



Universidad de Concepción
Facultad Farmacia

EVALUACIÓN FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA Sap DE *Shigella flexneri* 2a EN EL TRÁFICO INTRACELULAR

POR ARIANNE SALOMÉ RAMÍREZ MARÍN

Tesis presentada en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al título profesional de Bioquímica

Profesor guía/patrocinante:

Dr. Ángel Alejandro Oñate Contreras
Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Marzo, 2022
Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi profunda gratitud al profesor Ángel Oñate por aceptar ser mi tutor en esta ardua tarea y a mis compañeros de laboratorio por su cálido recibimiento, apoyo y alegría durante este trabajo de tesis.

Al concluir esta etapa de mi vida, quiero extender un profundo agradecimiento a mis padres, quienes me dieron la oportunidad de estudiar y confiaron en mí en todo momento. Gracias por todo el amor que siempre me han entregado. También agradecer a mi hermano, por su constante apoyo en todas mis metas y logros. A mi hermana por sus consejos y paciencia infinita; y a su eterno compañero Hugo por siempre sacarme una sonrisa. A mis amigos de Calama, por su amistad incondicional a pesar de la distancia. A mi grupo de amigos de la universidad y seres queridos que caminaron junto a mí en esta larga etapa, donde vivimos momentos que siempre atesoraré, a ellos gracias por tanto cariño, apoyo y comprensión.

Por último, un especial agradecimiento a mi incansable compañera de estudios y desvelos, Mara, sin la cual no sería posible este trabajo y a mi Jade, por ser fuente de inspiración y fortaleza en mi vida.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	v
ÍNDICE DE TABLAS	vi
RESUMEN.....	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Enfermedades Entéricas	1
1.2. Shigelosis	3
1.3. Manifestaciones clínicas de la Shigelosis	3
1.4. Tratamiento.....	4
1.5. Especies del género <i>Shigella</i>	5
1.6. Epidemiología	6
1.7. Mecanismos de virulencia y patogénesis inducida por <i>Shigella</i>	7
1.8. Tráfico intracelular de <i>Shigella</i>	12
1.9. Islas de patogenicidad en <i>Shigella</i>	15
1.10. Autotransportadores	18
2. HIPÓTESIS.....	22
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo general:.....	23
3.2. Objetivos específicos:.....	23
4. METODOLOGÍA.....	24
4.1. Objetivo 1: Analizar la participación de la proteína Sap en la adhesión de <i>Shigella flexneri</i> 2a a células macrofágicas no profesionales.	24
4.1.1. Cepas bacterianas y cultivos	24
4.1.2. Expresión de proteína verde fluorescente (GFP) en cepas <i>S.flexneri</i> 2457T, <i>S.flexneri</i> Δsap y <i>S.flexneri</i> $\Delta sap:sap$	25
4.1.3. Ensayo de adhesión bacteriana.....	26
4.2. Objetivo 2: Evaluar el rol de la proteína Sap en la proliferación y sobrevivencia intracelular de <i>Shigella flexneri</i> 2a en células macrofágicas profesionales y no profesionales.	27
4.2.1. Ensayo de infección.....	27

4.3. Objetivo 3: Determinar la relación de la proteína Sap en el escape de <i>Shigella flexneri</i> 2a de la vía endocítica de células macrofágicas profesionales mediante ensayos de colocalización.....	28
4.3.1. Ensayo de tráfico intracelular.....	28
4.3.2. Ensayo de colocalización	29
4.3.3. Análisis estadístico	30
5. PLAN DE TRABAJO	31
6. TRABAJO EN PROGRESO	32
7. RECURSOS DISPONIBLES	37
8. JUSTIFICACIÓN DE RECURSOS SOLICITADOS	39
8.1. Personal técnico y/o de apoyo.....	39
8.2. Gastos de operación.....	39
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Construcción de la cepa mutante de *Shigella flexneri* 2457T 2a para el dominio pasajero del gen *sap* mediante intercambio alélico. pag. 32

Figura 2. Curvas de crecimiento de cepas de *Shigella flexneri* 2457T y mutante Δsap en presencia y ausencia de sales biliares. pag. 33

Figura 3. Transformación de *Shigella flexneri* 2457T y mutante Δsap con plásmido pAKgfp 1. pag. 35

Figura 4. Análisis confocal de células RAW 264.7 infectadas con *Shigella flexneri* 2457T. pag. 36

ÍNDICE DE TABLAS

8-1. Personal.	pag. 39
8-2. Gastos de operación general.	pag. 39

RESUMEN

Shigella spp. representa un problema de salud pública, especialmente en países en vías de desarrollo. Esta bacteria es capaz de invadir las células del epitelio colónico e inducir una fuerte respuesta pro-inflamatoria. *Shigella* es capaz de secuestrar y explotar el sistema de tráfico intracelular de macrófagos y células epiteliales, evadiendo la posterior destrucción fagocítica y estableciendo un nicho de seguridad para su supervivencia y proliferación. Estos procesos dependen de un subconjunto de factores de virulencia que se encuentran codificados dentro de Islas de patogenicidad propias de la bacteria. Dentro de estas, destaca la isla *she*, que contiene un marco de lectura abierto (ORF) denominado *sap*, el cual aún no ha sido caracterizado. Esta región tiene alrededor de un 87% de similitud con el antígeno 43 expresado en *Escherichia coli*, el cual está implicado en la virulencia de la bacteria. Ante esta evidencia, el objetivo de este trabajo es determinar si el ORF que codifica para la proteína Sap está implicado en el proceso de adhesión, tráfico intracelular y sobrevivencia de *Shigella flexneri*. Para comprobar su rol, se realizarán ensayos de infección, colocalización y adhesión utilizando una cepa bacteriana de *Shigella flexneri* 2a, una cepa mutante para la proteína Sap y una cepa complementaria. Se espera comprobar que la proteína Sap permite la evasión de la vía endocítica en células macrofágicas, interfiriendo en el tráfico intracelular para establecer un nicho replicativo y su rol en el proceso de adhesión bacteriana.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedades Entéricas

Las enfermedades entéricas causadas por patógenos bacterianos, virales o parasitarios son un importante problema de salud pública. La mayoría de los cuadros entéricos infecciosos ocurren en países en vías de desarrollo, donde la falta de higiene y el acceso limitado al agua potable promueven la propagación de estas enfermedades. Además, la desnutrición y la falta de una intervención médica adecuada contribuyen a la alta tasa de mortalidad, especialmente en infantes y niños, provocando alrededor de 525.000 muertes de niños cada año, a pesar de ser una enfermedad prevenible y tratable (Schroeder y Hilbi, 2008; WHO, 2017). A nivel mundial, las muertes por enfermedades diarreicas han disminuido sustancialmente en la última década, asociadas a una reducción en las tasas de muerte en lugar de una reducción en el número de contagios (Troeger *et al.*, 2018). Se especula que esta disminución de muertes se debe a ciertas intervenciones, como por ejemplo, mejoras en el agua potable y saneamientos, la administración de tratamientos adecuados y una mejora en la nutrición (Troeger *et al.*, 2018; Bardhan *et al.*, 2010).

A pesar de la disminución de los casos de muerte, según el último reporte de la organización de Estudios de la Carga Global de la Enfermedad (GBD, *Global Burden of Disease Study*), la diarrea fue la octava causa de muerte a nivel mundial entre todas las edades (GBD 2017 Causes of Death

Collaborators, 2018). De estos episodios de diarrea, los patógenos bacterianos identificados con mayor frecuencia corresponden a: *Escherichia coli* (más común en todo el mundo), *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* (más común en niños), *Yersinia* y *Clostridium* (Akhondi y Simonsen, 2019). La bacteria del género *Shigella*, causa alrededor de 164,7 millones de episodios de diarrea al año a nivel mundial, atribuyéndose alrededor de 1,1 millones de muertes en todo el mundo (Sureshbabu y Venugopalan, 2019), donde un gran porcentaje se asocia con niños menores de 5 años (12,9%) y adultos mayores de 70 años (10.7%) (Troeger *et al.*, 2018). La mayoría de las muertes ocurren en el sur de Asia y África subsahariana, en donde *Shigella*, junto con *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ETEC), se identificaron como los patógenos bacterianos diarreicos predominantes en las poblaciones pediátricas de estos continentes (Kotloff *et al.*, 2019; Levine *et al.*, 2020). Además, estudios de diagnóstico molecular cuantitativos sugieren que la carga inducida por *Shigella* en realidad puede ser el doble de lo que se había estimado anteriormente con otros métodos, clasificándolo como el patógeno más común detectado en muestras de diarrea en niños (Liu *et al.*, 2016). Por lo tanto, *Shigella* es uno de los principales contribuyentes a la carga mundial de diarrea y posiblemente, dada la gravedad de la enfermedad asociada y la creciente resistencia a los antimicrobianos, sea una de las principales causas bacteriana de diarrea endémica sostenida (Baker y The, 2018).

1.2. Shigelosis

La Shigelosis, también llamada disentería bacilar, es una infección causada por bacterias del género *Shigella*. Su principal vía de transmisión es por la ruta fecal-oral, aunque también posee otros mecanismos de transmisión a través del contacto físico directo entre personas y de forma indirecta como resultado del contacto con agua y alimentos contaminados, donde los alimentos pueden incluso encontrarse contaminados por moscas que transportan estos microorganismos (Farag *et al.*, 2013; Kotloff *et al.*, 2018). La transmisión puede ocurrir desde un paciente sintomático o de un portador durante su período asintomático, y se requiere una baja dosis infectiva (ingerir de 10 a 100 microorganismos) para producir la infección (DuPont *et al.*, 1989). Esta enfermedad se presenta con mayor frecuencia en instituciones como escuelas, clubes, geriátricos y hogares con niños, donde se ve aumentada la probabilidad de contaminación fecal (Kotloff *et al.*, 2018; Sureshbabu *et al.*, 2018). El principal modo de control de la *Shigelosis* es la prevención mediante el uso de agua potable, un adecuado sistema de saneamiento, y buenas prácticas de higiene personal y durante la manipulación de alimentos (Sureshbabu *et al.*, 2018).

