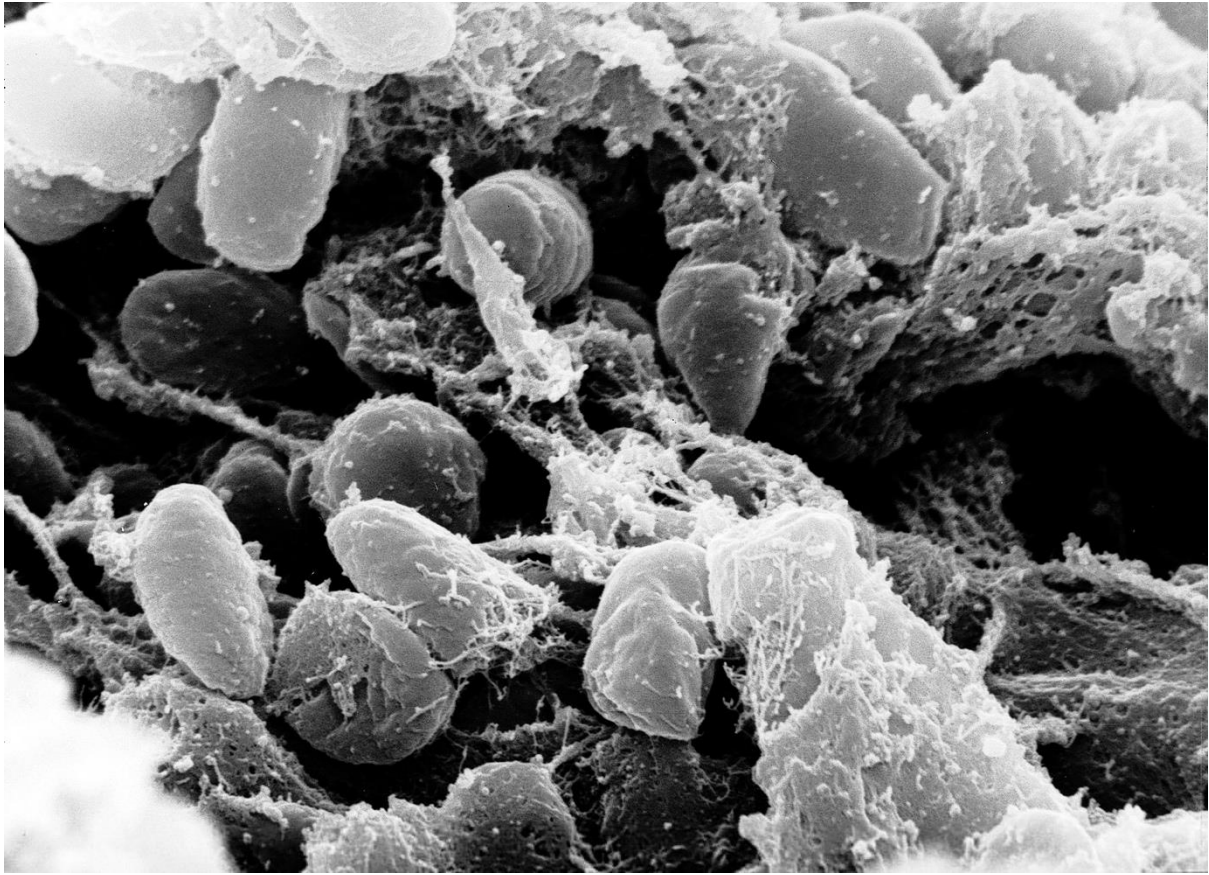


TEMA 18. Género *Yersinia*.



Sara Barrero Valer

Uxía Pérez de José

Miguel Ángel Salazar Jurado

Miguel Ángel Serrano Lope



FACULTAD DE
CIENCIAS

Microbiología clínica

Grado en Bioquímica

Departamento de Biología Molecular

JMRR-UAM © 2020

ÍNDICE

- 1. Introducción.**
 - 1.1. Características del género *Yersinia*.
 - 1.2. Enfermedad causada por *Y. enterocolítica*.
- 2. Factores de virulencia de *Yersinia enterocolítica* codificadas en el cromosoma.**
 - 2.1. La enterotoxina Yst.
 - 2.2. La internalina o invasina (Inv).
- 3. Factores de virulencia codificados en el plásmido pYV.**
 - 3.1. Aparato de secreción de las Yops. Inyectosoma Ysc.
 - 3.2. Chaperonas citosólicas.
 - 3.3. Control de la inyección.
 - 3.4. Efecto de las proteínas Yops sobre células del hospedador.
 - 3.4.1. Inhibición de la fagocitosis.
 - 3.4.2. Bloqueo de la respuesta inflamatoria.
 - 3.4.3. Inducción de la apoptosis en macrófagos.
 - 3.5. La proteína YadA.
- 4. Regulación de los genes de virulencia.**
- 5. Alteraciones producidas por *Yersinia pestis* en su vector para favorecer la transmisión.**
- 6. Referencias.**

1. INTRODUCCIÓN.

En el período 1346-1352, Europa sufrió la pérdida de unos 20 millones de personas, lo que correspondía a cerca de la mitad de la población que poseía en ese momento. La enfermedad responsable de tan macabra estadística fue la peste bubónica, a la que, oportunamente, se denominó **“Peste Negra”**, designación que ha conservado a lo largo de la historia.

Los orígenes de esta enfermedad son algo **inciertos**, pero se cree que pudo originarse en alguna provincia de la antigua China durante la dinastía Yuang, en la cual se llevaron a cabo invasiones en las que arrojaban cadáveres infectados con la peste, ayudándose de catapultas sobre las murallas favoreciendo así la propagación de la enfermedad. Desde aquel entonces existía un tráfico y comercio constante de mercancías y personas que cubría China, pasando por Asia central hasta llegar a Europa (Fig. 1).

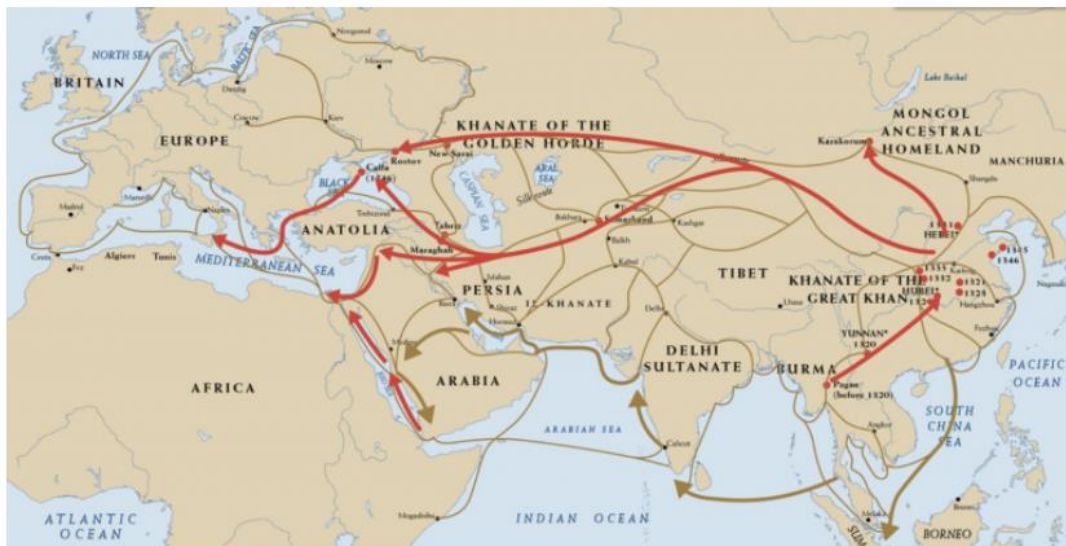


Figura 1. Los orígenes de la enfermedad se centran en China desde donde se extendió hacia Europa pasando por Asia central y Rusia. El comercio y la movilidad de las personas favorecieron la propagación de la peste. Imagen obtenida de reporteindigo.com (página de Internet).

Entre el 70 y el 80 % de los que contrajeron la peste en el siglo XIV murieron por ello. Los síntomas se presentaban con tal gravedad que presagiaban la muerte en un plazo de cinco días. El nombre de **peste bubónica** procede de uno de los primeros signos clínicos de la enfermedad: la aparición de grandes hinchazones dolorosas (llamadas bubones) en los nódulos linfáticos de la axila, cuello o ingle de la víctima. Por regla general, tres días después de la aparición de los bubones los enfermos se veían asaltados por fiebre alta, acompañada de delirio y de la presencia de **manchas negras**, resultado de hemorragias subcutáneas.

Por extraño que parezca, pese a la frecuente presencia de la enfermedad y el elevado precio que se cobraba, nadie disponía entonces de indicios sobre su naturaleza, su causa última o el mecanismo de difusión. Durante el período de la Peste Negra, las gentes solían atribuir el mal a combinaciones astrológicas desfavorables o aires o vapores pútridos (“**miasmas**”), nada de lo cual podía traducirse en programas preventivos de ninguna clase. En algunos textos de la época incluso se hablaba de la llegada del Apocalipsis.

Por fin, en 1894, el bacteriólogo francés **Alexandre Yersin** descubrió que la peste bubónica estaba causada por una bacteria gram-negativa, ***Yersinia pestis***.

Se piensa que la peste evolucionó a partir de una bacteria que vivía en el suelo y que adquirió por transferencia horizontal un segmento de ADN que le confirió la capacidad de infectar a humanos.

Los bacilos de la peste se encuentran con baja frecuencia en numerosas poblaciones de **roedores** salvajes de todo el mundo; se transmiten entre ellos por las **pulgas**. En el caso de la peste bubónica, el insecto responsable suele ser la pulga oriental de la rata, ***Xenopsylla cheopis***. Cuando pica a una rata infectada, ingiere los bacilos, que proliferan en su tubo digestivo y lo obstruyen; la pulga, incapaz de ingerir sangre, se vuelve rabiosamente hambrienta y, en sus frenéticos intentos de alimentarse, pica repetidamente al hospedador, regurgitando más bacilos en cada picadura. Los puntos de inyección actúan como focos de diseminación de los bacilos. Si el hospedador muere, cosa probable, la pulga se traslada al roedor más cercano. De este modo la enfermedad se propaga con rapidez.

Conforme disminuye el número de ratas vivas, las pulgas parasitan **hospedadores de sangre caliente** a los que normalmente no atacarían, como seres humanos y animales domésticos, y se desencadena una **epidemia**. En el Medievo, ambas poblaciones se encontraban en contacto íntimo, las personas vivían rodeadas de ratas, tanto en las áreas urbanas como en las rurales.

