structural Genes for Nitrate-Inducible Formate Dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12, *Genetics*.
- Blasco, F., Pommier, J., Augier, V., Chippaux, M., Giordano, G., 1992. Involvement of the *narJ* or *narX* gene product in the formation of active nitrate reductase in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 6, 221–230. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.1992.TB02003.X>
- Boddicker, J.D., Knosp, B.M., Jones, B.D., 2003. Transcription of the *Salmonella* Invasion Gene Activator, *hilA*, Requires HilD Activation in the Absence of Negative Regulators. *Journal of Bacteriology* 185, 525. <https://doi.org/10.1128/JB.185.2.525-533.2003>
- Bonnefoy, V., Demoss, J.A., 1994. Nitrate reductases in *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66, 47–56. <https://doi.org/10.1007/BF00871632>

- Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R., Swaminathan, B., 2000. Guest Commentary *Salmonella* Nomenclature, *Journal Of Clinical Microbiology*.
- Brosius, J., 1984. Toxicity of an overproduced foreign gene product in *Escherichia coli* and its use in plasmid vectors for the selection of transcription terminators. *Gene*. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(84\)90137-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(84)90137-9)
- Browne, S.H., Hasegawa, P., Okamoto, S., Fierer, J., Guiney, D.G., 2008. Identification of *Salmonella* SPI-2 secretion system components required for SpvB-mediated cytotoxicity in macrophages and virulence in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52, 194–201. <https://doi.org/10.1111/J.1574-695X.2007.00364.X>
- Broz, P., Ohlson, M.B., Monack, D.M., 2012. Gut Microbes Innate immune response to *Salmonella* Typhimurium, a model enteric pathogen. <https://doi.org/10.4161/gmic.19141>
- Bueno, S.M., Riquelme, S., Riedel, C.A., Kalergis, A.M., 2012. Mechanisms used by virulent *Salmonella* to impair dendritic cell function and evade adaptive immunity. *Immunology* 137, 28–36. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2567.2012.03614.X>
- Bustamante, V.H., Martínez, L.C., Santana, F.J., Knodler, L.A., Steele-Mortimer, O., Puente, J.L., 2008. HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 14591–14596. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0801205105>
- Bustamante, V.H., Villalba, M.I., García-Angulo, V.A., Vázquez, A., Martínez, L.C., Jiménez, R., Puente, J.L., 2011. PerC and GrlA independently regulate Ler expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 82, 398–415. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07819.x>
- Callaway, T.R., Edrington, T.S., Anderson, R.C., Byrd, J.A., Nisbet, D.J., 2008. Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. *J Anim Sci* 86. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0457>
- Chattaway, M.A., Langridge, G.C., Wain, J., 2021. *Salmonella* nomenclature in the genomic era: a time for change. *Scientific Reports* 2021 11:1 11, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86243-w>
- Coburn, B., Grassl, G.A., Finlay, B.B., 2007. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunology and Cell Biology* 85, 112–118. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100007>
- Colgan, A.M., Kröger, C., Diard, M., Hardt, W.D., Puente, J.L., Sivasankaran, S.K., Hokamp, K., Hinton, J.C.D., 2016. The Impact of 18 Ancestral and Horizontally-Acquired Regulatory Proteins upon the Transcriptome and sRNA Landscape of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PLoS Genetics* 12, 1–42. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006258>
- Darwin, K.H., Miller, V.L., 1999. InvF is required for expression of genes encoding proteins secreted by the SPI1 type III secretion apparatus in *Salmonella* Typhimurium. *J Bacteriol* 181, 4949–4954. <https://doi.org/10.1128/JB.181.16.4949-4954.1999>
- Doolittle, R.F., Feng, D.F., Tsang, S., Cho, G., Little, E., 1996. Determining divergence times of the major kingdoms of living organisms with a protein clock. *Science* (1979) 271, 470–477. <https://doi.org/10.1126/science.271.5248.470>
- Dorsey, C.W., Laarakker, M.C., Humphries, A.D., Weening, E.H., Bäumlér, A.J., 2005. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. *Molecular Microbiology* 57, 196–211. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2005.04666.X>
- dos Santos, A.M.P., Ferrari, R.G., Conte-Junior, C.A., 2019. Virulence Factors in *Salmonella* Typhimurium: The Sagacity of a Bacterium. *Current Microbiology* 76, 762–773. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1510-4>