1.3. Manifestaciones clínicas de la Shigelosis

Al infectar a su hospedero, *Shigella* es capaz de producir una inflamación intestinal aguda, al invadir y replicarse en las células de la mucosa de la porción distal del intestino delgado e intestino grueso (Sansonetti, 2004). La

infección por *Shigella* causa el síndrome clínico conocido como disentería, cuyos principales síntomas son: la diarrea con defecación frecuente de poco volumen, sanguinolenta y mucopurulenta, fiebre, dolor abdominal cólico, tenesmo, náuseas y vómitos (Barrett-Connor y Connor, 1970). Los síntomas duran alrededor de 5 a 7 días, pero en algunas personas pueden durar hasta 4 semanas o más (Barrett-Connor y Connor, 1970). El cuadro es autolimitado, sin embargo, puede haber riesgo vital en pacientes inmunocomprometidos o que no reciban el tratamiento adecuado, desarrollando complicaciones secundarias como septicemia, neumonía, síndrome urémico hemolítico e incluso algunos pacientes sufren de artritis crónica años después del episodio de Shigelosis (Bennish, 1991; Ajene et al., 2013)

1.4. Tratamiento

La organización mundial de la salud (OMS) recomienda para el tratamiento contra la Shigelosis, en primer lugar, la rehidratación con una solución salina de rehidratación oral (SRO) para reponer el agua y los electrolitos perdidos en las heces y rehidratación con fluidos intravenosos en caso de deshidratación severa (WHO, 2017; Ofei y Fuchs, 2019). También se recomienda el uso de complementos de Zinc, que reducen la duración y volumen de las heces (Laghari et al., 2019) y el consumo de alimentos ricos en nutrientes tan pronto como se controle el cuadro de deshidratación (WHO, 2017; Akhondi y Simonsen, 2019). Además, es necesario el uso de un tratamiento antibiótico efectivo para reducir el riesgo de propagación de la infección, para ello la OMS

recomienda la ciprofloxacina como primera línea para el tratamiento de adultos y niños con disentería y como segunda opción la azitromicina, la cefixima y la ceftriaxona (WHO, 2017). También se sugiere trimetoprim-sulfametoxazol como otra segunda opción; sin embargo, existe una creciente resistencia a esta combinación de fármacos y a otros que se consideraban eficaces (p. ej., ampicilina, ácido nalidíxico y pivmecilinam) (Kotloff *et al.*, 2018; Puzari *et al.*, 2018; Nisa *et al.*, 2020)

1.5. Especies del género *Shigella*

El agente etiológico de la Shigelosis es una bacteria gram negativa bacilar, inmóvil, anaerobio facultativo, no capsulado, perteneciente al género *Shigella* de la familia *Enterobacteriaceae*, cuyo único reservorio natural conocido es el ser humano (Kotloff *et al.*, 2018). Este género posee cuatro especies, cada una con antígenos somáticos específicos que permiten reconocer diferentes serotipos: *S. dysenteriae* (serogrupo A con 15 serotipos), *S. flexneri* (serogrupo B con 19 serotipos incluyendo subtipos), *S. boydii* (serogrupo C con 19 serotipos) y *S. sonnei* (serogrupo D con 1 serotipo). *S. dysenteriae* serotipo 1, también llamado bacillus Shiga, es reconocido como el mayor causante de disentería epidémica, produciendo infecciones severas y mortales (WHO, 2005; Muthuirulandi Sethuvel *et al.*, 2017; Halimeh *et al.*, 2021).

1.6. Epidemiología

La epidemiología de *Shigella* varía según la especie, *S. dysenteriae* tipo 1 es el serotipo más virulento al presentar genes que codifican la producción de una potente citotoxina, llamada Toxina Shiga (WHO, 2005). Este serotipo se presenta con mayor frecuencia en países de bajos ingresos y condiciones de higiene inadecuada, asociándose a brotes epidémicos con una alta tasa de ataque y mortalidad (Halimeh *et al.*, 2021). Por otro lado, las cepas de *S. flexneri* son la principal causa de Shigelosis endémica en países en vías de desarrollo, en tanto que *S. sonnei* prevalece en países desarrollados (Kotloff *et al.*, 2018), mientras que *S. boydii* es una especie relativamente poco común, presente principalmente en el subcontinente Indio (Kotloff *et al.*, 2019).

En Chile, las especies más prevalentes también son *S. flexneri* y *S. sonnei*, constituyendo más del 80% de las cepas de *Shigella* aisladas, con una proporción similar entre ambas, predominando *S. sonnei* cada 2 o 3 años (Carrasco *et al.*, 2000). En el caso de *S. flexneri*, los serotipos más frecuentes son 2a, 3b y 1b (ISP, 2016). Es importante destacar que en el último informe emitido por el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), desde el año 2014 al 2018, el mayor número de cepas confirmadas (n= 621) se registraron el año 2018, casi duplicando el número de cepas registradas el año 2017 (n= 317), además se observó el predominio de cepas confirmadas de *S. flexneri* con un 58,7% seguida de *S. sonnei* con un 37,5% durante el período de estudio. Sin embargo, el año 2018 el número de cepas confirmadas de *S. sonnei* (n= 295) fue similar al de *S. flexneri* (n=289). Por otro lado, tanto las especies de *S.*

sonnei y *S. flexneri* analizadas, registraron mayor resistencia antibiótica a ampicilina, cloranfenicol y trimetoprim sulfametoxazol (ISP, 2019).

Las especies de *Shigella* son muy sensibles a fluctuaciones de temperatura y condiciones ambientales desfavorables. Sin embargo, son tolerantes a pH bajos, por lo que unas pocas bacterias pueden tolerar la acidez del estómago y colonizar el tracto digestivo (Gorden y Small, 1993). Esta característica, sumada a que son infectivas a bajas dosis, contribuye a su patogenicidad.

1.7. Mecanismos de virulencia y patogénesis inducida por *Shigella*

Shigella spp. es un patógeno capaz de invadir y colonizar el epitelio intestinal, accediendo a la mucosa gástrica, que actúa como una barrera física y funcional para proteger el cuerpo contra la invasión de bacterias comensales y patógenas (Sansonetti, 2004). Las bacterias de este género invaden diferentes células del hospedero, como macrófagos, células dendríticas y células epiteliales, desencadenando respuestas inflamatorias severas en el tejido intestinal (Suzuki *et al.*, 2005), involucrando una gran variedad de endotoxinas, citoquinas proinflamatorias y necrosis del epitelio colónico.

Como mecanismo central, *Shigella* utiliza una variedad de proteínas efectoras, o también llamadas proteínas de virulencia, las que se relacionan con la patogénesis de la enfermedad (Kotloff *et al.*, 2018). El componente central de la infección por *Shigella* es la expresión del sistema de secreción tipo III (T3SS), que corresponde a una estructura tipo aguja que permite a la bacteria traslocar un conjunto de aproximadamente 25 proteínas desde el citoplasma bacteriano

a la célula hospedera. Estas proteínas efectoras interfieren en múltiples procesos de la célula hospedera, jugando un rol central en la invasión celular, la multiplicación de la bacteria y la modulación de las funciones celulares e inmunes del huésped (Parsot, 2009; Ashida *et al.*, 2011; Kotloff *et al.*, 2018).

En un comienzo, *Shigella* infecta a su hospedero por la vía oral, siendo capaz de sobrevivir al ambiente ácido y la microbiota intestinal competitiva del estómago. Durante el proceso de infección, *Shigella* expresa enterotoxinas que inducen la secreción de fluidos en el yeyuno y favorecen la infección del colon. La enterotoxina 1 de *Shigella* (ShET1), presente en *S. flexneri* 2a, se relaciona con dicha acumulación de líquido intestinal, mientras que la enterotoxina 2 de *Shigella* (ShET2), presente en todas las cepas y serotipos de *Shigella* (Faherty *et al.*, 2012), requiere la activación de T3SS para inducir la acumulación de fluido, por lo que se activa en fases posteriores de infección. Cuando la bacteria alcanza el íleon terminal y el colon, inicia su proceso infeccioso provocando la desestabilización e inflamación de la barrera epitelial (Jennison y Verma, 2004). En este contexto, se ha reportado la expresión de proteínas autotransportadoras serin-proteasa de Enterobacterias (SPATE) relevantes en el proceso de infección intestinal, tales como las enzimas Pic y SigA producidas por *S. flexneri* 2a, las que actúan, respectivamente, degradando la mucosa epitelial para favorecer el proceso infeccioso y desestabilizando la barrera epitelial a través de su actividad citopática (Gutierrez-Jimenez *et al.*, 2008; Al-Hasani *et al.*, 2009)

La invasión de *Shigella* se da preferentemente por las células M que recubren el epitelio asociado al folículo de las placas de Peyer en el intestino. Las células M son células epiteliales especializadas (CE), capaces de trasladar antígenos desde el lumen intestinal, para luego exponerlos al tejido linfoide asociado al intestino, favoreciendo así el inicio de la respuesta inmune (Man *et al.*, 2004). La transcitosis de las células M se inicia de manera activa por la bacteria (Sansonetti *et al.*, 1996), presumiblemente a través de receptores específicos para ligandos de *Shigella*. El tránsito de la bacteria no induce la lisis de la vacuola endocítica en las células M, si no que se libera directamente al espacio intercelular (Sansonetti *et al.*, 1996).

Posterior a la traslocación, *Shigella* es endocitada por macrófagos residentes y células dendríticas, los que reciben y fagocitan a la bacteria para su posterior eliminación. Sin embargo, *Shigella* tiene la capacidad de lisar el compartimiento fagosómico de manera dependiente de T3SS, para posteriormente escapar de las células y diseminarse en el citoplasma, donde inicia su multiplicación (High *et al.*, 1992). En macrófagos, el efector bacteriano IpaB, secretado por T3SS, se une a la caspasa-1 para inducir la maduración y liberación de IL-1 β , provocando la muerte celular por piroptosis, induciendo la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (Zychlinsky *et al.* 1994). De igual manera, *Shigella* induce la producción de IL-8 de manera dependiente de T3SS, provocando la migración de leucocitos polimorfonucleares (PMN) que desestabilizan la barrera epitelial, inducen inflamación y favorecen la traslocación bacteriana, a través de la fosforilación de las vías MAPK por acción de los efectores OspB, presente en

las 4 especies de *Shigella* (Ambrosi *et al.*, 2015), y de OspZ y OspC presentes en *S. flexneri* (Zurawski *et al.*, 2006; Zurawski *et al.*, 2008).

Una vez que *Shigella* es liberada, se da inicio al proceso de invasión de enterocitos contiguos a través de la membrana basolateral del epitelio. A pesar de no contar con factores de adhesión clásicos, se ha reportado que la proteína de membrana lcsA, presente en *Shigella*, favorece el proceso de adhesión e interacción con la célula huésped al ser activada por sales biliares presentes en el colon (Brotcke Zumsteg *et al.*, 2014). De manera similar, se ha reportado que las sales biliares promueven el ensamblaje de T3SS e inducen la secreción de los efectores OspE1 y OspE2, los que aumentan la capacidad de adhesión de la bacteria (Stensrud *et al.*, 2008; Faherty *et al.*, 2012). Esta activación de T3SS es fundamental para la captación de la bacteria por parte de las células epiteliales, puesto que el proceso inicia con la interacción de la proteína IpaB, parte del complejo de aguja de T3SS, con la glicoproteína de superficie celular CD44 para mantener la unión con la célula huésped (Skoudy *et al.*, 2000). Dicha interacción provoca la activación de la proteína de punta de aguja IpaD y el reclutamiento de la invasina IpaC, que en conjunto con IpaB forman el poro traslocón que permite el acoplamiento del T3SS y la posterior secreción de proteínas de virulencia al citosol de la célula huésped (Russo *et al.*, 2016). IpaC también corresponde a uno de los primeros efectores que acceden a la célula epitelial, induciendo la polimerización de la actina, provocando ondulaciones en la membrana celular y focos de entrada para la bacteria (Mounier *et al.*, 2009). De manera conjunta, el efector IpaA de *Shigella* actúa facilitando la

despolimerización de la actina para evitar una polimerización descontrolada por la acción de IpaC (Bourdet-Sicard *et al.*, 1999). Durante este proceso de remodelación del citoesqueleto celular se forman filopodios y lamelipodios que capturan y absorben a la bacteria.