Una vez introducida la enfermedad entre la población humana, puede transmitirse de una persona a otra a través de la **inhalación de gotitas** infectadas expulsadas con la respiración. Eso no quita que la manera habitual de propagación sea la picadura de pulga. De hecho, la enfermedad no subsiste al acabarse los roedores y sus pulgas.

Con frecuencia, la condición esencial para que se produzca una **epidemia** (un brote en la población humana) es la existencia de una **epizootia** (un brote en la población animal, en este caso de roedores).

En épocas posteriores, 1720-22, se dieron brotes virulentos en Marsella y otras zonas de la Provenza francesa. A partir de entonces, los brotes se fueron haciendo menos frecuentes hasta desaparecer. Aunque *Y. pestis* sigue infectando a poblaciones de roedores en zonas endémicas. Actualmente las infecciones en humanos son esporádicas y muy limitadas. En la actualidad, se diagnostican unos **2000**

casos al año en todo el mundo siendo más común en **Estados Unidos, Madagascar, China, India y América del Sur**. Con el tratamiento adecuado, sin embargo, el 85% de las víctimas actuales sobrevive a la enfermedad. Los antibióticos actuales son efectivos frente a la bacteria *Y. pestis*.

¿Cuál fue la causa de la disminución en la mortalidad?

Se han dado todo tipo de hipótesis, entre ellas la que se ha venido a referir como la **hipótesis bacteriológica**. Esta hipótesis propone la aparición de una **nueva especie** de *Y. pestis*, evolucionada en sentido menos virulento que la estirpe anterior. Al ser menos dañina, habría actuado como una vacuna, confiriendo a los animales y a las personas infectadas una relativa inmunidad frente a las estirpes más virulentas de la misma bacteria.

La hipótesis bacteriológica resulta aceptable por varias razones. Primero, está de acuerdo con el aforismo propuesto por el patólogo norteamericano **Theobald Smith**, que dice: “las manifestaciones patológicas sólo constituyen incidentes en el desarrollo de un proceso de parasitación”; esto es, que, a largo plazo, las formas más suaves de enfermedad tienden a desplazar a las más virulentas.

Segundo, la hipótesis viene apoyada por la existencia de un bacilo de parentesco muy próximo al de la peste, *Y. pseudotuberculosis*, que no induce manifestaciones visibles de la enfermedad en ratas pero les confiere un elevado grado de inmunidad frente a la peste.

1.1. Características del género *Yersinia*.

Las especies del género *Yersinia* se definen como **bacilos** o cocobacilos **gramnegativos**, de 0,5-0,8 mm de diámetro y 1-3 mm de longitud.

Entre las muchas especies del género *Yersinia*, sólo *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* y *Y. enterocolitica* están adaptadas para multiplicarse a expensas de un hospedador que está aún vivo, y son patógenos de humanos. *Y. pestis* es inoculada a través de la picadura de pulga mientras que las otras dos son normalmente transmitidas como contaminaciones alimentarias.

Estas bacterias tienen un tropismo por tejidos linfoides y una destacable habilidad para resistir la respuesta inmune no específica. Las **principales estrategias** consisten en:

1. **Evitar la lisis por complemento.**
2. **Evitar la fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares y macrófagos.**
3. **Formar microcolonias extracelulares en los tejidos infectados.**

1.2. Enfermedad causada por *Y. enterocolítica*.

Y. pestis, el agente de la peste, y *Y. pseudotuberculosis* son patógenos esencialmente de roedores. *Y. enterocolítica* es un patógeno común de humanos.

La enfermedad ocasionada por *Y. enterocolítica* se inicia por la ingestión de alimentos o agua contaminada.

En **sistemas modelo**, conejo y ratón, la enfermedad procede mediante translocación a través del epitelio del íleon o del colon hacia la región de la submucosa. En el íleon del ratón, hay alguna evidencia que indica que *Y. enterocolítica* se encuentra dentro de una subserie de células llamadas **células M**, localizadas sobre los parches linfoides de Peyer, que se encuentran alineados a lo largo del tracto gastrointestinal. En los animales modelo, *Y. enterocolítica* drena en los **nódulos linfáticos mesentéricos**, y gran número de bacterias se detectan en estos órganos linfoides tras 24 h de la infección inicial. Las bacterias se localizan exclusivamente de **forma extracelular** y continúan fuera de las células del hospedador durante toda la enfermedad. En los distintos tejidos infectados, la bacteria forma **microcolonias** que son **resistentes a la fagocitosis** por macrófagos y neutrófilos.

En las infecciones de humanos, parece que la enfermedad termina al tiempo de infectar los **nódulos linfáticos mesentéricos**. En las personas, la infección puede causar síndromes gastrointestinales de severidad variada, que van desde una diarrea moderada auto-limitada a adenitis (=Inflamación de los ganglios linfáticos) mesentérica que recuerda a la apendicitis.

Infecciones sistémicas son inusuales con *Y. enterocolítica*, pero con frecuencia, asociados a infecciones bacterianas moderadas o inaparentes, se disparan desórdenes autoinmunes. Entre éstos se encuentran la **tiroiditis** y la **artritis reactiva**. En Europa, el cerdo es la fuente más común de contaminación con *Y. enterocolítica*.

2. FACTORES DE VIRULENCIA DE *YERSINIA ENTEROCOLITICA* CODIFICADAS EN EL CROMOSOMA.

2.1. La enterotoxina Yst.

En el **cromosoma** de *Y. enterocolítica* se encuentra codificada una **enterotoxina** estable al calor, **Yst**. Es un péptido de 30 aminoácidos que se asemeja a la enterotoxina estable al calor STI de *E. coli* y a la guanilina, un activador endógeno de la guanilato ciclasa intestinal (Fig. 2).

Estas enterotoxinas son péptidos que al unirse a los **receptores C** de la **guanilato-cliclasa**, estimulan la producción de monofosfato de guanosina cíclica que a su vez activa una serie de acontecimientos celulares intracelulares que resultan finalmente en la secreción transepitelial de iones Cl⁻ y K⁺ desde los enterocitos aumentando así el arrastre pasivo de agua a la luz del intestino.

La **enterotoxina Yst** se sintetiza como un polipéptido de 71 aminoácidos. Los 30 aminoácidos C-terminales corresponden a la toxina tal y como se extrae del sobrenadante de los cultivos de la bacteria. Los 19 aminoácidos N-terminales tienen las propiedades de un péptido señal y los 22 residuos centrales son retirados durante o después del proceso de secreción.

En vista de la similitud tan grande entre Yst y STI y la asociación con serotipos patogénicos, resulta tentativo especular que la producción de Yst es responsable de las **manifestaciones diarréicas** asociadas con la yersiniosis. En el **modelo ratón**, al menos, se ha demostrado que la toxina Yst es responsable de la diarrea ya que actúa cambiando drásticamente la fisiología de las células del epitelio intestinal (*Fig. 2*).

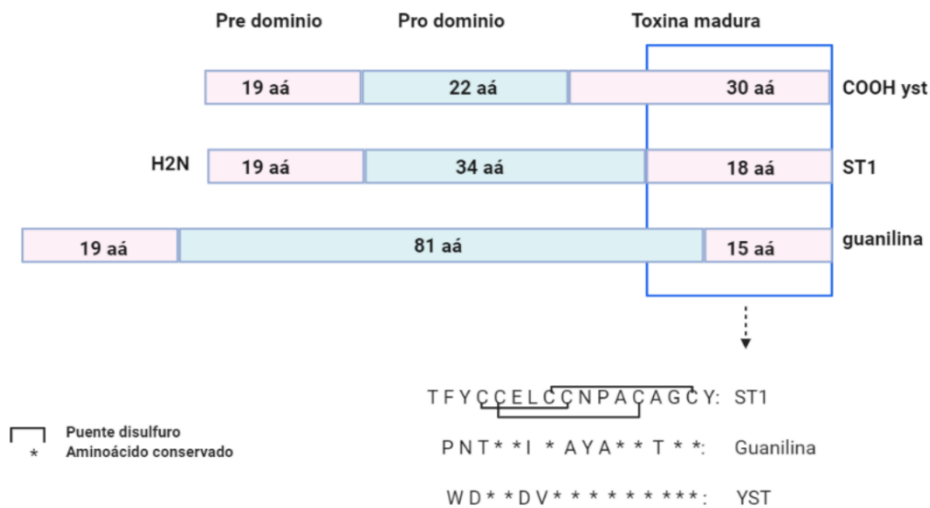


Figura 2. Imagen realizada en Biorender.

2.2. La internalina o invasina (Inv).

In vivo, la **internalina Inv** parece desempeñar un papel vital en promover la entrada en el tejido intestinal durante la etapa inicial de la infección. Favorece el proceso de **transcitosis** a nivel de las **células M**.

El gen *inv* es muy similar a varios *loci* asociados con interacciones bacteria-célula hospedadora que han sido encontrados en una variedad de patógenos entéricos gram-negativos como la *E. coli* enteropatogénica. El producto de *inv*, predicho por tener 986 aminoácidos, está expuesto sobre la superficie de la bacteria. Las bacterias que expresan la invasina se unen fuertemente a la superficie de células de mamífero.

La invasina parece interactuar con las integrinas situados sobre las células del hospedador. Las integrinas son una familia de proteínas formadas por más de 20 proteínas heterodiméricas ab implicadas en la unión a proteínas de la matriz extracelular y en interacciones célula a célula (Fig. 3).

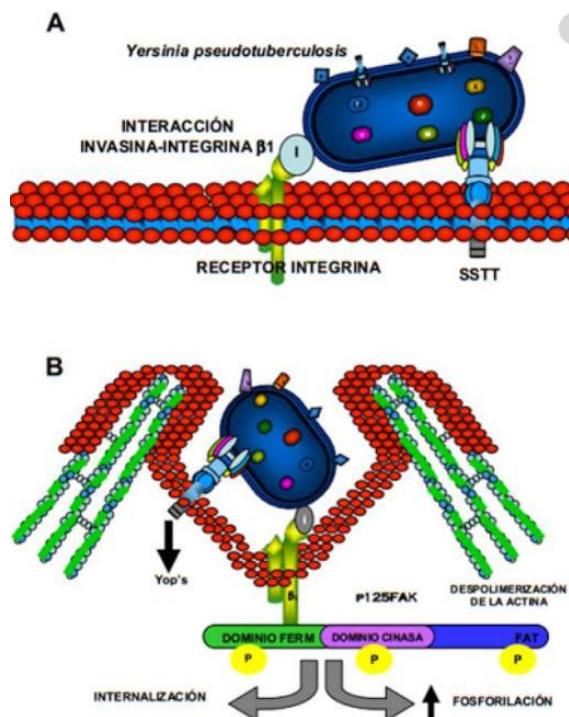


Figura 3. Las invasinas de la superficie de *Yersinia pseudotuberculosis* interactúan con la integrina B1 de las células M del intestino. En ensayos experimentales *in vitro* en diferentes líneas celulares se ha demostrado la inducción de eventos de señalización por fosforilación de tirosinas, lo que activa el proceso de captación de la bacteria. Imagen obtenida de Cerdanars Lilia (2008).