- Dufresne, K., Saulnier-Bellemare, J., Daigle, F., 2018. Functional analysis of the chaperone-usher fimbrial gene clusters of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 8, 26. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2018.00026/BIBTEX>
- Edsall, G., Gaines, S., Landy, M., Tigertt, W.D., Sprinz, H., Trapani, R.-J., Mandel, A.D., Benenson, A.S., 1960. Studies On Infection And Immunity In Experimental Typhoid Fever. *Journal of Experimental Medicine* 112, 143–166. <https://doi.org/10.1084/jem.112.1.143>
- Eichelberg, K., Galán, J.E., 1999. Differential Regulation of *Salmonella* Typhimurium Type III Secreted Proteins by Pathogenicity Island 1 (SPI-1)-Encoded Transcriptional Activators InvF and HilA. *Infection and Immunity* 67, 4099. <https://doi.org/10.1128/iai.67.8.4099-4105.1999>
- Ellermeier, C.D., Ellermeier, J.R., Slauch, J.M., 2005. HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator *hilA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology* 57, 691–705. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04737.x>
- Ellermeier, C.D., Slauch, J.M., 2003. RtsA and RtsB Coordinately Regulate Expression of the Invasion and Flagellar Genes in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology* 185, 5096. <https://doi.org/10.1128/JB.185.17.5096-5108.2003>
- Fàbrega, A., Vila, J., 2013. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Skills To Succeed in the Host: Virulence and Regulation. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-12>
- Ferenci, T., Zhou, Z., Betteridge, T., Ren, Y., Liu, Y., Feng, L., Reeves, P.R., Wang, L., 2009. Genomic sequencing reveals regulatory mutations and recombinational events in the widely used MC4100 lineage of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.00118-09>
- Fookes, M., Schroeder, G.N., Langridge, G.C., Blondel, C.J., Mammina, C., Connor, T.R., Seth-Smith, H., Vernikos, G.S., Robinson, K.S., Sanders, M., Petty, N.K., Kingsley, R.A., Bäumlner, A.J., Nuccio, S.-P., Contreras, I., Santiviago, C.A., Maskell, D., Barrow, P., Humphrey, T., Nastasi, A., Roberts, M., Frankel, G., Parkhill, J., Dougan, G., Thomson, N.R., 2011. *Salmonella bongori* Provides Insights into the Evolution of the *Salmonella*. *PLoS Pathogens* 7, e1002191. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002191>
- Foster, J.W., Hall, H.K., 1991. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Bacteriology* 173, 5129–5135. <https://doi.org/10.1128/jb.173.16.5129-5135.1991>
- Galanis, E., Wong, D.M.A.L.F., Patrick, M.E., Binsztein, N., Cieslik, A., Chalermchaikit, T., Aidara-Kane, A., Ellis, A., Angulo, F.J., Wegener, H.C., 2006. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002. *Emerg Infect Dis* 12, 381–388. <https://doi.org/10.3201/EID1205.050854>
- Gal-Mor, O., Finlay, B.B., 2006. Pathogenicity islands: A molecular toolbox for bacterial virulence. *Cellular Microbiology* 8, 1707–1719. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00794.x>
- Gaviria-Cantin, T., el Mouali, Y., le Guyon, S., Römling, U., Balsalobre, C., 2017. Gre factors-mediated control of hilD transcription is essential for the invasion of epithelial cells by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PLoS Pathogens* 13, 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006312>
- Gerlach, R.G., Jäckel, D., Stecher, B., Wagner, C., Lupas, A., Hardt, W.D., Hensel, M., 2007. *Salmonella* Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. *Cellular Microbiology* 9, 1834–1850. <https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2007.00919.X>
- Gewirtz, A.T., Simon, P.O., Schmitt, C.K., Taylor, L.J., Hagedorn, C.H., O'Brien, A.D., Neish, A.S., Madara, J.L., 2001. *Salmonella* Typhimurium translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response. *J Clin Invest* 107, 99–109. <https://doi.org/10.1172/JCI10501>