Posterior a la internalización de la bacteria, *Shigella* produce la lisis de la vacuola de entrada, escapando al citoplasma de la célula. Luego, se multiplica en el citoplasma y logra movilizarse al inducir polimerización de actina en un polo de la bacteria, permitiéndole diseminarse intra e intercelularmente (Ray *et al.*, 2009; Du *et al.*, 2016). La multiplicación de *Shigella* dentro de las células epiteliales provoca una fuerte respuesta inflamatoria. El sistema de vigilancia intracelular mediado por Nod1 detecta los fragmentos de peptidoglicanos bacterianos liberados por la bacteria y activa el factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B), estimulando cascadas de señalización inflamatorias, liberando citoquinas como IL-1 e IL-18, e induciendo la respuesta inmune celular y humoral. Los PMN infiltrados destruyen la integridad del revestimiento epitelial, permitiendo así que más bacterias lumbinales alcancen la submucosa sin la necesidad de células M (Schroeder y Hilbi, 2008). En consecuencia, la destrucción de macrófagos, la destrucción de la barrera epitelial y la afluencia masiva de PMN exacerban la infección bacteriana y la lesión tisular. Finalmente, esto resulta en una absorción deficiente de agua, nutrientes y solutos, que pueden causar la diarrea acuosa, así como la sangre y la mucosidad en las heces características de la Shigelosis (Suzuki *et al.*, 2005; Schroeder y Hilbi, 2008).

1.8. Tráfico intracelular de *Shigella*

El tráfico intracelular de membranas y proteínas es esencial para el mantenimiento de la homeostasis epitelial y en su función de barrera, actuando como uno de los principales sistema de defensa del huésped contra los patógenos bacterianos. Los procesos de exocitosis, endocitosis, fagocitosis y la secreción de citoquinas desempeñan funciones esenciales en esta defensa, promoviendo la eliminación de invasores. Sin embargo, muchos patógenos bacterianos intracelulares, como *Shigella*, *Salmonella* y *Legionella*, secuestran y explotan el sistema de tráfico intracelular para ingresar a las células huésped, evadir la posterior destrucción fagocítica y establecer un nicho de seguridad para su supervivencia y proliferación (Le-Barillec *et al.*, 2005; Schroeder y Hilbi, 2008; Ashida *et al.*, 2015)

Esta capacidad de sobrevida intracelular es crucial para estas bacterias patógenas luego de invadir sus células eucariotas diana. Después de la entrada, mediante un mecanismo de activación o un mecanismo de cremallera, las bacterias se internalizan dentro de una vacuola unida a la membrana que se deriva de la membrana plasmática del huésped. En circunstancias normales, la vacuola contenedora se acidifica progresivamente a medida que se convierte en un fagolisosoma degradante maduro (Haas, 2007), en un proceso rápido, que se reporta a los 15 minutos de su formación (Yates *et al.*, 2005). Esta vacuola se caracteriza por contener compuestos microbicidas capaces de eliminar a las bacterias (Haas, 2007). En función de esto, los patógenos intracelulares han desarrollado diversos mecanismos para evitar la

degradación. Algunos patógenos sobreviven en este nicho, ya sea evitando la fusión vacuola-lisosoma (Ej: *M.tuberculosis*), o modificando el entorno dentro del fagolisosoma (Ej: *Salmonella*). Por el contrario, otras bacterias han evolucionado para escapar de la vacuola y continuar su ciclo de vida dentro del citosol (Ej: *Shigella*) (Sansonetti, 2001; Cossart y Sansonetti, 2004; Schroeder y Hilbi, 2008).

Como se describió anteriormente, *Shigella* spp. pertenece al grupo de bacterias citosólicas. Su mecanismo de infección, dependiente de la inyección de los efectores mediados por T3SS, deriva en la alteración del tráfico intracelular de la célula diana, permitiendo a la bacteria invadir y subvertir las funciones celulares e inmunes del huésped. Para lograr esto, *Shigella* produce una rápida desestabilización de la vacuola contenedora, según estudios en tiempo real que describen la producción de daños a menos de 10 minutos de infección (Ray *et al.*, 2010; Paz *et al.*, 2010). También, se ha reportado que dentro de los primeros 30 minutos post infección, un número cercano a la mitad de los macrófagos infectados con *Shigella* ha sufrido la ruptura de la vacuola contenedora (Senerovic *et al.* 2012). Los principales determinantes involucrados en este proceso son IpaB e IpaC, que actúan promoviendo la formación de agujeros que inducen la ruptura de la vacuola (Du *et al.*, 2016). De igual manera, se ha reportado que el efector IpgD, una fosfatasa que también está involucrada en el proceso de internalización, actúa reclutando endosomas de reciclaje pertenecientes a la célula, los que promueven el escape de la vacuola por mecanismos aún desconocidos (Mellouk *et al.*, 2014).

Una vez se ha traslocado al citoplasma de la célula, *Shigella* debe adaptarse a un microambiente limitado en nutrientes, tales como fuentes de carbono, hierro y también oxígeno. Estudios transcripcionales revelan que, en este contexto, *Shigella* aumenta la expresión de genes relacionados con la adquisición de hierro, expresando sideróforos y sistemas de transporte de hierro férrico y ferroso para promover la captura de este metabolito (Lucchini *et al.*, 2005; Payne *et al.*, 2006). De manera similar, análisis proteómicos de *S. flexneri* revelaron que, en ambientes intracelulares, son necesarias la fermentación ácida mixta y el metabolismo del piruvato para las rutas biosintéticas y el crecimiento de la bacteria (Pieper *et al.*, 2013). *Shigella* también es capaz de evadir los mecanismos defensivos de la célula hospedadora, contrarrestando la captura por parte de la maquinaria autofágica a través de diversos efectores: (i) La proteasa IcsP de *Shigella* actúa desprendiendo el componente 3 del complemento, el cual reviste a la bacteria antes de su internalización, marcándola para su eliminación por este mecanismo (Sorbara *et al.*, 2018); (ii) La bacteria también escapa del reclutamiento de marcadores autofágicos mediante el efecto de IcsB, que actúa interaccionando con otras proteínas de *Shigella*, evitando así su reconocimiento y posterior eliminación por autofagosomas (Ogawa *et al.*, 2005); y (iii) Durante el proceso de replicación en el citosol, *Shigella* también es capaz de contrarrestar la formación de autofagosomas al interrumpir el tráfico intracelular entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi a través de la actividad de la proteasa VirA, que induce la acción de la GTPasa Rab1, inactivando de esta manera a Rab1,

cuya principal función es dirigir el tránsito entre dichos organelos (Dong *et al.*, 2012).

Una vez establecida en el citosol, *Shigella* utiliza un mecanismo de motilidad basada en actina (ABM), que consiste en la polimerización de la actina desde un polo de la bacteria, formando la llamada “cola de cometa de actina”, en un proceso mediado por el efector IcsA (Stevens *et al.*, 2006). Esto le permite impulsarse a través del citoplasma intra e intercelularmente, para finalmente propagarse célula a célula, desencadenando una respuesta inflamatoria masiva (Suzuki *et al.*, 2005).

1.9. Islas de patogenicidad en *Shigella*

La capacidad de cada especie de *Shigella* para causar la patogenia y la presentación clínica de la Shigelosis, se ha atribuido a factores de virulencia que están codificados en el cromosoma circular y el plásmido de virulencia de *Shigella* (Schroeder y Hilbi, 2008, Mattock y Blocker, 2017). Este plásmido, de aproximadamente 220 kb, ha sido ampliamente estudiado en relación con la patogénesis de la bacteria, la invasión y el ciclo de vida intracelular de *Shigella*. La mayoría de estos determinantes de virulencia están ubicados en una región de 30 kb denominada “región de entrada” (Yang *et al.*, 2005). Esta región contiene el locus *mxi-spa*, que codifica el T3SS y los antígenos del plásmido de invasión (proteínas Ipa), que son necesarios para la invasión de las células epiteliales y la liberación de las bacterias en el citosol de la célula huésped (Sasakawa *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 2005). A pesar de lo anterior, existen pocos

estudios que abarquen la participación de otros determinantes de virulencia localizados a nivel cromosomal, donde existen regiones extensas del genoma denominadas islas de patogenicidad (PAI), las que podrían contribuir al desarrollo de la Shigelosis (Schroeder y Hilbi, 2008).

Las PAI, al igual que elementos como fagos y plásmidos, han sido reconocidas como elementos móviles portadores de genes que codifican factores de virulencia que contribuyen a los mecanismos de patogenicidad de los microorganismos, permitiendo también la transferencia horizontal de genes y causando un gran impacto en la evolución de estos patógenos a lo largo del tiempo (Hacker y Kaper, 2000). En general, estas islas son regiones de ADN extensas, de 10 a 200 kb, que están presentes en el genoma de determinadas bacterias patógenas y ausentes en las no patógenas. Se caracterizan por poseer un alto contenido de G+C que difiere del resto del genoma bacteriano, además de estar frecuentemente asociadas con genes de ARNt, poseer secuencias terminales repetidas que podrían ser generadas después de la integración a regiones específicas de ADN en el genoma del hospedero y portar genes que codifican para factores de movilidad como integrasas, transposasas y/o secuencias de inserción (Gal-Mor y Finlay, 2006). Las PAI codifican factores de virulencia que pueden ser clasificados funcionalmente en varios grupos, siendo los más comunes: (i) Factores de adhesión que permiten a la bacteria unirse a distintas superficies y facilitar el proceso de infección de células eucariontes; (ii) Exotoxinas, las que pueden destruir o afectar la función de células eucariontes infectadas; (iii) Genes de invasión, que median la

entrada de bacterias a células eucariontes y (iv) Sistemas de secreción tipo III , IV y V, que permiten a las bacterias introducir proteínas efectoras capaces de modular la respuesta del hospedero.

En *Shigella*, además de la PAI presente en el plasmidio de virulencia, denominada “Región de entrada”, se han identificado islas de patogenicidad de *Shigella* (SHI: “*Shigella* Pathogenicity Islands”) en el cromosoma. Estas islas de patogenicidad (SHI) son: SHI-O, SHI-1, SHI-2, SHI-3, SRL, que portan genes de virulencia cuya importancia en la patogénesis aún queda por describir (Rajakumar *et al.*, 1997; Luck *et al.*, 2001; Purdy y Payne, 2001; Turner *et al.*, 2003). La localización genética y la presencia de estas islas varía entre las distintas especies y serotipos de *Shigella*, lo que podría contribuir a la variación de los fenotipos de virulencia observados en este patógeno (Peng *et al.*, 2006).

La isla SHI-O fue descrita en *S. flexneri* serotipo 1a y contiene genes relacionados con la conversión del serotipo (Schmidt y Hensel, 2004), contribuyendo a la patogénesis de la bacteria, dado que la respuesta inmune a *Shigella* es antígeno O específica. La isla SHI-2 codifica un sistema de captación de hierro (aerobactina), lo cual parece facilitar la sobrevivencia de *S. flexneri* en los ambientes hostiles. La isla SHI-3, descrita en *S. boydii*, posee un operón aerobactina muy similar al presente en SHI-2 (Schmidt y Hensel, 2004, Torres, 2004). La isla SRL, denominada locus de resistencia de *Shigella* (SRL), transporta genes relacionados con resistencia a múltiples antibióticos (Turner *et al.*, 2003).

La isla SHI-1, también denominada Isla *she*, fue identificada inicialmente en el cromosoma de *S.flexneri* serotipo 2a (Rajakumar *et al.*, 1997). Se encuentra río abajo del gen ARNt *pheV* y porta los genes *setIA* y *setIB*, los cuales codifican para las dos subunidades de la enterotoxina ShET-1, además de los genes codificantes para las proteínas autotransportadoras: SigA, Pic y Sap (pertenecientes a la familia SPATE). Como se explicó anteriormente, SigA exhibe actividad proteolítica *in vitro* y efectos citopáticos sobre células HEp-2, mientras que en el modelo de asa ligada de conejo contribuye a la acumulación de fluido intestinal (Al-Hasani *et al.*, 2000). Pic está implicada en la degradación de mucus y en hemoaglutinación (Henderson *et al.*, 1999). Con respecto al marco de lectura abierto (ORF, *open reading frame*) denominado *Shigella autotransporter-like protein* (*sap*), estudios han revelado que posee una alta similitud de secuencia con el gen que codifica el Antígeno 43 (Ag43) de *Escherichia coli* (*E.coli*), con un 87% de identidad. A pesar de esta evidencia, La función biológica del gen codificante para la proteína Sap en *S. flexneri* es aún desconocida (Al-Hasani *et al.*, 2001).