3. FACTORES DE VIRULENCIA CODIFICADOS EN EL PLÁSMIDO PYV.

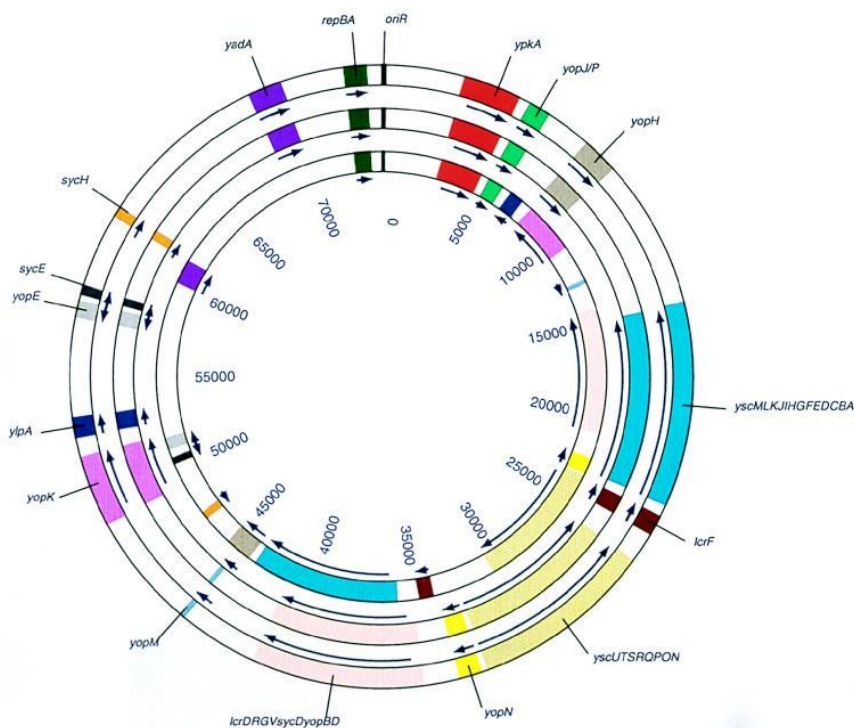
Las especies patogénicas de *Yersinia* presentan como particularidad un **plásmido** de 70-kb denominado **pYV** ("plasmid *Yersinia* Virulence"). Para cada una de las especies de *Yersinia* de interés recibe un nombre particular, dadas sus singularidades (Fig. 4):

- *Y. pestis*, el plásmido se llama pCD1.
- *Y. pseudotuberculosis*, el plásmido se llama pIB1.
- *Y. enterocolítica*, el plásmido se llama pYVeO:9.

Demostración del papel del plásmido en la virulencia de *Yersinia*.

La importancia de este plásmido, y de sus genes, se puso de manifiesto en estudios de infección en animales utilizando cepas de *Yersinia* “curadas” del plásmido (**cepas P⁻**). Así, se vio que las cepas P⁻ eran capaces de establecer **infecciones intestinales** e incluso acceder a los parches de Peyer, mostrando que los genes codificados en este plásmido no son requeridos para atravesar la barrera intestinal. Sin embargo, las cepas P⁻ **desaparecen** de estos **nódulos linfáticos** a los pocos días mientras que las cepas P⁺ continúan creciendo. Las **funciones** principales de las **proteínas codificadas** en este replicón son las de **prevenir la fagocitosis** de la bacteria y la de **evadir la respuesta inmunitaria** tanto específica como innata del hospedador.

Figura 4. Representación de los mapas genéticos de diferentes plásmidos de tipo pYV para *Yersinia*. El círculo externo se corresponde con pCD1 de *Y. pestis*, el intermedio con pIB1 de *Yersinia pseudotuberculosis* y el interior pYVeO:9 de *Y. enterocolitica*. Así, en cada uno de los tres mapas genéticos se indica para cada posición qué proteína se encuentra codificada en cada uno de los tres pYV. Imagen obtenida de García et al (1998).



En el **plásmido de virulencia** se encuentran codificadas las proteínas **Yop efectoras** y las proteínas necesarias para inyectarlas dentro de las células del hospedador. Asimismo, el virulón Yop es un arquetipo de **sistemas de secreción tipo III**.

3.1. Aparato de secreción de las Yops. Inyectoroma Ysc.

Hasta el momento se han identificado 30 genes **Ysc** (“Yop secretion”) implicados en el proceso de liberación de Yop’s. Su origen es una duplicación del operón que codifica para la formación del flagelo. Muchos de estos genes son homólogos a otros sistemas de secreción tipo III de otros patógenos

bacterianos como es el caso de organismos pertenecientes a los géneros *Shigella*, *Salmonella*, *Xanthomonas* y *Pseudomonas* (los dos últimos patógenos de plantas).

El aparato de secreción es un orgánulo que consiste de un **cuerpo basal**, que atraviesa la capa de peptidoglicano y las dos membranas bacterianas, y que se continúa con una estructura similar a una **aguja** que sale de la bacteria (Fig. 5).

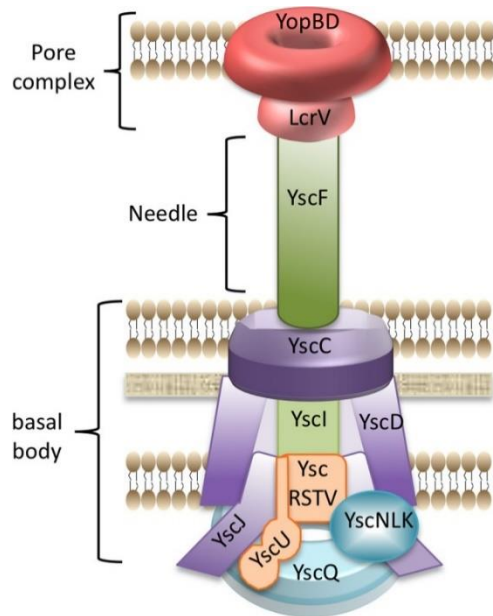


Figura 5. Estructura y componentes del inyectosoma. Sobre la superficie bacteriana se distribuye el cuerpo basal, formado por un gran número de proteínas Ysc que están implicadas en estabilizar al complejo en la membrana interna, externa y periplasma de la bacteria. Sobre esta estructura se dispone la aguja, o jeringa, que forma un fino canal que conecta directamente con el poro definido por YopBD en la membrana plasmática del hospedador. Imagen obtenida de Dewoody et al (2013).

La formación del complejo no es algo trivial, sino que sigue unas **etapas** bien caracterizadas (Fig. 6). Estas pueden definirse como:

- **Etapas Inicial.** En este primer estadio el cuerpo basal se encarga del reconocimiento de los **primeros sustratos** que el patógeno ha de secretar hacia el citosol del hospedador que va a parasitar. Su presencia es importante para que se **constituya la unidad estructural** en forma de aguja del complejo. Cuando su formación se ha completado, la proteína YscU se autoproteoliza y permite el paso a la siguiente etapa.
- **Etapas intermedia.** En esta fase **YopN** se asocia con el cuerpo basal y permite la **secreción** de una primera remesa de proteínas efectoras. Son los denominados **sustratos intermedios**, que son requeridos para formar el poro de translocación. En el momento en que se produce el contacto con la membrana del hospedador, YopN se libera del cuerpo basal y se progresa a la última fase.
- **Etapas final.** En último lugar se constituye el canal mediado por la aguja y el poro de translocación. Para esta etapa se han planteado **2 modelos**:
 - **Modelo en un solo paso:** el complejo del poro se ensamblaría con la punta de la aguja constituyendo directamente el canal.

- **Modelo en dos pasos:** los sustratos tardíos se secretan al espacio extracelular e interactúan con otras proteínas, de manera que se asociarían a las proteínas del poro, que difunden hasta la membrana del hospedador para la liberación de dichas proteínas.

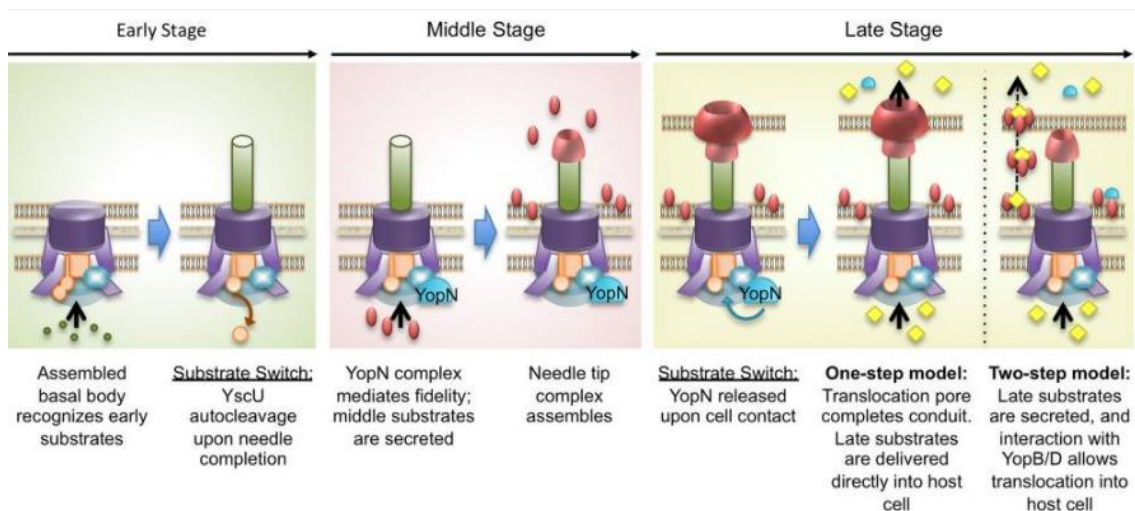


Figura 6. Esquema del proceso de formación del inyectosoma en *Yersinia*. Existen 3 etapas: inicial, intermedia y tardía. El transcurso a lo largo de estas fases es lo que permite que en último lugar las proteínas efectoras Yop alcancen el citosol del hospedador, ya bien en un solo paso (**One-step model**) o en dos (**Two-step model**). Imagen obtenida de Dewoody et al (2013).

El proceso de secreción también requiere a **YscN**, una proteína de 47,8-kDa con motivos de unión a ATP que recuerda a la subunidad catalítica β de la protón-translocasa F_0F_1 (Fig. 7). Se han planteado diversos modelos acerca de cómo esta proteína YscN media la secreción de otras proteínas efectoras.