- Girard, V., Mourez, M., 2006. Adhesion mediated by autotransporters of Gram-negative bacteria: Structural and functional features. *Research in Microbiology*.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.02.001>
- Gordon, M.A., 2008. *Salmonella* infections in immunocompromised adults. *J Infect* 56, 413–422.
<https://doi.org/10.1016/J.JINF.2008.03.012>
- Guiney, D.G., Fang, F.C., Krause, M., Libby, S., 1994. Plasmid-mediated virulence genes in non-typhoid *Salmonella* serovars. *FEMS Microbiol Lett* 124, 1–9. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.1994.TB07253.X>
- Gulig, P.A., Doyle, T.J., 1993. The *Salmonella* Typhimurium virulence plasmid increases the growth rate of salmonellae in mice. *Infect Immun* 61, 504–511. <https://doi.org/10.1128/IAI.61.2.504-511.1993>
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I., Tschäpe, H., 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: Structure, function and impact on microbial evolution. *Molecular Microbiology* 23, 1089–1097. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.3101672.x>
- Hallstrom, K.N., McCormick, B.A., 2014. Pathogenicity Islands: Origins, Structure, and Roles in Bacterial Pathogenesis, *Molecular Medical Microbiology*: Second Edition. Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00016-0>
- Hansen-Wester, I., Hensel, M., 2001. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect* 3, 549–559. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01411-3](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01411-3)
- Hapfelmeier, S., Ehrbar, K., Stecher, B., Barthel, M., Kremer, M., Hardt, W.D., 2004. Role of the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Effector Proteins SipA, SopB, SopE, and SopE2 in *Salmonella enterica* Subspecies 1 Serovar Typhimurium Colitis in Streptomycin-Pretreated Mice. *Infection and Immunity* 72, 795–809. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.2.795-809.2004/ASSET/2FBA6081-65A7-4C0F-806C-FE5066B64F4A/ASSETS/GRAPHIC/ZII0020409410005.JPEG>
- Haraga, A., Ohlson, M.B., Miller, S.I., 2008. *Salmonellae* interplay with host cells. *Nature Reviews Microbiology* 6, 53–66. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1788>
- Hendriksen, R.S., Vieira, A.R., Karlsmose, S., lo Fo Wong, D.M.A., Jensen, A.B., Wegener, H.C., Aarestrup, F.M., 2011. Global Monitoring of *Salmonella* Serovar Distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: Results of Quality Assured Laboratories from 2001 to 2007. <https://home.liebertpub.com/fpd> 8, 887–900.
<https://doi.org/10.1089/FPD.2010.0787>
- Hensel, M., 2004. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *International Journal of Medical Microbiology* 294, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.06.025>
- Hoiseth, S.K., Stocker, B.A., 1981. Aromatic-dependent *Salmonella* Typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291, 238–9. <https://doi.org/10.1038/291238a0>
- Horton, R.A., Wu, G., Speed, K., Kidd, S., Davies, R., Coldham, N.G., Duff, J.P., 2013. Wild birds carry similar *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains to those found in domestic animals and livestock. *Res Vet Sci* 95, 45–48. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2013.02.008>
- House, D., Bishop, A., Parry, C., Dougan, G., Wain, J., 2001. Typhoid fever: pathogenesis and disease. *Curr Opin Infect Dis* 14, 573–8. <https://doi.org/10.1097/00001432-200110000-00011>
- Hueck, C.J., 1998. Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants, *Microbiology And Molecular Biology Reviews*.
- Hurme, R., Berndt, K.D., Normark, S.J., Rhen, M., 1997. A proteinaceous gene regulatory thermometer in *Salmonella*. *Cell* 90, 55–64. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80313-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80313-X)