1.10. Autotransportadores

Los autotransportadores (AT) constituyen una familia de proteínas que dirigen su propia secreción y exportación a través de la membrana externa mediante el sistema de secreción tipo V (T5SS). Se han identificado proteínas autotransportadoras en una amplia gama de bacterias gram negativas (Henderson y Nataro, 2001; Henderson *et al.*, 2004). Estructuralmente, las

proteínas autotransportadoras se caracterizan por la presencia de cuatro dominios distintos: (i) Una secuencia señal N-terminal que media la exportación de la proteína a través de la membrana citoplasmática, (ii) Una proteína “madura” localizada en la superficie (denominada dominio α o pasajero), (iii) Una región de unión α -hélice y (iv) Un dominio carboxi-terminal (denominado dominio β o de translocación) que facilita la secreción del dominio pasajero a través de la membrana externa (Wells *et al.*, 2007; Farfán y Torres, 2012). Si bien el dominio de translocación es homólogo entre las proteínas autotransportadoras (conservando el mecanismo de transporte), el dominio pasajero secretado demuestra una variación considerable en su secuencia (Celik *et al.*, 2012). Como resultado, los dominios pasajeros de la proteína del autotransportador pueden conferir múltiples y diferentes fenotipos relacionados con la virulencia que incluyen adhesión, autoagregación, invasión, formación de biopelículas y citotoxicidad (Henderson y Nataro, 2001).

El Ag43 corresponde a un AT de proteínas de superficie de *E. coli*, siendo uno de los AT más estudiados dada su importancia en la virulencia y en la adhesión bacteriana (Wells *et al.*, 2007). Se ha comprobado que en *E. coli* uropatogénica, el Ag43 permite la manifestación de distintos fenotipos como la autoagregación, que permite la aglomeración de células y se relaciona con la evasión de los mecanismos del sistema inmune, como el complemento y la fagocitosis, de una forma más eficiente que bacterias que no presentan esta función (Ochiai *et al.*, 1993; Berge *et al.*, 1997; Wells *et al.*, 2007). Además, cumple un rol en la adhesión, permitiendo que la bacteria se adhiera al epitelio,

active las vías de señalización, tanto de las células bacterianas como las del huésped, y establezca la infección (Klemm y Schembri, 2000; Ulett *et al.*, 2007). También, se ha demostrado que la eliminación de Ag43 interfiere con la formación de biopelículas (Schembri, *et al.*, 2003; Van Houdt y Michiels, 2005; Shakerimoghaddam *et al.*, 2017), que protegen a las bacterias del estrés ambiental, la respuesta inmunitaria del huésped, las sustancias antimicrobianas y los antibióticos (Solano *et al.*, 2014). Al mismo tiempo, el Ag43 confiere protección contra diversas condiciones ambientales como el estrés oxidativo, la reducción de oxígeno local y protección frente agentes oxidantes como el H₂O₂ (Schembri *et al.*, 2004; Wells *et al.*, 2007). En conjunto, estos fenotipos se ven implicados y mejoran el mecanismo de virulencia. Sin embargo, ninguno de estos eventos relacionados al Ag43 en *E. coli* han sido caracterizados en Sap, por lo que representa un nuevo campo de investigación en el descubrimiento de funciones de este AT.

En función de lo anteriormente presentado, considerando el alto grado de transmisión de *S. flexneri* y su capacidad para evadir la respuesta inmune, alterando el tráfico intracelular en células macrófagicas mediante la modulación de proteínas efectoras codificadas en islas de patogenicidad, y teniendo en cuenta que el ORF que codifica para la proteína Sap aún no ha sido descrito, sumado a su alta similitud con el Ag 43 en *E. coli*, es posible establecer la hipótesis de que el ORF codificante para la proteína Sap estaría implicado en la virulencia de *S. flexneri*, participando en el proceso de adhesión a la célula

huésped, la modulación del tráfico intracelular y el posterior establecimiento de su nicho replicativo.

2. HIPÓTESIS

“La proteína codificada en el marco de lectura abierto *sap* de *Shigella Flexneri* 2a interfiere en la adherencia y tráfico intracelular, permitiendo el establecimiento de su nicho replicativo”

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general:

“Evaluar el rol de la proteína Sap en la adherencia, internalización y crecimiento intracelular de *Shigella flexneri* 2a en células macrofágicas profesionales y no profesionales”

3.2. Objetivos específicos:

1. Analizar la participación de la proteína Sap en la adhesión de *Shigella flexneri* 2a a células macrofágicas no profesionales.
2. Evaluar el rol de la proteína Sap en la proliferación y supervivencia intracelular de *Shigella flexneri* 2a en células macrofágicas profesionales y no profesionales.
3. Determinar la relación de la proteína Sap en el escape de *Shigella flexneri* 2a de la vía endocítica de células macrofágicas profesionales mediante ensayos de colocalización.

4. METODOLOGÍA

4.1. Objetivo 1: Analizar la participación de la proteína Sap en la adhesión de *Shigella flexneri* 2a a células macrofágicas no profesionales.

4.1.1. Cepas bacterianas y cultivos

Las cepas de *Shigella flexneri* que se utilizarán en este trabajo serán obtenidas desde nuestro cepario en el laboratorio de Inmunología molecular UDEC: i) Cepa silvestre y virulenta: *S.flexneri* 2457T (serotipo 2a), ii) Cepa mutante para el ORF *sap*: *S.flexneri* Δ *sap*, y iii) Cepa complementaria para la proteína Sap: *S.flexneri* Δ *sap:sap*. La cepa virulenta será cultivada a 37°C en condiciones aerobias en caldo Luria-Bertani (LB, Difco) suplementado con ampicilina (100 µg/mL), mientras que las cepas mutante y complementaria se cultivarán a 30°C en caldo LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL) y kanamicina (100 µg/mL). Los macrófagos RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) se cultivarán en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con suero bovino fetal al 10% (ambos provistos por Gibco), a 37°C con 5%CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 80%. Además, se utilizarán líneas de células epiteliales humanas: HeLa (ATCC® CCL-2™) en las mismas condiciones de cultivo. Todo el trabajo con bacterias vivas y derivados se llevarán a cabo siguiendo los procedimientos establecidos por el Comité de Bioseguridad de la Universidad de Concepción.

4.1.2. Expresión de proteína verde fluorescente (GFP) en cepas *S.flexneri* 2457T, *S.flexneri* Δsap y *S.flexneri* $\Delta sap:sap$.

Para los ensayos de adhesión, y con el fin de poder visualizar el tráfico intracelular de las bacterias *S.flexneri* Δsap y *S.flexneri* $\Delta sap:sap$ mediante técnicas de inmunofluorescencia, las bacterias en estudio, junto con la cepa silvestre *S.flexneri* 2457T, serán transformadas con el plásmido pAKgfp1 (Addgene plasmid # 14076) que contiene un gen que codifica para la proteína verde fluorescente y un gen de resistencia a ampicilina, generando las cepas: *S.flexneri* 2a-GFP, *S.flexneri* Δsap -GFP y *S.flexneri* $\Delta sap:sap$ -GFP. Para esto, se utilizarán un total de 10^8 UFC/mL de las bacterias nombradas anteriormente, las que se mezclarán con 10 μ L de ADN plasmidial pAKgfp1 y serán transformadas mediante el método de transformación con cloruro de calcio ($CaCl_2$) reportado por Mandel e Higa (Mandel e Higa, 1970), para luego ser incubadas en 1 mL de caldo LB, durante 24 horas en agitación a 37 °C y a 30°C según las condiciones de cultivo mencionadas anteriormente. Posteriormente, 100 μ L de esta suspensión se sembrarán en placas con agar LB suplementado con 100 μ g/mL de ampicilina y kanamicina según corresponda e incubadas a 37 °C y 30°C durante 24 h. Pasado este tiempo, todas las colonias se sembrarán en caldo LB durante 24 h, para luego confirmar la expresión de GFP en las cepas silvestre, mutante y complementaria, mediante microscopía de fluorescencia utilizando el láser de 488 nm del microscopio EVOS FLoid Cell Imaging Station (Wei y Dai, 2014).

4.1.3. Ensayo de adhesión bacteriana

Para determinar la participación de la proteína Sap en la unión de *S. flexneri* 2a a células epiteliales se realizará un ensayo de adherencia. Las células HeLa serán cultivadas en placas de 12 pocillos (1×10^5 células por pocillo) con cubreobjetos de 18 mm de diámetro (FisherScientific). Posteriormente, las células se tratarán con citocalasina D (0,5 mg / mL) para inhibir la internalización bacteriana. Después de eso, las células se infectarán con las cepas bacterianas con una multiplicidad de infección (MOI) de 1:10 o 1:100 (según ensayos anteriores) y se centrifugarán a $150 \times g$ durante 10 min para luego incubarlas a 37 y 30 °C en 5% de CO₂ durante 30 min, según condiciones de cultivo de las cepas. Posteriormente, las células serán lavadas con PBS y fijadas con Paraformaldehído (PFA) al 4%. Luego, las muestras se permeabilizarán a -20°C en metanol durante 10 segundos. Las preparaciones se teñirán con faloidina Alexa fluor 633 (1: 500) durante 1 hora a 37°C. Finalmente, las muestras serán lavadas y montadas con medio de montaje fluorescente (Dako North America) sobre cubreobjetos (Liao *et al.*, 2019). Todas las imágenes se recolectarán utilizando un microscopio multifotón espectral (Zeiss LSM 780). Se seleccionarán al azar cien células y se contarán las bacterias adherentes.

4.2. Objetivo 2: Evaluar el rol de la proteína Sap en la proliferación y sobrevida intracelular de *Shigella flexneri* 2a en células macrofágicas profesionales y no profesionales.

4.2.1. Ensayo de infección

Para evaluar la proliferación y la sobrevida intracelular de las cepas en estudio de *S. flexneri* 2a, se utilizarán los macrófagos murinos RAW 264.7 y células epiteliales HeLa. Para esto, las células serán sembradas en placas de 24 pocillos (10^6 células/pocillo) durante toda la noche en medio de cultivo DMEM. Luego se removerá el medio de cultivo y se procederá a incubar las cepas bacterianas con una MOI de 1:100. Para asegurar un contacto estrecho entre las células y las bacterias, las placas se centrifugarán por 10 min a $141 \times g$ a temperatura ambiente para ser inmediatamente incubadas a 37°C en atmosfera de CO₂ al 5%. Después de 30 min, los pocillos serán lavados 3 veces con PBS y se agregará medio de cultivo celular DMEM suplementado con 50 µg/mL de gentamicina para eliminar todas las bacterias que no fueron internalizadas y se incubarán por 1, 4 y 24 horas. Transcurrido el tiempo, el medio será removido y las células lisadas con agua destilada. Las UFC bacterianas serán cuantificadas utilizando diluciones seriadas en placas de agar LB por triplicado para el análisis estadístico (Xu *et al.*, 2016). La cepa salvaje *S. flexneri* 2457T, y la cepa complementada *S. flexneri* $\Delta sap:sap$ se utilizarán como grupos controles.