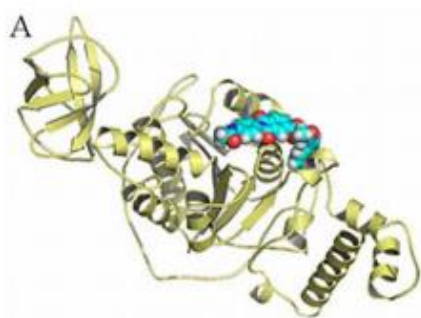


Figura 7. Resolución estructural del plegamiento de la proteína Yscn de *Yersinia*. El esqueleto coloreado de amarillo indica la configuración espacial de YscN, mientras que la molécula asociada (ATP) es un agente que determina la posición del centro catalítico. Imagen obtenida de Swietnicki et al (2011).

Así pues, se plantea que la versión soluble de **YscN** (hexámero) sería la encargada de unir a la proteína Yop efectora que se pretende secretar. En este proceso podría intervenir el T3SC (Sistema de Secreción Tipo 3), aunque hay observaciones que indican que también puede producirse su secreción de forma independiente. El caso es que una vez se ha producido la unión del efector y se forma el complejo

YscN-T3SC-Yop, este se desplazaría hacia la región de la membrana en la que se encuentra el inyectosoma (Fig. 8).

Mediante la actividad ATP-asa de YscN tendría lugar la liberación al T3SC, que es el encargado de transmitir a la proteína efectora hacia el interior de la célula blanco.

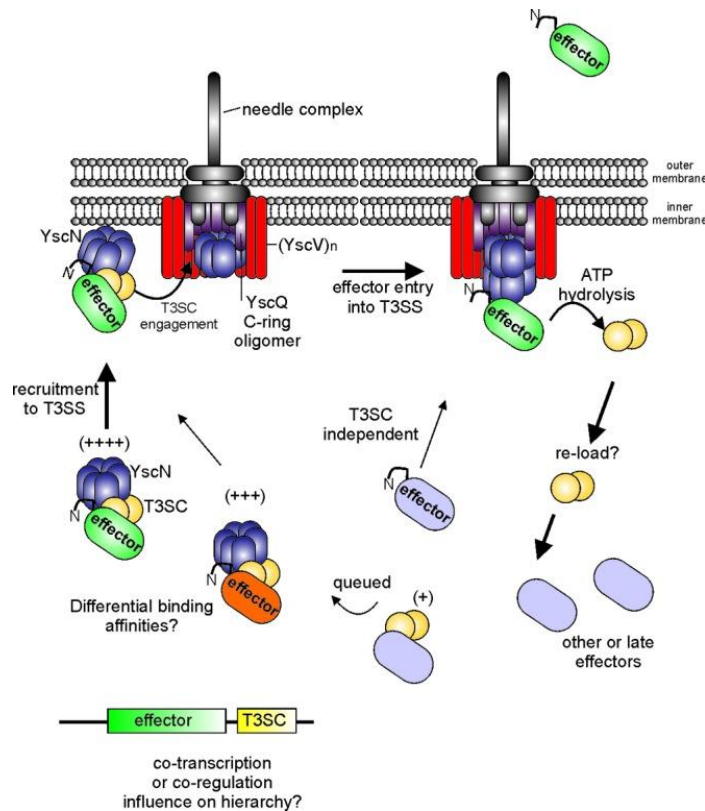


Figura 8. Modelos planteados sobre cómo podría actuar YscN en el proceso de transporte de proteínas efectoras desde el citosol del patógeno al del hospedador. En la parte de la izquierda se recoge el modelo explicado anteriormente mediado por YscN y T3SC; a la derecha se esquematiza cómo las proteínas efectoras podrían liberarse vía el inyectosoma sin que fuesen reclutadas específicamente. Imagen obtenida de Thomas et al (2012).

Mientras no exista contacto con una célula eucariótica, una **válvula de parada**, posiblemente hecha con YopN, TyeA y LcrG, bloquea el canal de secreción Ysc (Fig. 9). Tras el contacto con la célula blanco eucariótica, la bacteria se ancla fuertemente a través de la interacción entre sus **adhesinas YadA e Inv** y las **β -integrinas**, y el canal de secreción se abre. YopB y YopD forman un poro en la membrana plasmática de la célula blanco. Así, el aparato Ysc sirve como un conducto a través del cual las proteínas exportadas atraviesan las dos membranas y la barrera de péptidoglicano en una sola etapa.

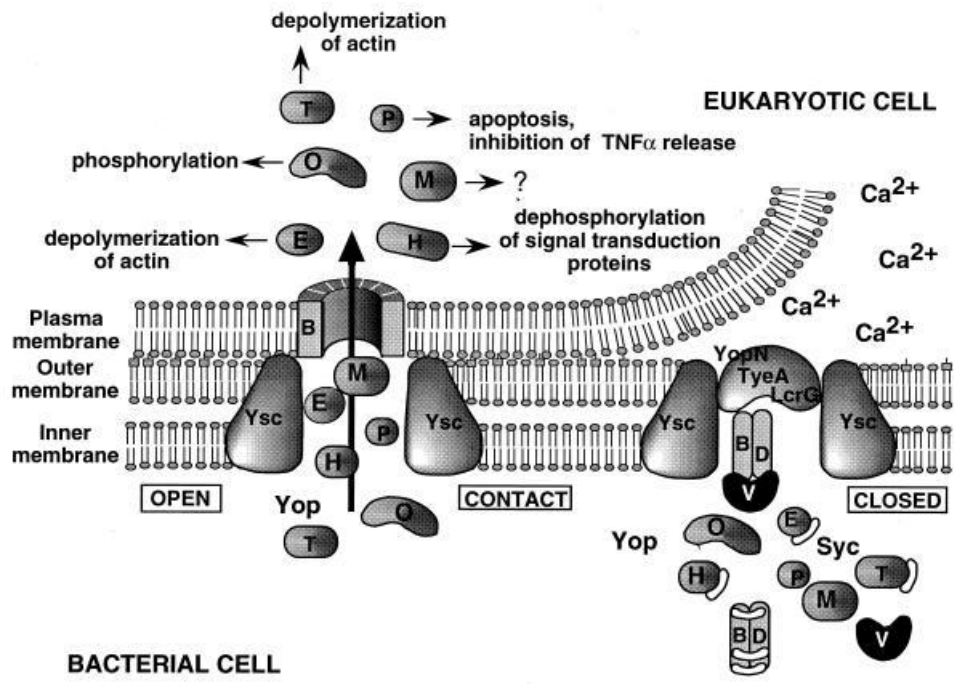


Figura 9. Ilustración sobre los cambios conformacionales que se producen en el inyectosoma. A partir de un estado cerrado en el que proteínas como TyeA, LcrG o YopN bloquean el flujo de proteínas a través del canal por impedimento estérico, se puede producir la apertura del flujo a las proteínas efectoras. Los bloqueantes se retirarían gracias a la unión del inyectosoma en la membrana del hospedador. Imagen obtenida de Cornelis et al (1998).

3.2. Chaperonas citosólicas.

Otra de las peculiaridades del sistema de secreción Yop es que utiliza **chaperonas citoplasmáticas** que son específicas para Yops individuales. Se llaman **Syc** (for "specific yop chaperone") seguido de la letra de la correspondiente Yop. Si un gen *syc* es mutado, la correspondiente Yop no es exportada pero la secreción de otras Yops no es afectada. Por su unión a la Yop, la chaperona Syc asegura la estabilidad y conformación apropiada de la proteína. En el momento de la secreción, la chaperona es liberada de su Yop pareja.

3.3. Control de la inyección.

Yersinia secreta las Yops **in vitro** bajo condiciones de **falta de Ca²⁺**. Pero se piensa que **in vivo** la señal disparadora del proceso va a ser el **contacto con la célula eucariótica**. Varios trabajos indican que la liberación de las Yops es un fenómeno "**direccional**", en el sentido de que la mayoría de la carga es liberada dentro de la célula eucariótica y que existe poco escape.

Concretamente, lo que se ha visto experimentalmente es que la presencia de Ca^{2+} a niveles milimolares bloquea claramente la secreción de las proteínas efectoras Yop. Sin embargo, en el momento en el que se retira el Ca^{2+} del medio se revierte hacia la secreción. *In vivo* los estudios van en la misma línea. Los niveles de **calcio** son suficiente para **prevenir la secreción de Yop**, hasta que la bacteria contacta con una célula eucariótica.

3.4. Efecto de las proteínas Yops sobre las células del hospedador.

Hasta el momento, se ha encontrado que las proteínas inyectadas por el aparato de secreción tipo III en el citoplasma eucariótico van a tener un papel clave en diversos procesos:

- **Inhibición de la fagocitosis.**
- **Bloqueo de la respuesta inflamatoria.**
- **Inducción de apoptosis en macrófagos.**

3.4.1. Inhibición de la fagocitosis.

A la inhibición de este proceso contribuyen cuatro proteínas Yop: **YopH, YopT, YopE y YopO**.

YopH

YopH es una **tirosín-fosfatasa** que desfosforila p130cas, paxilina y la quinasa de adhesión focal (FAK o “focal adhesion kinase”). Esto conduce a la rotura de la adhesión focal, lo que resulta en una inhibición de la fagocitosis (*Figura 10*).

La proteína Fyb, de unión a Fyn, y la proteína SKAP-HOM interaccionan entre sí y resultan fosforiladas en respuesta a la adhesión del macrófago, y su desfosforilación por YopH le permite a Yersinia interferir en la vía de transducción de señales regulada por adhesión en macrófagos (*Fig. 10*). Así, YopH también **bloquea otras respuestas** asociadas con la fagocitosis, como son la producción de **radicales libres de oxígeno** por macrófagos y neutrófilos.