- Jajere, S.M., 2019. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and adaptation and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Veterinary World*. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.504-521>
- Jin, D.J., Gross, C.A., 1988. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J Mol Biol* 202, 45–58. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90517-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90517-7)
- Jones, B.D., Falkow, S., 1996. Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Annu Rev Immunol* 14, 533–561. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.14.1.533>
- Jones, B.D., Ghori, N., Falkow, S., 1994. *Salmonella* Typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *Journal of Experimental Medicine* 180, 15–23. <https://doi.org/10.1084/JEM.180.1.15>
- Jones, B.D., Lee, C.A., Falkow, S., 1992. Invasion by *Salmonella* Typhimurium is affected by the direction of flagellar rotation. *Infect Immun* 60, 2475–2480. <https://doi.org/10.1128/IAI.60.6.2475-2480.1992>
- Kingsley, R.A., Santos, R.L., Keestra, A.M., Adams, L.G., Bäumlner, A.J., 2002. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA is an outer membrane fibronectin-binding protein that is expressed in the intestine. *Mol Microbiol* 43, 895–905. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.2002.02805.X>
- 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>
- Latasa, C., Roux, A., Toledo-Arana, A., Ghigo, J.M., Gamazo, C., Penadés, J.R., Lasa, I., 2005. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol Microbiol* 58, 1322–1339. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2005.04907.X>
- Li, H., Xu, H., Zhou, Y., Zhang, J., Long, C., Li, S., Chen, S., Zhou, J.M., Shao, F., 2007. The phosphothreonine lyase activity of a bacterial type III effector family. *Science* 315, 1000–1003. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1138960>
- Li, Q., Verma, I.M., 2002. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2, 725–734. <https://doi.org/10.1038/NRI910>
- Liu, X., Matsumura, P., 1995. An alternative sigma factor controls transcription of flagellar class-III operons in *Escherichia coli*: gene sequence, overproduction, purification and characterization. *Gene* 164, 81–84. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00480-T](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00480-T)
- Lopez, C.A., Rivera-Chávez, F., Byndloss, M.X., Bäumlner, A.J., 2015. The periplasmic nitrate reductase NapABC supports luminal growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium during colitis. *Infection and Immunity* 83, 3470–3478. <https://doi.org/10.1128/IAI.00351-15>
- Lopez, C.A., Winter, S.E., Rivera-Chávez, F., Xavier, M.N., Poon, V., Nuccio, S.P., Tsolis, R.M., Bäumlner, A.J., 2012. Phage-mediated acquisition of a type III secreted effector protein boosts growth of *Salmonella* by nitrate respiration. *mBio* 3. https://doi.org/10.1128/MBIO.00143-12/SUPPL_FILE/MBO003121284ST2.PDF
- López, F.E., de las Mercedes Pescaretti, M., Morero, R., Delgado, M.A., 2012. *Salmonella* Typhimurium general virulence factors: A battle of David against Goliath? *Food Research International* 45, 842–851. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2011.08.009>
- Lostroh, C.P., Lee, C.A., 2001. The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microbes and Infection* 3, 1281–1291. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01488-5](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01488-5)

- Lou, L., Zhang, P., Piao, R., Wang, Y., 2019. *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and Its Complex Regulatory Network. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9, 270. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2019.00270/BIBTEX>
- Ly, K.T., Casanova, J.E., 2007. Microreview Mechanisms of *Salmonella* entry into host cells. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00992.x>
- Marcus, S.L., Brumell, J.H., Pfeifer, C.G., Finlay, B.B., 2000. *Salmonella* pathogenicity islands: Big virulence in small packages. *Microbes and Infection* 2, 145–156. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00273-2](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00273-2)
- Martínez, L.C., Banda, M.M., Fernández-Mora, M., Santana, F.J., Bustamante, V.H., 2014. HilD induces expression of *Salmonella* pathogenicity Island 2 genes by displacing the global negative regulator H-NS from *ssrAB*. *Journal of Bacteriology* 196, 3746–3755. <https://doi.org/10.1128/JB.01799-14>
- Martínez, L.C., Martínez-Flores, I., Salgado, H., Fernández-Mora, M., Medina-Rivera, A., Puente, J.L., Collado-Vides, J., Bustamante, V.H., 2014b. In silico identification and experimental characterization of regulatory elements controlling the expression of the *Salmonella csrB* and *csrC* genes. *J Bacteriol* 196, 325–336. <https://doi.org/10.1128/JB.00806-13>
- Martínez, L.C., Yakhnin, H., Camacho, M.I., Georgellis, D., Babitzke, P., Puente, J.L., Bustamante, V.H., 2011. Integration of a complex regulatory cascade involving the SirA/BarA and Csr global regulatory systems that controls expression of the *Salmonella* SPI-1 and SPI-2 virulence regulons through HilD. *Mol Microbiol* 80, 1637–1656. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2011.07674.X>
- Martínez-Flores, I., Pérez-Morales, D., Sánchez-Pérez, M., Paredes, C.C., Collado-Vides, J., Salgado, H., Bustamante, V.H., 2016. In silico clustering of *Salmonella* global gene expression data reveals novel genes co-regulated with the SPI-1 virulence genes through HilD. *Sci Rep* 6, 37858. <https://doi.org/10.1038/srep37858>
- Matsui, H., Bacot, C.M., Garlington, W.A., Doyle, T.J., Roberts, S., Gulig, P.A., 2001. Virulence plasmid-borne *spvB* and *spvC* genes can replace the 90-kilobase plasmid in conferring virulence to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in subcutaneously inoculated mice. *J Bacteriol* 183, 4652–4658. <https://doi.org/10.1128/JB.183.15.4652-4658.2001>
- Mayer, M.P., 1995. A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* 163, 41–46. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00389-N](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00389-N)
- Mazurkiewicz, P., Thomas, J., Thompson, J.A., Liu, M., Arbibe, L., Sansonetti, P., Holden, D.W., 2008. SpvC is a *Salmonella* effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases. *Mol Microbiol* 67, 1371–1383. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2008.06134.X>
- McQuiston, J.R., Fields, P.I., Tauxe, R. v., Logsdon, J.M., 2008. Do *Salmonella* carry spare tyres? *Trends in Microbiology* 16, 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.01.009>
- Mills, D.M., Bajaj, V., Lee, C.A., 1995. A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella* Typhimurium invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Molecular Microbiology* 15, 749–759. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02382.x>
- Müller, A.J., Hoffmann, C., Galle, M., van den Broeke, A., Heikenwalder, M., Falter, L., Misselwitz, B., Kremer, M., Beyaert, R., Hardt, W.D., 2009. The *S. Typhimurium* Effector SopE Induces Caspase-1 Activation in Stromal Cells to Initiate Gut Inflammation. *Cell Host & Microbe* 6, 125–136. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2009.07.007>
- Narm, K.E., Kalafatis, M., Slauch, J.M., 2020. HilD, HilC, and RtsA form homodimers and heterodimers to regulate expression of the *Salmonella* pathogenicity island i type iii secretion