4.3. Objetivo 3: Determinar la relación de la proteína Sap en el escape de *Shigella flexneri* 2a de la vía endocítica de células macrofágicas profesionales mediante ensayos de colocalización.

4.3.1. Ensayo de tráfico intracelular

Para evaluar el tráfico intracelular de las cepas en estudio, en primer lugar se llevará a cabo un ensayo de infección. Los macrófagos murinos RAW 264.7 serán sembrados en placas de 24 pocillos (10^5 células/pocillo). Luego se removerá el medio de cultivo y se procederá a incubar las células con las cepas silvestre, mutante y complementaria (GFP positivas) en medio de cultivo celular DMEM con una MOI de 1:10 y 1:100, para determinar la multiplicidad de infección. Posteriormente, las placas se centrifugarán por 10 min a $141 \times g$ a temperatura ambiente, para ser inmediatamente incubadas a 37°C en atmosfera de CO₂ al 5% (tiempo 0). Después de 1 h, los pocillos serán lavados 5 veces con PBS (pH 7.4) y se agregará medio de cultivo celular DMEM suplementado con 100 µg/mL de gentamicina y 50 µg/mL de estreptomicina para eliminar todas las bacterias que no fueron internalizadas.

Luego de la infección de los macrófagos RAW 264.7 con cepas *S. flexneri* 2a-GFP, *S. flexneri* Δsap -GFP y *S. flexneri* $\Delta sap:sap$ -GFP, se determinará su tráfico intracelular. Para esto, las células infectadas serán fijadas a los 15 min p.i, 4 y 12 h p.i (post- infección) con PFA al 4% en PBS a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras serán lavadas 5 veces con PBS 1X

para extraer el PFA residual y luego serán visualizadas a 488 nm a través de microscopía confocal espectral (LSM 780 Zeiss) (Wei y Dai, 2014).

4.3.2. Ensayo de colocalización

El tráfico intracelular se observará luego de la infección de los macrófagos RAW 264.7 con las bacterias salvajes, mutantes y complementadas, a través de la colocalización de las bacterias con el endosoma temprano y el endosoma tardío a los 15 min y 4 h después de la infección, respectivamente. Además, se observará el posible tráfico intracelular hacia el fagolisosoma y el retículo endoplásmico a las 12 h después de la infección. Para esto se realizará nuevamente una infección de macrófagos murinos RAW 264.7 con las cepas en estudio, en las mismas condiciones del ensayo de infección anterior. Luego que las células infectadas sean fijadas a los 15 min, 4 y 12 h p.i y su posterior lavado con PBS, éstas serán permeabilizadas utilizando tritón X-100 al 0,1% en PBS durante 10 min. Luego, las células infectadas serán lavadas 5 veces con PBS 1X y se les agregará una solución de bloqueo (BSA 1% en PBS) durante 40 min. Para determinar el tráfico intracelular de las cepas en estudio, las células fijadas a los 15 min p.i se incubarán con el anticuerpo policlonal de cabra anti-EEA1 (antígeno endosomal temprano 1) (Santa Cruz) para el marcaje del endosoma temprano (Wilson *et al.*, 2000), las células que fueron fijadas a las 4 h pi. se incubarán con el anticuerpo policlonal de conejo anti-LAMP1 (proteína 1 de membrana asociada a lisosomas) (Santa Cruz) para el marcaje del endosoma tardío (Marathe *et al.*, 2012) y finalmente las células fijadas a las 12 h pi serán incubadas con el anticuerpo policlonal de conejo anti-

catepsina D (Abcam) para el marcaje del fagolisosoma (Marino *et al.*, 2013) y con el anticuerpo policlonal de conejo anticalnexin (Abcam) para el marcaje del retículo endoplásmico (Müller-Taubenberger *et al.*, 2001), en experimentos separados.

Posterior a la incubación con el anticuerpo primario, las células serán lavadas con PBS 1X e incubadas con los anticuerpos secundarios anti cabra IgG Alexa flúor 594 (Thermo Scientific) y anti conejo IgG Alexa fluor 647 (Thermo Scientific) según corresponda. Finalmente, las células se montarán en portaobjetos sobre 10 μ L de medio de montaje fluorescente Dako Cytomation (Sigma-Aldrich) y se mantendrán durante 1h en oscuridad para permitir el secado. Para determinar la colocalización de las cepas en estudio con organelos intracelulares de macrófagos RAW 264.7, se empleará el uso del microscopio multifoton espectral con un objetivo 40X (LSM 780 Zeiss). Las líneas de láser utilizadas serán: 488 nm para GFP y 568 nm para Alexa flúor 594 y 633 nm para Alexa flúor 647.

4.3.3. Análisis estadístico

Las imagenes correspondientes a la co-localización de las cepas *S. flexneri* 2a-GFP, *S. flexneri* Δ sap-GFP y *S. flexneri* Δ sap:sap-GFP con organelos intracelulares, serán guardadas en formato.czi e importadas al software ImageJ para editar y superponer las imágenes usando formato RGB. Se realizará un análisis estadístico mediante un ANOVA de una vía usando el programa GraphPad Prism 9.0.

5. PLAN DE TRABAJO

Tabla 5-1. Carta Gantt.

Objetivos específicos: Actividades / meses	6	12	18	24
Objetivo 1: Analizar la participación de la proteína Sap en la adhesión de <i>Shigella flexneri</i> 2a a células macrofágicas no profesionales.				
a) Cepas bacterianas y cultivos	x	x	x	x
b) Expresión de proteína verde fluorescente (GFP) en cepas <i>S.flexneri</i> 2457T, <i>S.flexneri</i> Δsap y <i>S.flexneri</i> $\Delta sap:sap$	x	x		
c) Ensayo de adhesión bacteriana		x		
Objetivo 2: Evaluar el rol de la proteína Sap en la proliferación y sobrevivencia intracelular de <i>Shigella flexneri</i> 2a en células macrofágicas profesionales y no profesionales.				
a) Ensayo de infección		x	x	
Objetivo 3: Determinar la relación de la proteína Sap en el escape de <i>Shigella flexneri</i> 2a de la vía endocítica de células macrofágicas profesionales mediante ensayos de colocalización.				
a) Ensayo de tráfico intracelular			x	
b) Ensayo de colocalización			x	
c) Análisis estadístico			x	x
Publicaciones - Conferencias			x	x
Redacción de informe final				x

6. TRABAJO EN PROGRESO

Con el objetivo de evaluar el rol de la proteína Sap en el proceso de adherencia, internalización y crecimiento intracelular de *Shigella flexneri* 2a, resultados previos desarrollados por nuestro grupo de investigación permitieron la construcción de la mutante *S. flexneri* 2457T Δsap a través del método de desplazamiento alélico de Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner, 2000). Para lograr esto, se eliminó la secuencia señal y el dominio pasajero del gen *sap*, los que fueron reemplazados por el gen de resistencia a kanamicina. La presencia del gen de resistencia se comprobó a través de un gel de agarosa al 0,5% de los amplicones de PCR realizados con los cebadores internos y externos al gen de kanamicina en clones de *S. flexneri* seleccionados por resistencia a dicho antibiótico (Fig.1).

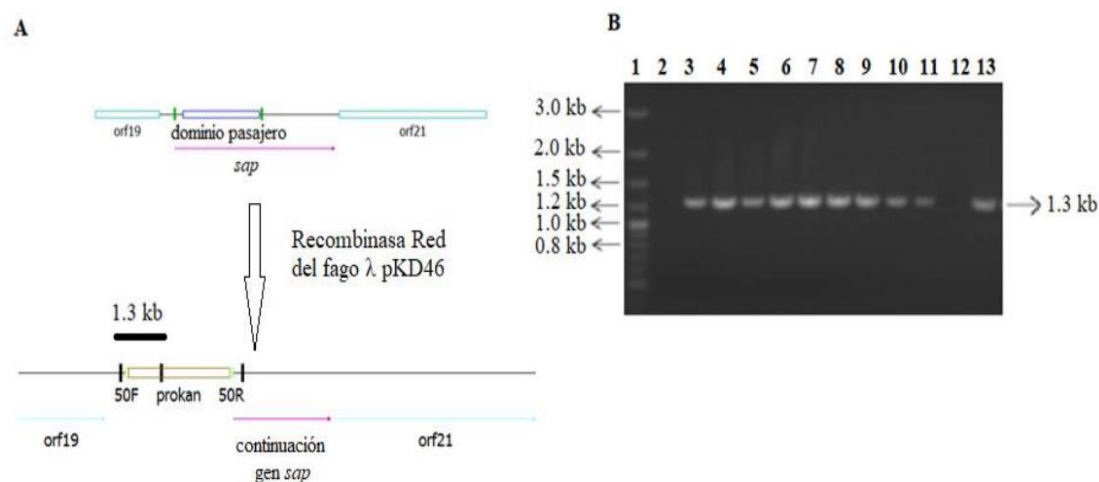


Fig. 1: Construcción de la cepa mutante de *Shigella flexneri* 2457T 2a para el dominio pasajero del gen *sap* mediante intercambio alélico. (A) Representación de la recombinación por recombinasa red del fago λ codificado en el vector pKD46 a través de las regiones homólogas entre las zonas flanqueantes del dominio secuencia

señal-pasajero del gen *sap* y el gen de resistencia a kanamicina. (B) electroforesis en gel de agarosa al 0,5 % de los amplicones por PCR de 1,3 kb de los clones seleccionados por resistencia a la kanamicina. 1, Marcador de peso molecular 3 kb. 2, *S. flexneri* 2457T. 3-11 y 13, clones positivos *sap:kan*. 12, falso positivo.

Posterior a la obtención de la mutante, se realizó la curva de crecimiento para cada clon y la cepa 2457T (Fig.2). Esto se realizó midiendo la densidad óptica a 600nm de un cultivo correspondiente a cada cepa en medio TBS, con presencia o ausencia de sales biliares al 0,4% para determinar cambios metabólicos entre ellas.

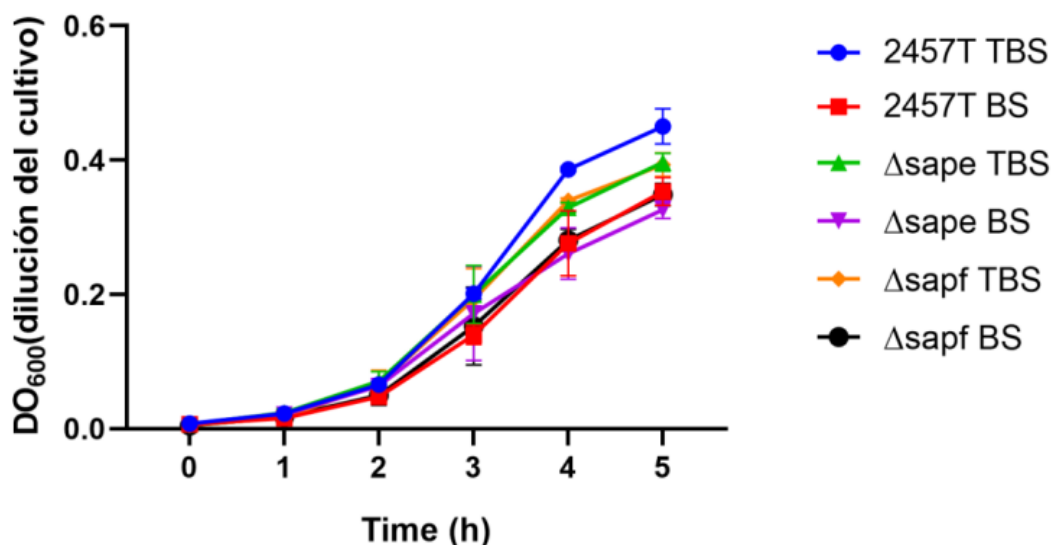


Fig. 2: Curvas de crecimiento de cepas de *Shigella flexneri* 2457T y mutante Δsap en presencia y ausencia de sales biliares. Monitoreo del crecimiento bacteriano de las cepas 2457T y Δsap en caldo TBS con presencia y ausencia de sales biliares al 0,4%. Se determinó la densidad óptica a 600nm por cada hora de cultivo en un lapso de 5 horas. Se muestra el promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes.