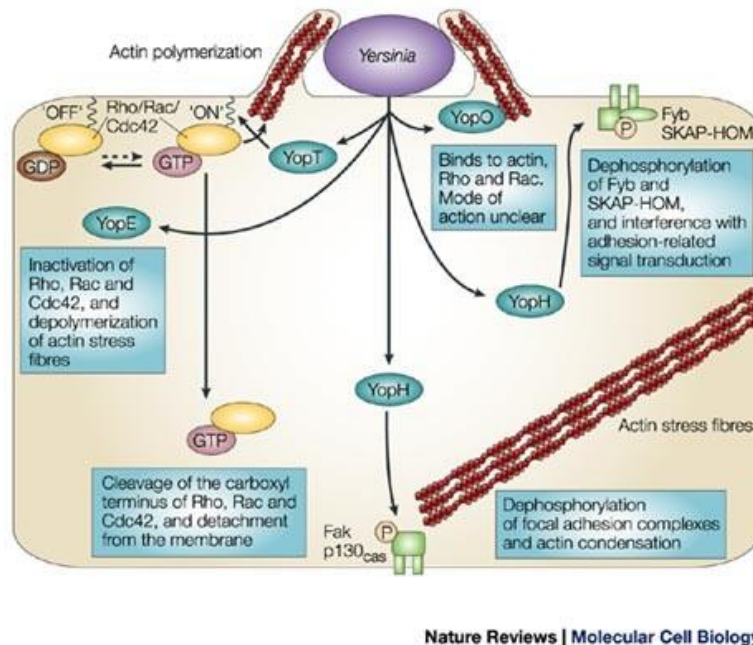


Figura 10. Proteínas Yop implicadas en la limitación de la fagocitosis y otras funciones celulares del macrófago. En la imagen se recoge la inhibición que genera YopH sobre la señalización que ejerce la adhesión focal y a nivel de reducción en la producción de ROS. También se indica la función de YopT como factor proteolítico que rompe el anclaje prenilo de las Rho-GTPasas; YopE inactiva a Rho, Rac y Cdc42 porque funciona como GAP; o YopO que es un secuestrador de tipo GDI. Imagen obtenida de Cornelis et al (2002).

Las otras tres Yops efectoras que **inhiben fagocitosis (YopE, YopT y YopO)** actúan sobre **GTPasas** de la familia Rho. Estas GTPasas pertenecen a un numeroso grupo de GTPasas eucarióticas que actúan como interruptores moleculares y controlan eventos clave en la célula a través de la oscilación entre sus formas “on” y “off” de acuerdo con el nucleótido unido. El reemplazamiento del nucleótido es catalizado por proteínas especializadas, entre las que se incluyen las proteínas activadoras de GTPasa (**GAPs**) y el factor intercambiador de nucleótidos de guanina (**GEFs**). Las proteínas de la familia Rho están ancladas a la cara interna de la membrana plasmática de la célula a través de un grupo prenilo que está unido covalentemente al extremo carboxilo-terminal de la proteína. Este anclaje es esencial para su función. Los miembros de la familia Rho que están implicados en controlar la **dinámica del citoesqueleto de actina** son **Rho, Rac y Cdc42**. (Ver Caja 1)

CAJA 1. Funcionamiento de las Rho-GTPasas e importancia biológica.**“El ciclo de las GTPasas y la organización del citoesqueleto de actina.”**

El estado de la actina fluctúa entre actina monomérica soluble (G-actina) y la actina polimerizada (F-actina), especialmente durante la fagocitosis. **Arp2/3** (Figura 11) es un complejo proteico que se une al extremo de la F-actina y recluta complejos profilina-actina-ATP. La profilina es un factor de intercambio que une actina-ADP y estimula el intercambio de nucleótido para generar G-actina-ATP. Por otro lado, la **cofilina** estimula la hidrólisis de actina-GTP a actina-GDP, favoreciendo la despolimerización, y con ello el reciclado de los monómeros para que puedan ser empleados en posteriores eventos de polimerización.

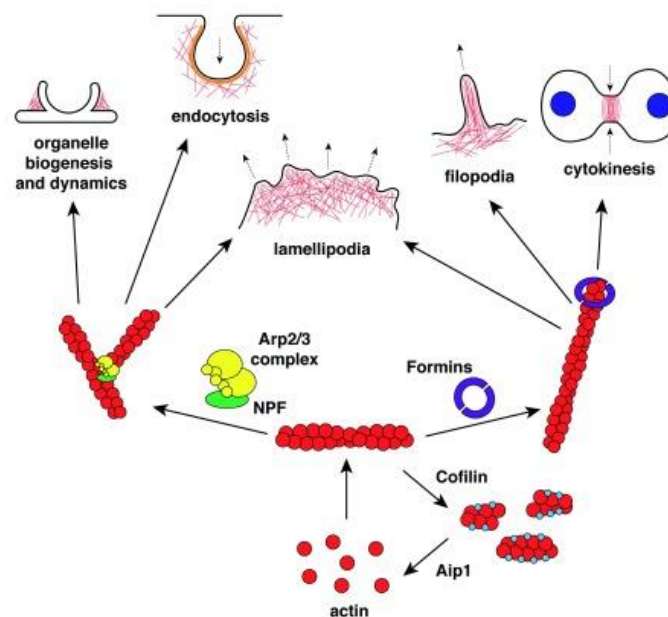
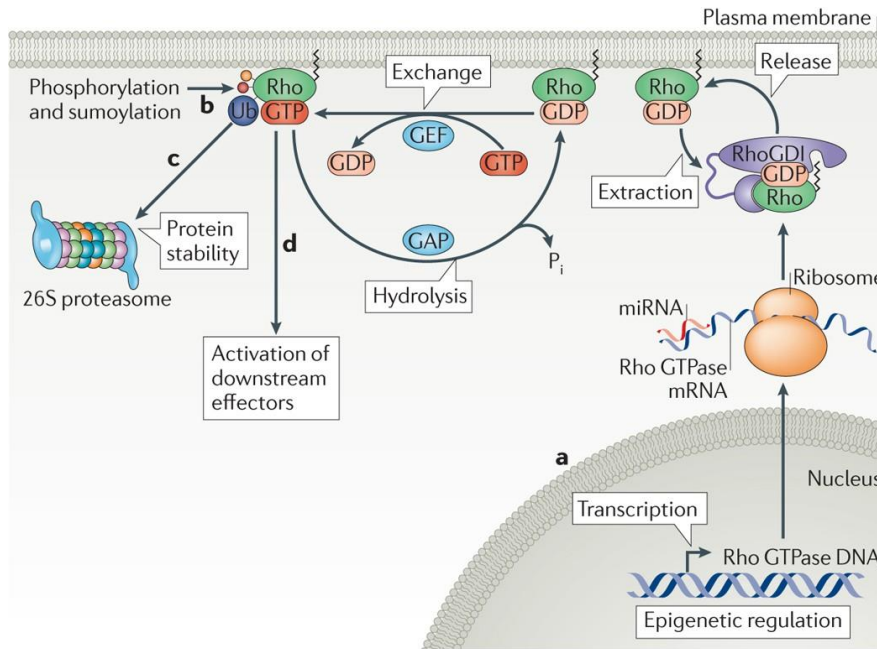


Figura 11. Esquema general del ciclo dinámico de polimerización y despolimerización de actina. La G-Actina es la unidad de construcción de los filamentos, que son objeto de fragmentación por Cofilina, creación de ramificaciones por Arp2/3 o extensión lineal mediante Forminas. Estas estructuras a su vez participan en la definición de morfologías celulares como los lamelipodios, filopodios y otras. Imagen obtenida de Buracco et al (2019).

La **nucleación de actina** y la formación de fibras de estrés, filopodios y lamelipodios son reguladas por las Rho GTPasas Rho, Rac y Cdc42. Las Rho GTPasas actúan como interruptores moleculares que controlan vías de transducción de señales a través de un ciclo en las formas inactiva (unida a GDP) y la activa (unida a GTP). En su estado unido a GTP, éstas interactúan con otras proteínas para inducir una gran variedad de respuestas intracelulares (Fig. 12), la función mejor caracterizada es la regulación de la dinámica de actina.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 12. Esquema sobre cómo se produce la regulación de las proteínas de tipo Rho-GTPasas, que particularmente están implicadas en el control de la capacidad de fagocitosis de los macrófagos, y que mediante las proteínas de *Yersinia* se consigue bloquear. Sistema de activación dependiente de la unión a GTP mediante la actividad de GEF, e inactivación por acción de GAP o secuestradores tipo GDI. Imagen obtenida Hodge et al (2016).

Rho regula el **ensamblaje** de fibras de estrés contráctiles de actina-miosina, mientras que **Rac y Cdc42** regulan la **polimerización** de actina para formar **lamelipodios** periféricos (Fig. 13), regulando las rugosidades de membrana y la locomoción celular, y **Cdc42** regula los **filopodios** para definir la polaridad del movimiento celular.

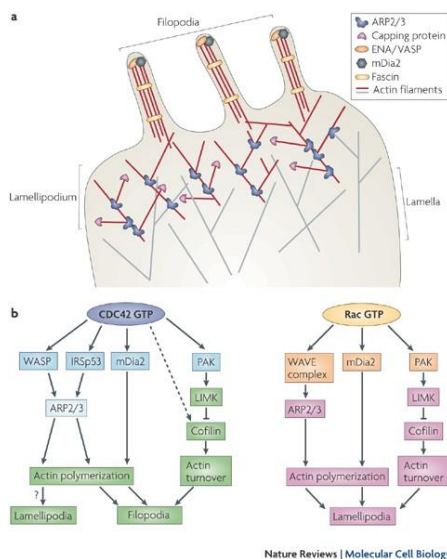


Figura 13. Relación de las proteínas Rho GTPasas con el citoesqueleto de actina y esto con la capacidad de fagocitosis. Imagen obtenida de Heasman et al (2008).

La interacción de las Rho GTPasas con la membrana plasmática es mediada por modificaciones postraduccionales con lípidos. En concreto, experimentan geranilgeranilación, catalizada por la geranilgeraniltransferasa tipo I (**GGTasa-I**), que afecta al residuo de cisteína situado en el motivo CAAX del extremo C-terminal. Como consecuencia de esta prenilación, los tres aminoácidos C-terminales son retirados y la proteína queda anclada a la membrana por el residuo de cisteína.

El **ciclo de las Rho GTPasas es regulado por tres grupos de proteínas**. Las Rho-GTPasas inactivas son secuestradas de forma soluble en el citoplasma con la formación de un complejo con los inhibidores de disociación del nucleótido de guanina (**GDI**s, “Guanine nucleotide dissociation inhibitors”). Las **proteínas ERM** estimulan la liberación de GDI de las proteínas Rho, lo que desenmascara el grupo lipofílico isoprenil, facilitando la transferencias de las Rho GTPasas a la membrana celular. Además, la liberación de GDI permite que las proteínas Rho se asocien con los **GEFs** (“guanine nucleotide exchange factors”), que estimulan la conversión de Rho-GDP a Rho-GTP. Ahora, las Rho-GTP unidas a membrana interactúan con las proteínas efectoras para estimular la reorganización del citoesqueleto de actina. La inactivación de las Rho-GTP a Rho-GDP es estimulada por proteínas **GAPs** (“Rho specific GTPase-activating proteins”), que actúan aumentando la actividad GTPasa intrínseca de las Rho GTPasas. Finalmente, el ciclo se completa cuando las Rho-GDP son extraídas de la membrana celular por las GDI.