- system. *Journal of Bacteriology* 202. https://doi.org/10.1128/JB.00012-20/SUPPL_FILE/JB.00012-20-S0001.PDF
- Ochman, H., Groisman, E.A., 1996. Distribution of pathogenicity islands in *Salmonella* spp. *Infection and Immunity* 64, 5410–5412. <https://doi.org/10.1128/iai.64.12.5410-5412.1996>
- Ohl, M.E., Miller, S.I., 2001. *Salmonella*: A model for bacterial pathogenesis. *Annual Review of Medicine* 52, 259–274. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.52.1.259>
- Ohnishi, K., Kutsukake, K., Suzuki, H., Lino, T., 1992. A novel transcriptional regulation mechanism in the flagellar regulon of *Salmonella* Typhimurium: an antisigma factor inhibits the activity of the flagellum-specific sigma factor, sigma F. *Mol Microbiol* 6, 3149–3157. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.1992.TB01771.X>
- Olekhovich, I.N., Kadner, R.J., 2007. Role of nucleoid-associated proteins Hha and H-NS in expression of *Salmonella enterica* activators HilD, HilC, and RtsA required for cell invasion. *Journal of Bacteriology* 189, 6882–6890. <https://doi.org/10.1128/JB.00905-07>
- Olekhovich, I.N., Kadner, R.J., 2007b. Role of nucleoid-associated proteins Hha and H-NS in expression of *Salmonella enterica* activators HilD, HilC, and RtsA required for cell invasion. *Journal of Bacteriology* 189, 6882–6890. <https://doi.org/10.1128/JB.00905-07>
- Olekhovich, I.N., Kadner, R.J., 2006. Crucial Roles of Both Flanking Sequences in Silencing of the *hilA* promoter in *Salmonella enterica*. *Journal of Molecular Biology* 357, 373–386. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2006.01.007>
- Paredes-Amaya, C.C., Valdés-García, G., Juárez-González, V.R., Rudiño-Piñera, E., Bustamante, V.H., 2018. The Hcp-like protein HilE inhibits homodimerization and DNA binding of the virulence-associated transcriptional regulator HilD in *Salmonella*. *Journal of Biological Chemistry* 293, 6578–6592. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001421>
- Pérez-Morales, D., Banda, M.M., Chau, N.Y.E., Salgado, H., Martínez-Flores, I., Ibarra, J.A., Ilyas, B., Coombes, B.K., Bustamante, V.H., 2017. The transcriptional regulator SsrB is involved in a molecular switch controlling virulence lifestyles of *Salmonella*. *PLoS Pathogens* 13, 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006497>
- Pérez-Morales, D., Nava-Galeana, J., Rosales-Reyes, R., Teehan, P., Yakhnin, H., Melchy-Pérez, E.I., Rosenstein, Y., de La Cruz, M.A., Babitzke, P., Bustamante, V.H., 2021. An incoherent feedforward loop formed by SirA/BarA, HilE and HilD is involved in controlling the growth cost of virulence factor expression by *Salmonella* Typhimurium. *PLOS Pathogens* 17, e1009630. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1009630>
- Porwollik, S., McClelland, M., 2003. Lateral gene transfer in *Salmonella*. *Microbes and Infection* 5, 977–989. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00186-2](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00186-2)
- Prouty, A.M., Brodsky, I.E., Falkow, S., Gunn, J.S., 2004. Bile-salt-mediated induction of antimicrobial and bile resistance in *Salmonella* Typhimurium. *Microbiology (N Y)* 150, 775–783. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.26769-0/CITE/REFWORKS>
- Punginelli, C., Ize, B., Stanley, N.R., Stewart, V., Sawers, G., Berks, B.C., Palmer, T., 2004. mRNA secondary structure modulates translation of Tat-dependent formate dehydrogenase N. *Journal of Bacteriology* 186, 6311–6315. <https://doi.org/10.1128/JB.186.18.6311-6315.2004>
- Que, F., Wu, S., Huang, R., 2013. *Salmonella* pathogenicity Island 1(SPI-1) at work. *Current Microbiology* 66, 582–587. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0307-8>
- Raffatellu, M., Chessa, D., Wilson, R.P., Tükel, Ç., Akçelik, M., Bäumlner, A.J., 2006. Capsule-mediated immune evasion: A new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infection and Immunity* 74, 19–27. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.19-27.2006>