Este experimento presentó diferencias estadísticas significativas entre la cepa 2457T en medio TBS solo y la mutante Δsap y 2457T cultivadas en TBS con sales biliares con valores significativos $p < 0,05-0,0001$. En conjunto, el

desarrollo de la mutante Δsap y la caracterización de su curva de crecimiento permitirán dar cumplimiento a los objetivos planteados en este proyecto con referencia al rol de la proteína Sap en el proceso de adhesión, sobrevivencia y tráfico intracelular de la bacteria.

Con relación al objetivo 1: “Analizar la participación de la proteína Sap en la adhesión de *Shigella flexneri* 2a a células macrofágicas no profesionales”, se realizó una transformación bacteriana para insertar el plásmido pAKgfp 1 en la cepa 2457T y la mutante Δsap , lo que permitirá realizar ensayos de adhesión y tráfico intracelular a través de microscopía confocal. Las cepas fueron transformadas a través del método de electroporación y cloruro de calcio (Mandel e Higa, 1970), obteniendo mayor efectividad con este último. Esto se determinó a través de la observación de las colonias GFP positivas por microscopía de fluorescencia (Fig.3).

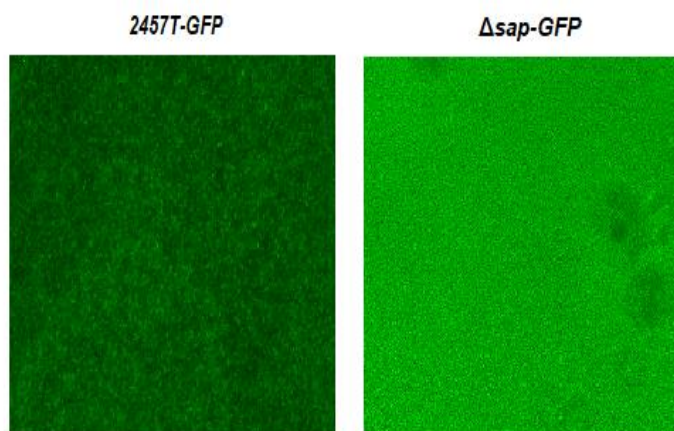


Fig. 3: Transformación de *Shigella flexneri* 2457T y mutante Δsap con plásmido pAKgfp 1. Visualización de las colonias GFP positivas transformadas por el método de cloruro de calcio por microscopía de fluorescencia.

Para cumplir los objetivos 1 y 3: “Analizar la participación de la proteína Sap en la adhesión de *Shigella flexneri* 2a a células macrofágicas no profesionales” y “Determinar la relación de la proteína Sap en el escape de *Shigella flexneri* 2a de la vía endocítica de células macrofágicas profesionales mediante ensayos de colocalización.”, se determinó la multiplicidad de infección ideal a través de ensayos de infección en células RAW264.7 utilizando la cepa silvestre 2457T-GFP positivo, para posteriormente realizar una microscopía confocal 15 minutos post-infección (Fig.4). Las imágenes obtenidas en formato.czi se importaron al software ImageJ, donde fueron editadas y superpuestas (Merge) usando formato RGB para su posterior análisis.

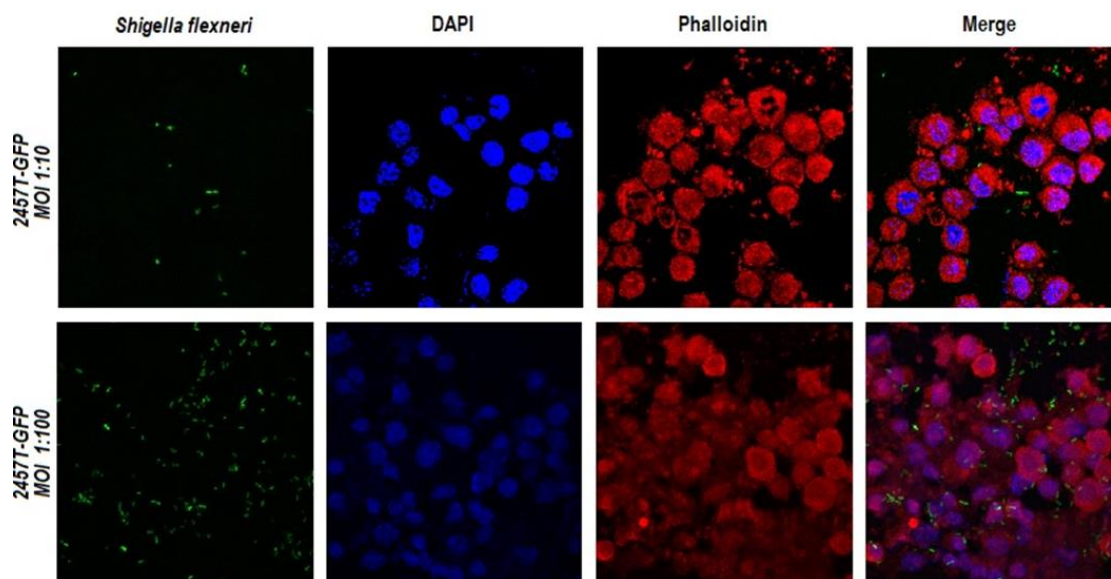


Fig. 4: Análisis confocal de células RAW 264.7 infectadas con *Shigella flexneri* 2457T. Los macrófagos RAW 264.7 fueron infectados con la cepa silvestre *S. flexneri* 2457T-GFP con una multiplicidad de infección (MOI) de 1:10 y 1:100, fijadas con paraformaldehído al 4% a los 15 min post infección y procesadas para inmunofluorescencia. La imagen confocal muestra la colocación de la cepa 2457T-GFP con las células macrófagicas RAW 264.7. Las bacterias se observan de color verde, mientras que se utilizó DAPI para teñir los núcleos (color azul) y faloidina para teñir el citoesqueleto (rojo) de las células macrófagicas.

A partir de este experimento, se determinó utilizar una multiplicidad de infección de 100 para visualizar un mayor número de bacterias y un mayor nivel de co-localización al realizar los experimentos de adhesión y tráfico intracelular.

7. RECURSOS DISPONIBLES

El Laboratorio de Inmunología del Departamento de Microbiología, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, cuenta con la infraestructura y el equipamiento necesarios para llevar a cabo el desarrollo de este proyecto, incluyendo:

- 1) Una sala de cultivo celular, equipada con un gabinete de flujo laminar, un microscopio invertido, un separador magnético para subpoblaciones (Miltenyi-Biotech), refrigerador, centrífuga con enfriamiento, tanque de nitrógeno líquido e incubadoras con CO₂.
- 2) Un Laboratorio de Bioseguridad tipo II con acceso restringido y contención microbiológica parcial para trabajar con agentes de riesgo del grupo II (Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados-FondecytCONICYT). Este Laboratorio se encuentra equipado con incubadoras y gabinete de flujo laminar, donde son cultivadas las bacterias patógenas y se realizan los ensayos de infección.
- 3) Un laboratorio con equipamiento básico para realizar diversas técnicas inmunológicas. Este incluye: microscopios, dos congeladores -20°C, un congelador -80°C, pHmetro, cámaras para electroforesis en geles de agarosa, cámaras de electroforesis en gel de poliacrilamida con fuentes de poder y visualizador de geles con UV.
- 4) Un laboratorio con equipamiento para el desarrollo de técnicas moleculares y de citometría, en donde se incluyen tres termocicladores, mini centrífuga

con enfriamiento, un Sistema de PCR en tiempo-Real AriaMx, un citómetro de flujo de última generación Becton Dickenson LSR Fortessa X-20 y un Lector de placas de Elisa de marca Victor X3.

Además, dentro de las dependencias de la Universidad de Concepción, en el centro de microscopía avanzado (CMA), se tendrá acceso a un Microscopio multifotón espectral (LSM780 Zeiss). Por último, el Departamento de Microbiología proporcionará las facilidades para la preparación de reactivos y medios de cultivo, además del sistema de esterilización de materiales.

8. JUSTIFICACIÓN DE RECURSOS SOLICITADOS

8.1. Personal técnico y/o de apoyo

Tabla 8-1. Personal.

Personas que ejercen funciones permanentes durante la ejecución del proyecto:

Personal Técnico	Horas de dedicación		Meses de dedicación		Remuneración / Honorarios m(\$)
	Semana	Mes	Año 1	Año 2	
Investigador Principal	30	120	11	11	6.000
Técnico 1	22	88	11	11	4.000

Describa aquí las labores de cada personal técnico:

Técnico 1 - Tareas: Preparación de medios de cultivo, esterilización de material, cotización y compra de reactivos.

8.2. Gastos de operación

Tabla 8-2. Gastos de operación general.

Costo anual estimado de los subítem necesarios para una exitosa ejecución del proyecto.

Subítem	Fundamente solicitud	Año 1 m(\$)	Año 2 m(\$)
Materiales	Para llevar a cabo el Proyecto son necesarios diversos suministros, incluyendo material de oficina (tales como papel, lápices, cartuchos de tinta, etc.), material fungible de laboratorio (tales como placas petri, tubos de ensayo, frascos de cultivo, pipetas serológicas, placas de cultivo etc),	8.500	10.000

	reactivos para la mantención de cultivos celulares y bacterianos, como también para el desarrollo de técnicas moleculares (medios de cultivo, antibióticos, antimicóticos, agua libre de nucleasas, reactivo de transfección, etc.) además de kits comerciales para la metodología descrita (Kit de extracción de DNA Invitrogen™, anticuerpos primarios y secundarios Thermo Scientific para microscopía confocal, etc)		
Capacitaciones			
Inscripción seminarios, congresos, talleres, etc.	Como parte del proceso de discusión y apertura a otros miembros de la comunidad científica, durante el segundo año se espera presentar los resultados en congresos y seminarios.		500
Publicaciones, Propiedad Intelectual e Industrial	Durante el segundo año de investigación, se proyecta realizar una publicación científica a partir de los resultados obtenidos. Algunas revistas científicas de interés en el área, como " <i>Frontiers In Immunology</i> ", tienen costos de publicación.		2.500
Material bibliográfico y suscripciones			
Gastos en difusión	Se destinarán recursos para la organización de jornadas científicas enfocadas a profesionales del área, estudiantes de pre y postgrado, así como también el resto de la comunidad.	2.000	2.000
Softwares			
Costos de garantías de boletas, pólizas y pagarés			
Reparación y arriendo de equipos	Arriendo de microscopio confocal multifotón espectral (LSM 780 Zeiss)	300	300

Movilizaciones y traslados			
Atención de reuniones			
Otros gastos de operación			
TOTAL:		10.800	15.300