YopE

YopE actúa como una **GAP**, cambiando RhoA, Rac y Cdc42 a su forma “off” al acelerar la hidrólisis de GTP (*Figuras 10 y 14*). YopE se une a la GTPasa e introduce una secuencia que contiene arginina (“the arginine finger”) en el sitio catalítico de la GTPasa. Este residuo de arginina (**Arg-144**) completa el sitio activo y promueve una hidrólisis eficiente de GTP. Este mecanismo de acción de YopE está conservado con el de otras GAPs eucarióticas.

YopT

YopT tiene un fuerte efecto **despolimerizador** sobre la **actina**, al modificar a las proteínas de la familia-Rho e inducir su liberación de la membrana al citoplasma. YopT es una **cisteín-proteasa** que rompe RhoA, Rac y Cdc42 cerca del extremo **carboxilo terminal** (*Fig. 10 y 14*), liberándolas de su anclaje a membrana a través del grupo prenilo. *In vivo*, YopT parece tener una actividad preferencial hacia RhoA y menor para las otras dos GTPasas.

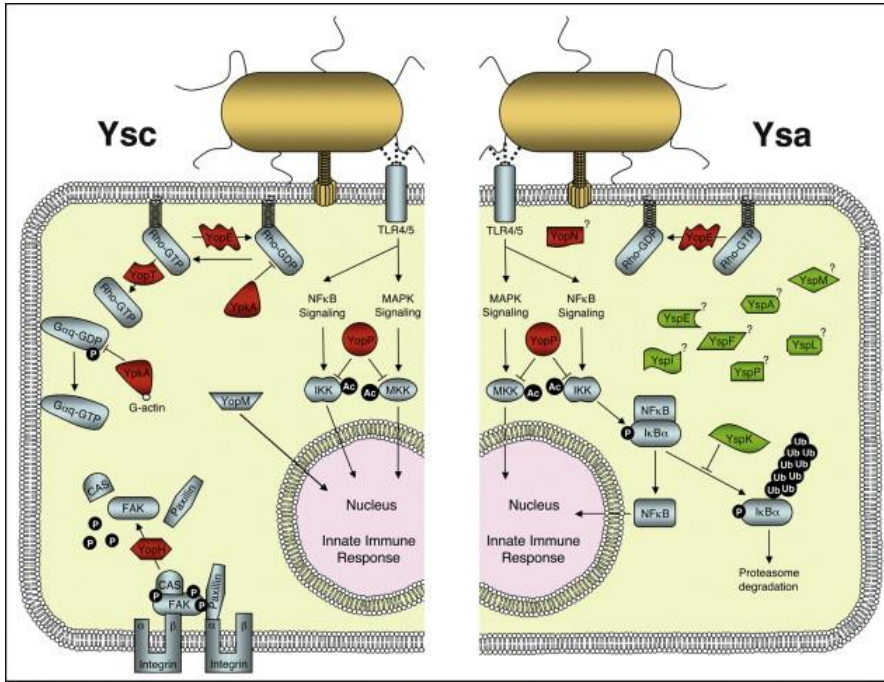


Figura 14. Imagen en la que se recogen, entre otras funciones, las desarrolladas por YopH, YopY, YopE y otras proteínas Yop que se relacionan con más vías alteradas en macrófagos. Ysc e Ysa son sistemas diferentes de secreción de *Yersinia* basados en sistemas tipo 3. Imagen obtenida de Matsumoto et al (2009).

YopO

La proteína efectora YopO tiene un dominio similar a la molécula **GDI** (“GDP-dissociation inhibitor”) con el que interacciona con las RhoGTPasas (Figura 10). Se postula que podría interaccionar con la proteína Rac1 anclada a la membrana, facilitando su liberación y su desactivación.

Mutantes de *Yersinia* carentes de cualquiera de estas cuatro **Yops** resultan mejor **fagocitados** por PMN (células polimorfonucleares) y macrófagos de lo que lo son las *Yersinias* normales. Esto indica que cada una de las **cuatro Yops** contribuyen al efecto antifagocítico y que no hay redundancia entre ellas, más bien habría **sinergismo**.

Así, la inhibición de la fagocitosis permite a *Yersinia* proliferar en los “**Peyer’s patches**” (Fig. 15), y otros tejidos más profundos, como microcolonias extracelulares. En este punto, cabe destacar que contrario a lo que ocurre en *Shigella* y *Salmonella*, las que usan el sistema de secreción tipo III para entrar en células no fagocíticas, *Yersinia* utiliza el mismo tipo de sistema para evitar ser tomada por células fagocíticas.

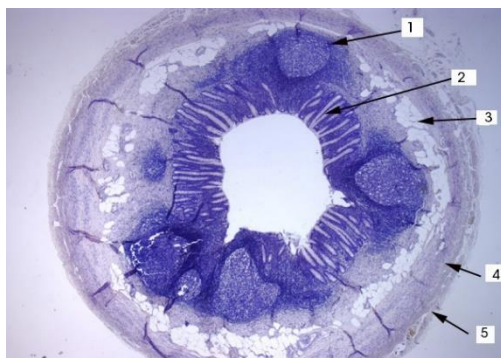
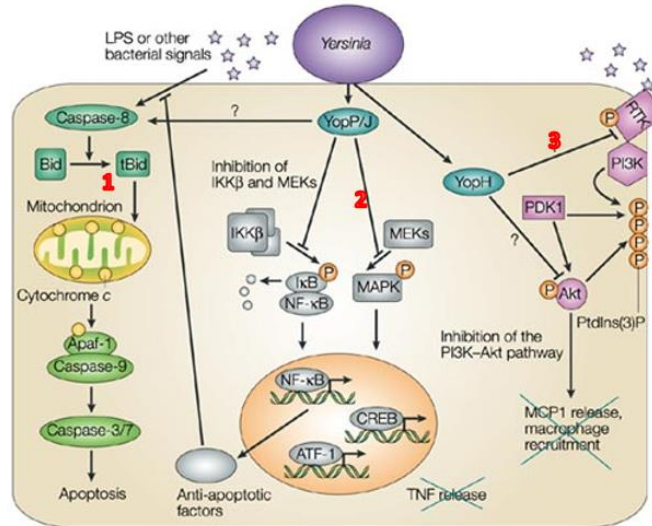


Figura 15. Imagen de un corte transversal del tubo digestivo a la altura del intestino. El número 1 estaría indicando la Placa de Peyer en la que *Yersinia* consigue proliferar una vez ha evadido la respuesta fagocítica de los macrófagos. Imagen obtenida de web hyefvc.wordpress.

3.4.2. Bloqueo de la respuesta inflamatoria.

Dos efectores intracelulares (YopP y YopH) se han encontrado que son capaces de contrarrestar la respuesta proinflamatoria de las células (Fig. 16).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 16. Acción antiinflamatoria de las Yops. Modificada a partir de Cornelis (2002).

(1) Tras la infección de macrófagos por *Y. enterocolitica*, Bid (un miembro proapoptótico de la familia de Bcl-2) es proteolizado a su forma truncada llamada tBid mediante la caspasa-8 activada. La proteína tBid permite entonces la salida del citocromo c de la mitocondria, la cual activa la proteína Apaf-1, que a su vez activa la caspasa-9, y ésta activa finalmente a la caspasa-3 y a la caspasa-7, promoviendo la apoptosis. Se piensa que YopP activa la apoptosis mediante dos rutas; por un lado, previniendo la liberación de factores anti-apoptóticos mediante sus efectos antiinflamatorios, y por otro lado de una forma más directa.

(2) YopP inhibe la migración de NFκB al núcleo ya que impide la fosforilación de IκB (inhibidor de NFκB). Esta inhibición de la fosforilación ocurre mediante la inhibición de la kinasa de IκB, llamada IKKB. YopP también interfiere con la vía de las MAPK mediante la inhibición de las MEKs. Como resultado de todas estas inhibiciones, los activadores de la transcripción como CREB, ATF-1 y NFκB no pueden estimular la transcripción de los genes que están involucrados en la síntesis de citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión. La relación entre el papel antiapoptótico y el antiinflamatorio de YopP sigue siendo desconocido, al igual que el mecanismo exacto de acción. YopP parece ser una proteasa, probablemente de la familia de las SUMO-lasadoras (SUMO: "small ubiquitin related modifier"), pero no se conoce cómo la actividad proteasa conduce a la inhibición de ambas rutas, la de NFκB y la de las MAP-Kinasas.

(3) Por otro lado, la interacción de algunos factores bacterianos no determinados con un RTK (receptor tirosínica), induce que la proteína PI3K sea reclutada en la membrana. PI3K activada fosforila los lípidos fosfoinosídeos, lo que permite la aparición en la membrana de fosfatidilinositol-3-fosfato. Estos últimos reclutan proteínas como la proteína kinasa PDK1, que es capaz de fosforilar y activar a Akt (también llamada proteína-kinasaB). Akt activada puede fosforilar diferentes tipos de proteínas, que termina entre otras cosas, en la síntesis de MCP1.

YopP:

- Reduce la liberación de **TNF** (“tumour-necrosis factor”) (ver CAJA 2) por los macrófagos y la IL-8 por células epiteliales y endoteliales.
- Reduce la presentación de **moléculas de adhesión**, tales como ICAM1 (“intercellular adhesion molecule 1”) y E-selectina en la superficie de células endoteliales, y esto probablemente reduce el reclutamiento de PMNs al sitio de infección.

Todos estos eventos son la consecuencia, en parte, de la **inhibición de la activación de NF- κ B** (un factor transcripcional que es central para desencadenar la inflamación). La inhibición de la activación del NF- κ B es provocada por YopP al inhibir a la NF- κ B quinasa β (IKK β) –una quinasa que fosforila al inhibidor de NF- κ B (I κ B) (Fig. 16). Dentro de la vía NF- κ B, IKK β es un activador y ejerce su efecto fosforilando al inhibidor I κ B, que como consecuencia sufre ubiquitinación y degradación. La degradación de I κ B deja expuesta la señal de localización nuclear de NF- κ B y éste se transloca al núcleo para activar la transcripción. Al impedir la fosforilación de I κ B, YopP impide la degradación de I κ B y, de esta forma, la traslocación de NF- κ B al núcleo (Fig. 16).

Además de actuar sobre la vía NF- κ B, YopP también **inhibe vías de MAPK** (“mitogen-activated protein kinase”) mediante la inhibición de MEKs (“MAPK kinases”) que se encuentran por encima en la vía de señalización (Fig. 16). Como resultado de estos efectos inhibitorios, activadores transcripcionales tales como la proteína CREB (“cAMP-response-element-binding”) y el factor ATF-1 (“activating transcription factor 1”), al igual que NF- κ B, no pueden estimular la transcripción de los genes implicados en la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias y de moléculas de adhesión.