- Ray, S., Pandey, N.K., Kushwaha, G.S., Das, S., Ganguly, A.K., Vashi, N., Kumar, D., Suar, M., Bhavesh, N.S., 2022. Structural investigation on SPI-6 associated *Salmonella* Typhimurium VirG-like stress protein that promotes pathogen survival in macrophages. *Protein Sci.* <https://doi.org/10.1002/PRO.4272>
- Rehman, T., Yin, L., Latif, M.B., Chen, J., Wang, K., Geng, Y., Huang, X., Abaidullah, M., Guo, H., Ouyang, P., 2019. Adhesive mechanism of different *Salmonella* fimbrial adhesins. *Microbial Pathogenesis* 137, 103748. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2019.103748>
- Rivera-Chávez, F., Winter, S.E., Lopez, C.A., Xavier, M.N., Winter, M.G., Nuccio, S.-P., Russell, J.M., Laughlin, R.C., Lawhon, S.D., Sterzenbach, T., Bevins, C.L., Tsois, R.M., Harshey, R., Adams, L.G., Bäuml, A.J., 2013. *Salmonella* uses energy taxis to benefit from intestinal inflammation. *PLoS Pathog* 9, e1003267. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003267>
- Saini, S., Ellermeier, J.R., Slauch, J.M., Rao, C. v., 2010. The Role of Coupled Positive Feedback in the Expression of the SPII Type Three Secretion System in *Salmonella*. *PLOS Pathogens* 6, e1001025. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1001025>
- Saini, S., Floess, E., Aldridge, C., Brown, J., Aldridge, P.D., Rao, C. v., 2011. Continuous control of flagellar gene expression by the σ^{28} -FlgM regulatory circuit in *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 79, 264–278. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2010.07444.X>
- Saini, S., Rao, C. v., 2010. SprB Is the molecular link between *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) and SPI4. *Journal of Bacteriology* 192, 2459–2462. <https://doi.org/10.1128/JB.00047-10>
- Santos, R.L., Raffatellu, M., Bevins, C.L., Adams, L.G., Tükel, Ç., Tsois, R.M., Bäuml, A.J., 2009. Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. *Trends in Microbiology* 17, 498–506. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2009.08.008>
- Schechter, L.M., Lee, C.A., 2001. AraC/XylS family members, HilC and HilD, directly bind and derepress the *Salmonella* Typhimurium *hilA* promoter. *Molecular Microbiology* 40, 1289–1299. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.2001.02462.X>
- Schmidt, H., Hensel, M., 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 17, 14–56. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.14-56.2004>
- Singer, H.M., Kühne, C., Deditius, J.A., Hughes, K.T., Erhardt, M., 2014. The *Salmonella* Spi-1 virulence regulatory protein HilD directly activates transcription of the flagellar master operon *flhDC*. *Journal of Bacteriology* 196, 1448–1457. <https://doi.org/10.1128/JB.01438-13>
- Stecher, B., Barthel, M., Schlumberger, M.C., Haberli, L., Rabsch, W., Kremer, M., Hardt, W.D., 2008. Motility allows *S. Typhimurium* to benefit from the mucosal defence. *Cellular Microbiology* 10, 1166–1180. <https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2008.01118.X>
- Stecher, B., Hapfelmeier, S., Müller, C., Kremer, M., Stallmach, T., Hardt, W.D., 2004. Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infect Immun* 72, 4138–4150. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.7.4138-4150.2004>
- Stecher, B., Robbiani, R., Walker, A.W., Westendorf, A.M., Barthel, M., Kremer, M., Chaffron, S., Macpherson, A.J., Buer, J., Parkhill, J., Dougan, G., von Mering, C., Hardt, W.D., 2007. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Exploits Inflammation to Compete with the Intestinal Microbiota. *PLoS Biology* 5, 2177–2189. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.0050244>
- Szabó, C., Ischiropoulos, H., Radi, R., 2007. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* 2007 6:8 6, 662–680. <https://doi.org/10.1038/nrd2222>