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ajene, A. N., Walker, C. L. F., & Black, R. E. (2013). Enteric pathogens and reactive arthritis: a systematic review of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Shigella*-associated reactive arthritis. *Journal of health, population, and nutrition*, 31(3), 299.
- Akhondi, H., & Simonsen, K. A. (2019). Bacterial Diarrhea. *StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)*
- Al-Hasani, K., Adler, B., Rajakumar, K., & Sakellaris, H. (2001). Distribution and structural variation of the she pathogenicity island in enteric bacterial pathogens. *Journal of medical microbiology*, 50(9), 780-786.
- Al-Hasani, K., Henderson, I. R., Sakellaris, H., Rajakumar, K., Grant, T., Nataro, J. P., ... & Adler, B. (2000). The sigA gene which is borne on the she pathogenicity island of *Shigella flexneri* 2a encodes an exported cytopathic protease involved in intestinal fluid accumulation. *Infection and immunity*, 68(5), 2457-2463.
- Al-Hasani, K., Navarro-Garcia, F., Huerta, J., Sakellaris, H., & Adler, B. (2009). The immunogenic SigA enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a binds to HEp-2 cells and induces fodrin redistribution in intoxicated epithelial cells. *PloS one*, 4(12), e8223.
- Ambrosi, C., Pompili, M., Scribano, D., Limongi, D., Petrucca, A., Cannavacciuolo, S., ... & Nicoletti, M. (2015). The *Shigella flexneri* OspB effector: an early immunomodulator. *International Journal of Medical Microbiology*, 305(1), 75-84.
- Ashida, H., Mimuro, H., & Sasakawa, C. (2015). *Shigella* manipulates host immune responses by delivering effector proteins with specific roles. *Frontiers in immunology*, 6, 219.
- Ashida, H., Ogawa, M., Mimuro, H., Kobayashi, T., Sanada, T., & Sasakawa, C. (2011). *Shigella* are versatile mucosal pathogens that circumvent the host innate immune system. *Current opinion in immunology*, 23(4), 448-455.

- Baker, S., & The, H. C. (2018). Recent insights into *Shigella*: a major contributor to the global diarrhoeal disease burden. *Current opinion in infectious diseases*, 31(5), 449.
- Bardhan, P., Faruque, A. S. G., Naheed, A., & Sack, D. A. (2010). Decreasing shigellosis-related deaths without *Shigella* spp.-specific interventions, Asia. *Emerging infectious diseases*, 16(11), 1718.
- Barrett-Connor, E., & Connor, J. D. (1970). Extraintestinal manifestations of shigellosis. *The American journal of gastroenterology*, 53(3), 234-245.
- Bennish, M. L. (1991). Potentially lethal complications of shigellosis. *Reviews of infectious diseases*, 13(Supplement_4), S319-S324.
- Berge, A., Kihlberg, B. M., Sjöholm, A. G., & Björck, L. (1997). Streptococcal protein H forms soluble complement-activating complexes with IgG, but inhibits complement activation by IgG-coated targets. *Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20774-20781.
- Bourdet-Sicard, R., Rüdiger, M., Jockusch, B. M., Gounon, P., Sansonetti, P. J., & Van Nhieu, G. T. (1999). Binding of the *Shigella* protein IpaA to vinculin induces F-actin depolymerization. *The EMBO journal*, 18(21), 5853-5862.
- Carrasco, S., Solari, V., Prado, V., Suazo, L., Arellano, C., Hernández, M. y Espinoza, C. (2000) Brote de shigelosis en una escuela de educación básica. *Revista Chilena de Infectología*, 17 (2): 122- 128.
- Celik, N., Webb, C. T., Leyton, D. L., Holt, K. E., Heinz, E., Gorrell, R., ... & Lithgow, T. (2012). A bioinformatic strategy for the detection, classification and analysis of bacterial autotransporters. *PLoS ONE* 7(8): e43245.
- Cossart, P., & Sansonetti, P. J. (2004). Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science*, 304(5668), 242-248.
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6640-6645.

- Dong, N., Zhu, Y., Lu, Q., Hu, L., Zheng, Y., & Shao, F. (2012). Structurally distinct bacterial TBC-like GAPs link Arf GTPase to Rab1 inactivation to counteract host defenses. *Cell*, 150(5), 1029-1041.
- Du, J., Reeves, A. Z., Klein, J. A., Twedt, D. J., Knodler, L. A., & Lesser, C. F. (2016). The type III secretion system apparatus determines the intracellular niche of bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(17), 4794-4799.
- DuPont, H. L., Levine, M. M., Hornick, R. B., & Formal, S. B. (1989). Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. *The Journal of infectious diseases*, 159(6), 1126-1128.
- Faherty, C., Harper, J. M., Shea-Donohue, T., Barry, E. M., Kaper, J. B., Fasano, A., & Nataro, J. P. (2012). Chromosomal and plasmid-encoded factors of *Shigella flexneri* induce secretogenic activity ex vivo. *PloS one*, 7(11), e49980.
- Farag, T. H., Faruque, A. S., Wu, Y., Das, S. K., Hossain, A., Ahmed, S., ... & Levine, M. M. (2013). Housefly population density correlates with shigellosis among children in Mirzapur, Bangladesh: a time series analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(6), e2280.
- Ferreccio, C., Prado, V., Ojeda, A., Cayyazo, M., Abrego, P., Guers, L., & Levine, M. M. (1991). Epidemiologic patterns of acute diarrhea and endemic *Shigella* infections in children in a poor periurban setting in Santiago, Chile. *American journal of epidemiology*, 134(6), 614-627.
- Gal-Mor, O., & Finlay, B. B. (2006). Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cellular microbiology*, 8(11), 1707-1719.
- GBD 2017 Causes of Death Collaborators (2018). Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017. *Lancet* 392 (10159), 1736-1788.
- Ghosh, Sandip. (2019). A comprehensive guide to choose correct culture media, and reagents for HeLa cells. 10.13140/RG.2.2.13904.56323.
- Gorden, J., & Small, P. (1993). Acid resistance in enteric bacteria. *Infection and immunity*, 61(1), 364-367.

- Gutiérrez-Jiménez, J., Arciniega, I., & Navarro-García, F. (2008). The serine protease motif of Pic mediates a dose-dependent mucolytic activity after binding to sugar constituents of the mucin substrate. *Microbial pathogenesis*, 45(2), 115-123.
- Haas, A. (2007). The phagosome: compartment with a license to kill. *Traffic*, 8(4), 311-330.
- Hacker, J., & Kaper, J. B. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 641-679.
- Halimeh, F. B., Rafei, R., Osman, M., Kassem, I. I., Diene, S. M., Dabboussi, F., ... & Hamze, M. (2021). Historical, current, and emerging tools for identification and serotyping of *Shigella*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(4), 2043-2055.
- Henderson, I. R., & Nataro, J. P. (2001). Virulence functions of autotransporter proteins. *Infection and immunity*, 69(3), 1231-1243.
- Henderson, I. R., Czeczulin, J., Eslava, C., Noriega, F., & Nataro, J. P. (1999). Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 67(11), 5587-5596.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C., & Ala'Aldeen, D. (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68(4), 692-744.
- High, N., Mounier, J., Prevost, M. C., & Sansonetti, P. J. (1992). IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. *The EMBO journal*, 11(5), 1991-1999.
- Instituto de Salud Pública de Chile. (2016). Boletín de vigilancia de laboratorio: Vigilancia *Shigella* spp 2010-2015 [Internet]. Disponible en:
http://www.ispch.cl/sites/default/files/Boletin_Shigella_2010_2015.pdf
 f.
- Instituto de Salud Pública de Chile. (2019). Boletín vigilancia de laboratorio: Vigilancia de Laboratorio de *Shigella* spp. Chile 2014-2018. Disponible en:

http://www.ispach.cl/sites/default/files/Boletin_Shigella_2014_2018.pdf.

- Jennison, A. V., & Verma, N. K. (2004). *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. *FEMS microbiology reviews*, 28(1), 43-58.
- Kotloff, K. L., Nasrin, D., Blackwelder, W. C., Wu, Y., Farag, T., Panchalingham, S., ... & Levine, M. M. (2019). The incidence, aetiology, and adverse clinical consequences of less severe diarrhoeal episodes among infants and children residing in low-income and middle-income countries: a 12-month case-control study as a follow-on to the Global Enteric Multicenter Study (GEMS). *The Lancet Global Health*, 7(5), e568-e584.
- Kotloff, K. L., Riddle, M. S., Platts-Mills, J. A., Pavlinac, P., & Zaidi, A. K. (2018). Shigellosis. *The Lancet*, 391(10122), 801-812.
- Laghari, G. S., Hussain, Z., & Shahzad, H. (2019). Effect of zinc supplementation on the frequency and consistency of stool in children with acute diarrhea. *Cureus*, 11(3).
- Le-Barillec, K., Magalhaes, J. G., Corcuff, E., Thuizat, A., Sansonetti, P. J., Phalipon, A., & Di Santo, J. P. (2005). Roles for T and NK cells in the innate immune response to *Shigella flexneri*. *The Journal of Immunology*, 175(3), 1735-1740.
- Levine, M. M., Nasrin, D., Acácio, S., Bassat, Q., Powell, H., Tennant, S. M., ... & Kotloff, K. L. (2020). Diarrhoeal disease and subsequent risk of death in infants and children residing in low-income and middle-income countries: analysis of the GEMS case-control study and 12-month GEMS-1A follow-on study. *The Lancet Global Health*, 8(2), e204-e214.
- Liao C, Fang K, Xiao J, Zhang W, Zhang B, Yuan W, et al. (2019) Critical determinants of human neutrophil peptide 1 for enhancing host epithelial adhesion of *Shigella flexneri*. *Cell Microbiol*. 21:e13069
- Liu, J., Platts-Mills, J. A., Juma, J., Kabir, F., Nkeze, J., Okoi, C., ... & Houpt, E. R. (2016). Use of quantitative molecular diagnostic methods to identify causes of diarrhoea in children: a reanalysis of the GEMS case-control study. *The Lancet*, 388(10051), 1291-1301.

- Lucchini, S., Liu, H., Jin, Q., Hinton, J. C., & Yu, J. (2005). Transcriptional adaptation of *Shigella flexneri* during infection of macrophages and epithelial cells: insights into the strategies of a cytosolic bacterial pathogen. *Infection and immunity*, 73(1), 88-102.
- Luck, S. N., Turner, S. A., Rajakumar, K., Sakellaris, H., & Adler, B. (2001). Ferric dicitrate transport system (Fec) of *Shigella flexneri* 2a YSH6000 is encoded on a novel pathogenicity island carrying multiple antibiotic resistance genes. *Infection and immunity*, 69(10), 6012-6021.
- Man, A. L., Prieto-Garcia, M. E., & Nicoletti, C. (2004). Improving M cell mediated transport across mucosal barriers: do certain bacteria hold the keys?. *Immunology*, 113(1), 15-22.
- Mandel, M., & Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of molecular biology*, 53(1), 159-162.
- Marathe, S. A., Sen, M., Dasgupta, I., & Chakravorty, D. (2012). Differential modulation of intracellular survival of cytosolic and vacuolar pathogens by curcumin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(11), 5555–5567.
- Marino, J., García Vior, M. C., Furmento, V. A., Blank, V. C., Awruch, J., & Roguin, L. P. (2013). Lysosomal and mitochondrial permeabilization mediates zinc(II) cationic phthalocyanine phototoxicity. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45(11), 2553–2562.
- Mattock, E., & Blocker, A. J. (2017). How do the virulence factors of *Shigella* work together to cause disease?. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 64.
- Mellouk, N., Weiner, A., Aulner, N., Schmitt, C., Elbaum, M., Shorte, S. L., ... & Enninga, J. (2014). *Shigella* subverts the host recycling compartment to rupture its vacuole. *Cell host & microbe*, 16(4), 517-530.
- Mounier, J., Popoff, M. R., Enninga, J., Frame, M. C., Sansonetti, P. J., & Van Nhieu, G. T. (2009). The IpaC carboxyterminal effector domain mediates Src-dependent actin polymerization during *Shigella* invasion of epithelial cells. *PLoS pathogens*, 5(1), e1000271.