YopH:

- Previene la síntesis de **MCP1** por los macrófagos infectados (Figura 16). Esta inhibición tiene un papel crucial durante la infección al inhibir el reclutamiento de macrófagos a los nódulos linfáticos.

CAJA 2

El TNF- α es una citoquina pro-inflamación y desempeña un papel central en el desarrollo de una respuesta inmunitaria frente a la infección. Secretado principalmente por los macrófagos, el TNF- α actúa sobre varios tipos de células implicadas en los mecanismos de defensa del hospedador. Estimula la actividad microbicida de macrófagos y PMN y actúa sobre las células NK junto con la IL-12 para provocar la liberación de IFN- γ , que adicionalmente aumenta la actividad microbicida de los

macrófagos. Además, el TNF- α induce la expresión de moléculas de adhesión sobre las células endoteliales y es quimiotáctico para monocitos, contribuyendo así a la amplificación de la actividad microbicida de macrófagos.

3.4.3. Inducción de apoptosis en macrófagos.

Estudios pioneros en 1986 pusieron de manifiesto que los macrófagos de ratón mueren tras 4-6 horas tras la infección con *Y. pestis* o *Y. pseudotuberculosis*. Posteriormente se vio que una cepa de *Y. pestis* carente del plásmido pCD1 no fue capaz de matar a los macrófagos. En 1997, se describió que los macrófagos infectados por *Yersinia* mueren de apoptosis.

En 2001, se detectó que en los macrófagos infectados por *Yersinia* se producía la rotura de la proteína **Bid** (un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2), un sustrato específico de la caspasa-8, lo que sugirió que era la activación de la **caspasa 8** una de las etapas iniciales de la muerte inducida en macrófagos infectados por *Yersinia*. tBid, el producto de degradación de Bid, induce la liberación de citocromo c por la mitocondria. La liberación del citocromo c promueve el ensamblaje del “**apoptosoma**”, la rotura y activación de la caspasa-9, y finalmente la activación de las caspasas ejecutantes 3 y 7 que producen la muerte celular (Fig. 16).

YopP (YopJ en *Y. pestis*) es requerida por las tres especies patogénicas de *Yersinia* para inducir apoptosis en macrófagos. Sin embargo, esta proteína no induce apoptosis en otros tipos celulares.

Como se indicó arriba, YopP inhibe las vías de señalización que operan a través de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK, “mitogen-activated protein kinases”) y por el factor de transcripción NF- κ B. Sobre esta base, se ha postulado que YopP induce apoptosis a través de bloquear las proteínas antiapoptóticas que están bajo el control de NF- κ B (Fig. 17).

Teniendo en cuenta que YopP parece actuar bloqueando las proteínas antiapoptóticas inducidas por la activación del factor NF- κ B, es necesario implicar la **presencia de un factor apoptótico** asociado a la infección por *Yersinia*. Esta molécula podría ser LPS, un componente de la pared celular de todas las bacterias Gramnegativas. Estudios preliminares han puesto de manifiesto que los macrófagos expuestos a LPS mueren de apoptosis si se bloquea la síntesis de proteínas. LPS estimula la muerte de los macrófagos a través de su interacción con **TLR4**; sin embargo, esta muerte puede ser inhibida a través de la síntesis de factores antiapoptóticos que se encuentran bajo el control transcripcional de NF- κ B. Hay que tener en cuenta, que el LPS es un inductor de una respuesta proinflamatoria mediada a través de señalización por el factor NF- κ B. De hecho, los macrófagos deficientes en TLR4 son menos sensibles a la apoptosis inducida por *Yersinia*. Entre los inhibidores de la apoptosis que son regulados

por NF- κ B están: c-FLIP, que interfiere con la activación de la caspasa-8; miembros de la familia Bcl-2, que inhiben la apoptosis al impedir la despolarización de mitocondria y la liberación de citocromo c.

Adicionalmente, se ha demostrado en modelos murinos que existe una vía extra por la que *Y. pestis* puede impedir la apoptosis de los macrófagos en las fases tempranas de la infección. En esta vía intervendría la proteína YopK, la cual se localiza en la membrana plasmática de la bacteria donde, además, de controlar la inyección del resto de proteínas Yop, desencadena la formación del complejo de muerte DISC, que está compuesto por la procaspasa-8, la procaspasa-10, FADD y C-FLIP, y el cual es necesario para activar la caspasa-8.

Así, en conjunto, estas Yops están dedicadas a **frustrar al macrófago**, por un lado bloquean su aparato de fagocitosis y, por otro, lo inducen a suicidarse (Fig. 17).

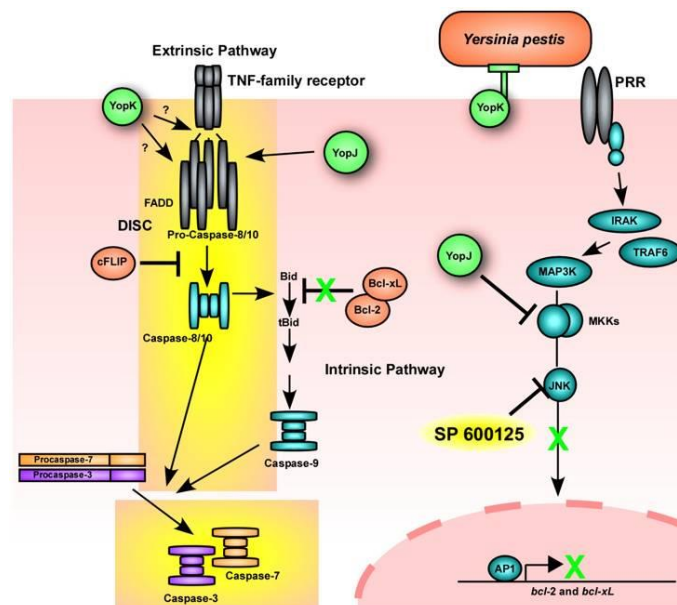


Figura 17. Modelo de las vías por las que *Yersinia* induce la apoptosis de los macrófagos. Se observa de forma esquemática las posibles vías por las que YopP (YopJ en la Figura) y YopK inducen la muerte del macrófago mediante el impedimento de las señales antiapoptóticas dependiente de las MAP-Kinasas y la estimulación de las señales proapoptóticas. Imagen de Peters et al (2013).

3.5. La proteína YadA.

La proteína **YadA** es una proteína mayoritaria de la membrana externa que forma una matriz fibrilar sobre la superficie de *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis*, cuando son cultivadas a 37°C. En cuanto a su estructura, YadA es una proteína trimérica, quedando su extremo N-terminal en el exterior de la bacteria.

A pesar de que YadA es un **factor determinante** para virulencia para *Y. enterocolitica*, no lo es para otras especies como *Y. pseudotuberculosis* o *Y. pestis*. De hecho, en esta última la inducción de la expresión de esta proteína conlleva una reducción de su virulencia.

El nombre YadA fue dado por "***Yersinia adhesin***", dado que su presencia hace a la bacteria adherente a las células epiteliales. YadA es también responsable de una marcada autoaglutinación y por la unión a las fibras de colágeno y a la fibronectina. Sin embargo, aunque se conocen bien sus interacciones, el papel real de YadA durante la infección sigue siendo bastante desconocido.

Aunque estas propiedades tienden a sugerir que YadA podría ser un factor de colonización, algunas observaciones indican que, al menos en *Y. enterocolitica*, YadA desempeña un papel mayoritario en la defensa frente a la respuesta inmunitaria no específica (*Figura 18*). De hecho, la presencia de YadA, debido a su unión al factor H, **reduce la deposición de C3b en la superficie** de *Y. enterocolitica*. Esto tiene dos consecuencias: (1) inhibe la formación del complejo de ataque a la membrana del complemento, lo que inhibe la muerte de la bacteria; (2) impide la opsonización, lo que drásticamente reduce la fagocitosis y muerte por leucocitos polimorfonucleares.

Además de esto, más recientemente se ha descrito que YadA recluta a C4BP (*Figura 19*) en la superficie bacteriana, el cual es un regulador negativo muy importante de la vía de las lectinas y de la vía clásica del complemento. C4BP actúa como cofactor del factor I (serin-proteasa), promoviendo la inactivación de C4b. De esta forma, se impide tanto la opsonización dependiente de C4b como el ensamblaje de la convertasa de C3 de la vía clásica.

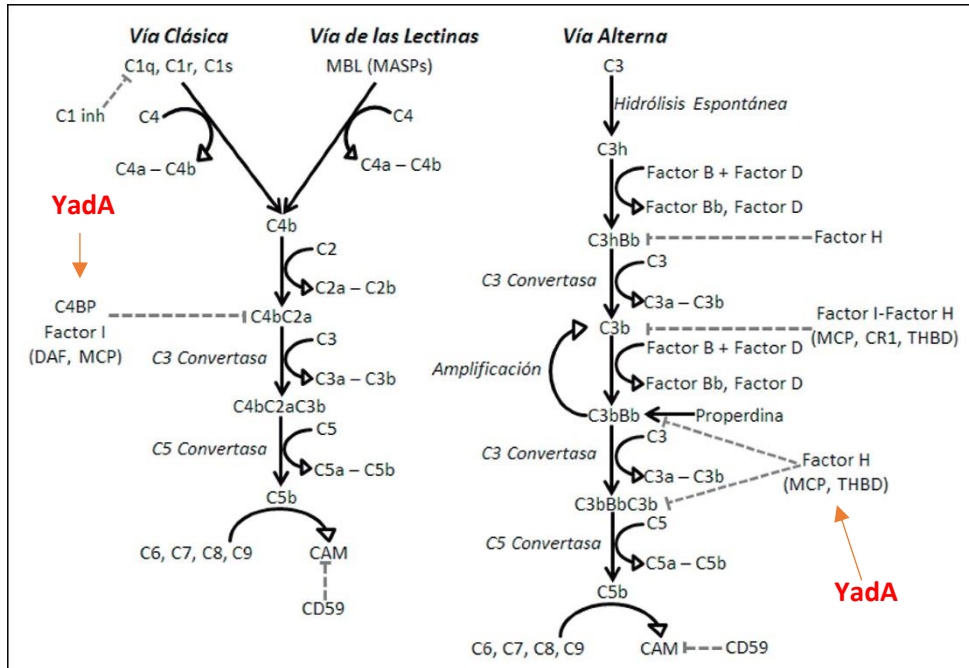


Figura 18. Efecto de la interacción y reclutamiento de YadA de las proteínas inhibidoras del complemento C4BP y factor H. Imagen modificada a partir de Sepúlveda et al. (2018).