- Teplitski, M., Al-Agely, A., Ahmer, B.M.M., 2006. Contribution of the SirA regulon to biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology (Reading)* 152, 3411–3424. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.29118-0>
- Teplitski, M., Goodier, R.I., Ahmer, B.M.M., 2003. Pathways Leading from BarA/SirA to Motility and Virulence Gene Expression in *Salmonella*. *Journal of Bacteriology* 185, 7257. <https://doi.org/10.1128/JB.185.24.7257-7265.2003>
- Tezcan-Merdol, D., Nyman, T., Lindberg, U., Haag, F., Koch-Nolte, F., Rhen, M., 2001. Actin is ADP-ribosylated by the *Salmonella enterica* virulence-associated protein SpvB. *Mol Microbiol* 39, 606–619. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.2001.02258.X>
- Valdespino-Díaz, M.A., Rosales-Reyes, R., Cruz, M.A.D. la, Bustamante, V.H., 2022. Regulatory Evolution of the *phoH* Ancestral Gene in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology* 204. <https://doi.org/10.1128/JB.00585-21>
- Wagenaar, J.A., Hendriksen, R.S., Carrique-Mas, J., 2013. Practical considerations of surveillance of *Salmonella* serovars other than Enteritidis and Typhimurium. *OIE Revue Scientifique et Technique* 32, 509–519. <https://doi.org/10.20506/RST.32.2.2244>
- Wallis, T.S., Galyov, E.E., 2000. MicroReview Molecular basis of *Salmonella* -induced enteritis 36.
- Wang, H., Gunsalus, R.P., 2003. Coordinate Regulation of the *Escherichia coli* Formate Dehydrogenase *fdnGHI* and *fdhF* Genes in Response to Nitrate, Nitrite, and Formate: Roles for NarL and NarP. *Journal of Bacteriology* 185, 5076–5085. <https://doi.org/10.1128/JB.185.17.5076-5085.2003>
- Wang, H., Tseng, C.-P., Gunsalus, R.P., 1999. The *napF* and *narG* Nitrate Reductase Operons in *Escherichia coli* Are Differentially Expressed in Response to Submicromolar Concentrations of Nitrate but Not Nitrite. *Journal of Bacteriology* 181, 5303–5308. <https://doi.org/10.1128/JB.181.17.5303-5308.1999>
- Yanagihara, S., Iyoda, S., Ohnishi, K., Iino, T., Kutsukake, K., 1999. Structure and transcriptional control of the flagellar master operon of *Salmonella* Typhimurium. *Genes Genet Syst* 74, 105–111. <https://doi.org/10.1266/GGS.74.105>