- Müller-Taubenberger, A., Lupas, A. N., Li, H., Ecke, M., Simmeth, E., & Gerisch, G. (2001). Calreticulin and calnexin in the endoplasmic reticulum are important for phagocytosis. *The EMBO journal*, 20(23), 6772–6782.
- Muthuirulandi Sethuvel, D. P., Devanga Ragupathi, N. K., Anandan, S., & Veeraraghavan, B. (2017). Update on: *Shigella* new serogroups/serotypes and their antimicrobial resistance. *Letters in applied microbiology*, 64(1), 8-18.
- Nisa, I., Qasim, M., Yasin, N., Ullah, R., & Ali, A. (2020). *Shigella flexneri*: an emerging pathogen. *Folia microbiologica*, 65(2), 275-291.
- Ochiai, K., Kurita-Ochiai, T., Kamino, Y., & Ikeda, T. (1993). Effect of co-aggregation on the pathogenicity of oral bacteria. *Journal of medical microbiology*, 39(3), 183-190.
- Ofei, S. Y., & Fuchs, G. J. (2019). Principles and practice of oral rehydration. *Current gastroenterology reports*, 21(12), 1-6.
- Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N., & Sasakawa, C. (2005). Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. *Science*, 307(5710), 727-731.
- Parsot, C. (2009). *Shigella* type III secretion effectors: how, where, when, for what purposes?. *Current opinion in microbiology*, 12(1), 110-116.
- Payne, S. M., Wyckoff, E. E., Murphy, E. R., Oglesby, A. G., Boulette, M. L., & Davies, N. M. (2006). Iron and pathogenesis of *Shigella*: iron acquisition in the intracellular environment. *Biometals*, 19(2), 173-180.
- Paz, I., Sachse, M., Dupont, N., Mounier, J., Cederfur, C., Enninga, J., ... & Sansonetti, P. (2010). Galectin-3, a marker for vacuole lysis by invasive pathogens. *Cellular microbiology*, 12(4), 530-544.
- Peng, J., Zhang, X., Yang, J., Wang, J., Yang, E., Bin, W., ... & Jin, Q. (2006). The use of comparative genomic hybridization to characterize genome dynamics and diversity among the serotypes of *Shigella*. *BMC genomics*, 7(1), 1-11.
- Pieper, R., Fisher, C. R., Suh, M. J., Huang, S. T., Parmar, P., & Payne, S. M. (2013). Analysis of the proteome of intracellular *Shigella flexneri*

reveals pathways important for intracellular growth. *Infection and immunity*, 81(12), 4635-4648.

Purdy, G. E., & Payne, S. M. (2001). The SHI-3 iron transport island of *Shigella boydii* 0-1392 carries the genes for aerobactin synthesis and transport. *Journal of Bacteriology*, 183(14), 4176-4182.

Puzari, M., Sharma, M., & Chetia, P. (2018). Emergence of antibiotic resistant *Shigella* species: a matter of concern. *Journal of infection and public health*, 11(4), 451-454.

Rajakumar, K., Sasakawa, C., & Adler, B. (1997). Use of a novel approach, termed island probing, identifies the *Shigella flexneri* she pathogenicity island which encodes a homolog of the immunoglobulin A protease-like family of proteins. *Infection and immunity*, 65(11), 4606-4614.

Ray, K., Bobard, A., Danckaert, A., Paz-Haftel, I., Clair, C., Ehsani, S., ... & Enninga, J. (2010). Tracking the dynamic interplay between bacterial and host factors during pathogen-induced vacuole rupture in real time. *Cellular microbiology*, 12(4), 545-556.

Ray, K., Marteyn, B., Sansonetti, P. J., & Tang, C. M. (2009). Life on the inside: the intracellular lifestyle of cytosolic bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 7(5), 333-340.

Russo, B. C., Stamm, L. M., Raaben, M., Kim, C. M., Kahoud, E., Robinson, L. R., ... & Goldberg, M. B. (2016). Intermediate filaments enable pathogen docking to trigger type 3 effector translocation. *Nature microbiology*, 1(4), 1-11.

Sansonetti, P. J. (2001). Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by *Shigella*, making sense of prokaryote-eukaryote cross-talks. *FEMS microbiology reviews*, 25(1), 3-14.

Sansonetti, P. J. (2004). War and peace at mucosal surfaces. *Nature Reviews Immunology*, 4(12), 953-964.

Sansonetti, P. J., Arondel, J., Cantey, J. R., Prévost, M. C., & Huerre, M. (1996). Infection of rabbit Peyer's patches by *Shigella flexneri*: effect of adhesive or invasive bacterial phenotypes on follicle-associated epithelium. *Infection and immunity*, 64(7), 2752-2764.

- Sasakawa, C., Buysse, J. M., & Watanabe, H. (1992). The large virulence plasmid of *Shigella*. *Pathogenesis of shigellosis*, 21-44.
- Schmidt, H., & Hensel, M. (2006). Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), 257-257.
- Schroeder, G. N., & Hilbi, H. (2008). Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clinical microbiology reviews*, 21(1), 134-156.
- Senerovic, L., Tsunoda, S. P., Goosmann, C., Brinkmann, V., Zychlinsky, A., Meissner, F., & Kolbe, M. (2012). Spontaneous formation of IpaB ion channels in host cell membranes reveals how *Shigella* induces pyroptosis in macrophages. *Cell death & disease*, 3(9), e384-e384.
- Skoudy, A., Mounier, J., Aruffo, A., Ohayon, H., Gounon, P., Sansonetti, P., & Tran Van Nhieu, G. (2000). CD44 binds to the *Shigella* IpaB protein and participates in bacterial invasion of epithelial cells. *Cellular microbiology*, 2(1), 19-33.
- Sorbara, M. T., Foerster, E. G., Tsalikis, J., Abdel-Nour, M., Mangiapane, J., Sirluck-Schroeder, I., ... & Philpott, D. J. (2018). Complement C3 drives autophagy-dependent restriction of cyto-invasive bacteria. *Cell Host & Microbe*, 23(5), 644-652.
- Stensrud, K. F., Adam, P. R., La Mar, C. D., Olive, A. J., Lushington, G. H., Sudharsan, R., ... & Picking, W. D. (2008). Deoxycholate interacts with IpaD of *Shigella flexneri* in inducing the recruitment of IpaB to the type III secretion apparatus needle tip. *Journal of Biological Chemistry*, 283(27), 18646-18654.
- Stevens, J. M., Galyov, E. E., & Stevens, M. P. (2006). Actin-dependent movement of bacterial pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 4(2), 91-101.
- Sureshbabu J., & Venugopalan P. (2019). *Shigella* Infection: Practice Essentials, Pathophysiology, Epidemiology; Retrieved from <https://emedicine.medscape.com/article/968773-overview>.
- Sureshbabu, J., Venugopalan, P., & Abuhammour, W. (2018). *Shigella* Infection Medication. Retrieved from <https://emedicine.medscape.com/article/968773-medication>

- Suzuki, T., Nakanishi, K., Tsutsui, H., Iwai, H., Akira, S., Inohara, N., ... & Sasakawa, C. (2005). A novel caspase-1/toll-like receptor 4-independent pathway of cell death induced by cytosolic *Shigella* in infected macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14), 14042-14050.
- Torres, A. G. (2004). Current aspects of *Shigella* pathogenesis. *Revista latinoamericana de microbiologia*, 46(3), 89-97.
- Troeger, C., Blacker, B. F., Khalil, I. A., Rao, P. C., Cao, S., Zimsen, S. R., ... & Reiner Jr, R. C. (2018). Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(11), 1211-1228.
- Turner, S. A., Luck, S. N., Sakellaris, H., Rajakumar, K., & Adler, B. (2003). Molecular epidemiology of the SRL pathogenicity island. Antimicrobial agents and chemotherapy, 47(2), 727-734.
- Wei, T., & Dai, H. (2014). Quantification of GFP signals by fluorescent microscopy and flow cytometry. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1163, 23–31.
- Wells, T. J., Tree, J. J., Ulett, G. C., & Schembri, M. A. (2007). Autotransporter proteins: novel targets at the bacterial cell surface. *FEMS microbiology letters*, 274(2), 163-172.
- Wilson, J. M., de Hoop, M., Zorzi, N., Toh, B. H., Dotti, C. G., & Parton, R. G. (2000). EEA1, a tethering protein of the early sorting endosome, shows a polarized distribution in hippocampal neurons, epithelial cells, and fibroblasts. *Molecular biology of the cell*, 11(8), 2657–2671.
- World Health Organization. (2005). Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to *Shigella dysenteriae* type 1.
- World Health Organization. (2017). The selection and use of essential medicines: report of the WHO expert committee, 2017 (including the 20th WHO model list of essential medicines and the 6th model list of essential medicines for children).

- World Health Organization. (2017, May 2). *Diarrhoeal disease*. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>.
- Xu, D., Zhang, W., Zhang, B., Liao, C., & Shao, Y. (2016). Characterization of a biofilm-forming *Shigella flexneri* phenotype due to deficiency in Hep biosynthesis. *PeerJ*, 4, e2178.
- Yang, F., Yang, J., Zhang, X., Chen, L., Jiang, Y., Yan, Y., ... & Jin, Q. (2005). Genome dynamics and diversity of *Shigella* species, the etiologic agents of bacillary dysentery. *Nucleic acids research*, 33(19), 6445-6458.
- Yates, R. M., Hermetter, A., & Russell, D. G. (2005). The kinetics of phagosome maturation as a function of phagosome/lysosome fusion and acquisition of hydrolytic activity. *Traffic*, 6(5), 413-420.
- Zumsteg, A. B., Goosmann, C., Brinkmann, V., Morona, R., & Zychlinsky, A. (2014). IcsA is a *Shigella flexneri* adhesin regulated by the type III secretion system and required for pathogenesis. *Cell host & microbe*, 15(4), 435-445.
- Zurawski, D. V., Mitsuhashi, C., Mummy, K. L., McCormick, B. A., & Aurelli, A. T. (2006). OspF and OspC1 are *Shigella flexneri* type III secretion system effectors that are required for postinvasion aspects of virulence. *Infection and immunity*, 74(10), 5964-5976.
- Zurawski, D. V., Mummy, K. L., Badea, L., Prentice, J. A., Hartland, E. L., McCormick, B. A., & Aurelli, A. T. (2008). The NleE/OspZ family of effector proteins is required for polymorphonuclear transepithelial migration, a characteristic shared by enteropathogenic *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* infections. *Infection and immunity*, 76(1), 369-379.
- Zychlinsky, A., Kenny, B., Ménard, R., Prévost, M. C., Holland, I. B., & Sansonetti, P. J. (1994). IpaB mediates macrophage apoptosis induced by *Shigella flexneri*. *Molecular microbiology*, 11(4), 619-627.