Cuernavaca, Morelos a 13 de septiembre de 2022

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **Jelsy Galilea Arellano Hernández**, con el título del trabajo: **Adaptación de la regulación del gen ancestral *fdnG* de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mediada por H1D.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis Profesional por Etapas como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: DRA. MARÍA LUISA CASTREJÓN GODÍNEZ

SECRETARIO: DRA. VERONICA OBREGON BARBOZA

VOCAL: M. C. MARCOS ANTONIO VALDESPINO DÍAZ

SUPLENTE: DR. VICTOR HUMBERTO BUSTAMANTE

SANTILLAN

SUPLENTE: DRA. MARÍA LUISA BARROSO GARCÍA

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

VICTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLAN | Fecha:2022-09-14 14:28:45 | Firmante

PhwFmiolyx+Q44xp0FdrSIBCuWpICNIBTijAORofcgd0D+q5shvdOw8WN9r3jXsqg7h6prJHZujW17Krlh+5OFzoxawf5CFM40SdQRJWPW2tyYrKnn37SPjLPQe/ROij9DV7UJORB
KprDnSkvMDSfjM1ChY0I7AX7Bb2jKvce0N6OtdnOqcwHRqc4lpsYE/OZjaf/EnltGzpfk5lkrTv+OejzGjrtqYM1jbnVppwSbbnqWpi4gi44mai262L1h2N8K20t02HHu9nGaVak79jVrg
qM19sI7QRlKX8B39JcLE2I+/Bd2EPE975cMp4uHTF8hnF18hs2dgV+h6u2qFqw==

MARIA LUISA CASTREJON GODINEZ | Fecha:2022-09-14 15:50:22 | Firmante

kUeA/0xv5NsdAbr2HPOOtJCqaOfkwidwnNLafIZwdyoKkUAVWnDxmWfa1DiLu5g2tOfY9/XI/G9S1pqDKWmf7+Q/Emve/dkvVYMcMdy1ofjFXL8Etjfk0tyok627frP8MdT2lssFpgg
h/MHphewWkFt33hxZgOxXu00RYeey5llgUcdYWKjix9jH3ZJRpuPZ8Aq8q/jkrOrDQ3ucAGthibw0GLhWE7x33n7vHbEcpPOZfnUNqwg/7MpQ9/gMmiWBvRD4Cl1P4mPcALVp
BbBhephGPzCs+2bLwDhRqpl0MSclcyopuc5JbAFM7/yRoZD6Gem7Jxw00Kmt60bNw==

MARCOS ANTONIO VALDESPINO DÍAZ | Fecha:2022-09-15 12:20:11 | Firmante

ZzmxJ5tSyFnBkPBov9VpO8VF7FrjhpPS82Bg68DfKQ7fJt8bOtXtk+/#EGr9DAmSxoFGd7fXW7d5vd3umsR1/SX025d+3HqndT+V07ZNVzqdK/VX+yw+ByBmt688nYmmYafJcp9u
rDhnV6laHSChFo+5lCfblMZymFuT4KUg5mVsSM3DamLR09yqluP9kWmbbxtHkG3+7H05RcmTW7H3T0oM8uO8vkHxa3eEMMGronQxEDE0E1ksPPRS/9BfaOWY07lefFkwaDI6
qx4Cd/kVfDqDZ5S9+bqqLVDQBNtgYjp6/RzjWpJHREU3I2CHY1HYJPo049N+ZlVsbZiHeUg==

VERONICA OBREGON BARBOZA | Fecha:2022-09-19 10:43:44 | Firmante

vmMlcT305WPrf8QnbaWRnprGwG35qdBHPTmi8CxbwgUnF2/33IW13mHbFEmDMS4tpC6ylkpsZKgFcRfEkmHtQNUwJUNwNafJcYXqCjbUbdFuR2z5lZKskSBe2N7vocTSVw+
4cEhkp/EmebrZTpZQ3wPBsTCRMWVG3Hk+SIK5VhfdZa7LcTFmfZgh1kxkbcznWTGW1tOt3UU4mOc83BeV5dpzNK9luND6Er9IEf2u3GJ66zaw5JVD89u0jeobV/8HZlpEKsBZIEpK
WdBqIHZDKU4iv8lM76XNo+U8zKELMgXai3sb07BI9+I6Bf01EKWGrkjLwkEe8Z+oYHmB+jKQAw==