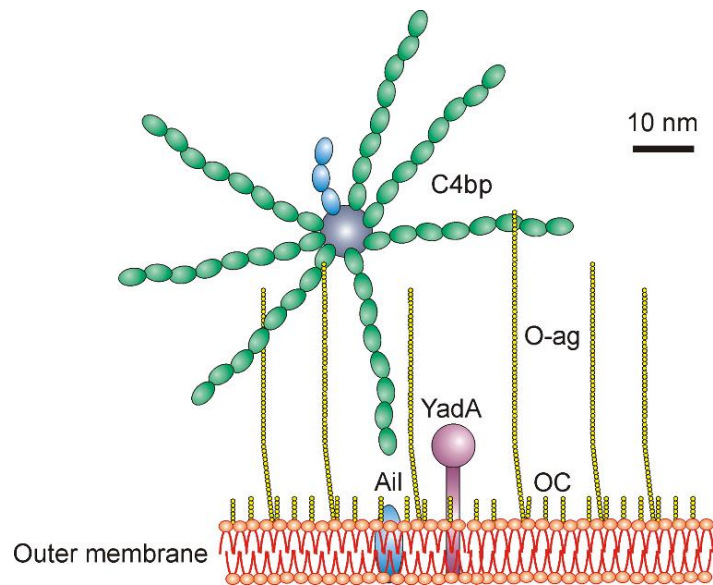


Figura 19. Modelo esquemático de la unión de C4BP a la superficie de Yersinia enterocolitica. *Yersinia enterocolitica* expresa en su membrana las proteínas YadA y Ail, que son capaces de capturar C4BP. Imagen obtenida de Kirjavainen et al., 2008.

4. REGULACIÓN DE LOS GENES DE VIRULENCIA.

En 1986 mediante estudios de mutagénesis con el transposón Tn5 en *Y. pestis* identificaron el gen *lcrF* como un locus responsable de la activación transcripcional de los genes *yop*. Posteriormente, se descubrió el homólogo en *Y. enterocolitica* que se denominó **virF**. El gen *virF* codifica un activador transcripcional de 30-kDa que controla la expresión de los genes *yop*, de *yadA* y también del operón *virC* (donde se encuentran los genes *Ysc*, que codifican para las proteínas que forman el inyectosoma), además de su propia síntesis. La proteína VirF pertenece a la familia AraC de reguladores. Esta larga familia incluye reguladores de las vías degradativas en *E. coli* al igual que reguladores implicados en el control de virulencia de *Shigella*, *Yersinia* y *Pseudomonas*.

VirF actúa como una proteína de unión a DNA. Experimentos de “**footprinting**” con DNasal mostraron que VirF se une en una región de los promotores de los genes *yopE*, *yopH*, *virC* y otros, unos 40-pb por encima del sitio de unión de la RNA polimerasa. Estas regiones de unión a VirF están ubicadas en regiones ricas en AT y aparecen aisladas o en repeticiones invertidas.

La transcripción de los genes *yop* y *vir*, incluyendo *virF*, es fuertemente **termodependiente**. La transcripción del gen *virF* clonado en una cepa de *Y. enterocolitica* curada del plásmido pYV es termodependiente, lo que indica que *virF* es en sí termorregulado por un gen cromosomal. (Fig. 20)

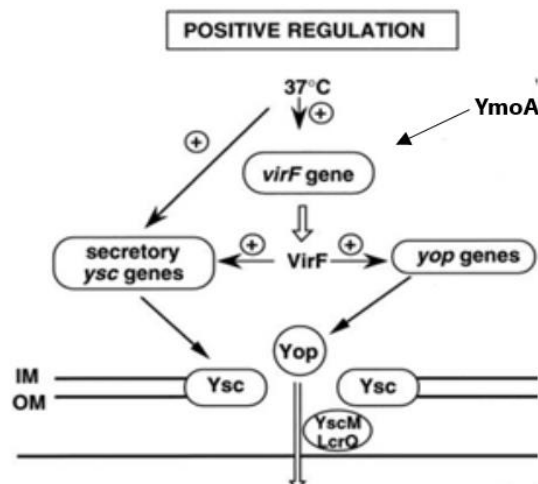


Figura 20. Representación esquemática del circuito de regulación de los genes de virulencia. Resalta la importancia de la termorregulación en la transcripción de los genes de *yop* y *vir* en *Yersinia*. Imagen editada a partir de Cornelis et al (1998).

Experimentos de mutaciones con transposones pusieron de manifiesto un gen modulador, situado en el cromosoma, que se llamó **ymoA** (por "*Yersinia* modulator"). Este gen codifica una proteína de 8064 daltons extremadamente rica en residuos cargados positiva y negativamente.

El hecho de que *virF* esté termorregulado puede explicar por qué las Yops son sólo producidas a 37°C. Sin embargo, parece ser que la temperatura desempeña un papel adicional en la regulación de estos genes.

De hecho, cuando *virF* es transcrito a bajas temperaturas a partir de un promotor diferente al suyo, los genes *yop* y *yadA* son **transcritos pobremente** y no se traducen las Yops. Esta transcripción pobre a 25°C del regulón *yop* en presencia de VirF puede ser debida a una conformación inadecuada del promotor. La hipótesis más probable es que la temperatura, de alguna forma, podría modificar la

estructura de la cromatina, haciendo que los promotores sean más accesibles a VirF. Datos experimentales indican que la temperatura altera el superenrollamiento y la curvatura del DNA donde interacciona VirF, quizás al retirar un represor, que podría ser YmoA, de las regiones promotoras de los genes regulados por VirF.

5. ALTERACIONES PRODUCIDAS POR *YERSINIA PESTIS* EN SU VECTOR PARA FAVORECER LA TRANSMISIÓN.

A primera vista, se podría pensar que los insectos que transmiten patógenos, como es el caso de *Y. pestis*, actúan de vehículos o vectores de transmisión mientras que el patógeno se deja llevar, en una actitud pasiva. Pero cuando se profundiza en el estudio de la interacción que existe entre el patógeno y su vector, queda claro la existencia de una **interacción activa** por parte de la bacteria y la relevancia que la interacción tiene para la transmisión a los hospedadores mamíferos. Esto resulta evidente en el caso de la infección por *Y. pestis*, cuya infección no es posible si la bacteria en cultivo es depositada de forma intradermal en el hospedador.

La transmisión de *Y. pestis* a través de la pulga presenta dos mecanismos de actuación. Existe una **transmisión de fase temprana**, caracterizada inicialmente en experimentos realizados entre 1904-1907 por miembros de la Comisión de Investigación de Plagas de la India. En estos casos la infección a través de la pulga se produce tras la incorporación del parásito en la ingesta de sangre, transmitiendo la infección en la siguiente ronda de alimentación. No se conoce muy bien el mecanismo por el que se produce. El segundo mecanismo, y el más conocido, es el que se produce por la formación de una **biopelícula en el proventrículo**, como se explicará a continuación.

Y. pestis se mantiene siempre en el tubo digestivo de la pulga, desde donde será transmitido. La pulga hace ingestas pequeñas de sangre (entre 0,1 y 0,4 μ), pero con mucha frecuencia (Fig. 21).

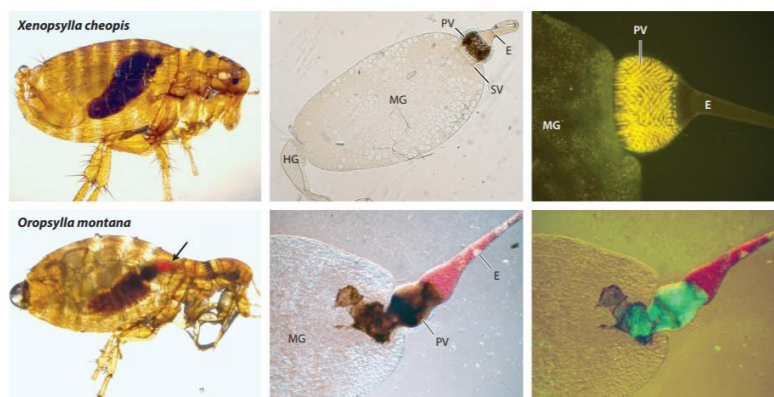


Figura 21. El tracto digestivo de las pulgas es el hábitat de *Y. pestis*. En la parte superior de la imagen se observa a la pulga *Xenopsylla cheopis* no infectada por *Y. pestis*, así como imágenes del tracto digestivo de la pulga. En la parte inferior de la imagen se observa una *Oropsylla* infectada con *Y. pestis* que expresa GFP. El proventrículo de la pulga está completamente bloqueado con una biopelícula que impide que la sangre fresca ingrese al intestino medio (señalado mediante una flecha). Imagen obtenida de Hinnebusch et al (2017).

Una vez realizada la ingestión, se produce la liberación de tripsina y otras proteasas destinadas a hidrolizar las proteínas de la sangre. La digestión se completa en unas 24 horas. Por otro lado, la pulga cuenta con su propia flora intestinal (microbiota), donde son abundantes bacterias de los géneros *Rickettsia*, *Wolbachia* y *Bartonella*.

Así, una vez que la *Y. pestis* accede al tubo digestivo del insecto como parte de la ingesta de sangre, la bacteria debe evitar su destrucción y eliminación por las heces al tiempo que genera las condiciones que favorezcan su transmisión a un nuevo hospedador.

Poco después de la ingestión de *Y. pestis* junto a la sangre, se observa la formación de agregados de bacterias situadas dentro de una matriz amorfa (Fig. 22).

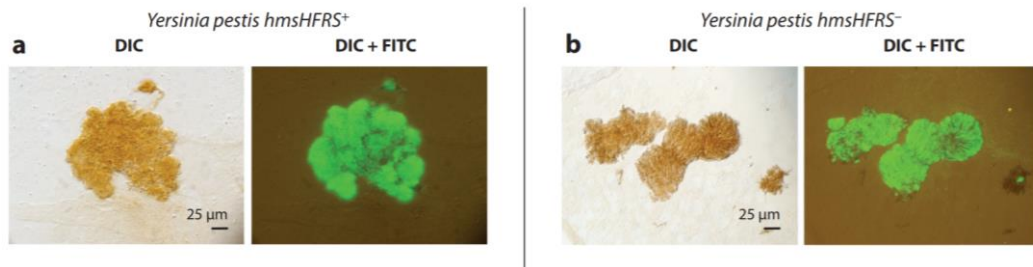


Figura 22. En la imagen se observa la formación de agregados de *Yersinia pestis* tras la ingestión de sangre en la pulga. Los agregados se localizan en el proventrículo tras un día desde la infección. Imagen obtenida de Hinnebusch et al (2017).

Estos agregados, con características de biofilm, se localizan en la parte anterior del tubo digestivo (el proventrículo), donde parecen adherirse. Según va creciendo, este agregado va a impedir que la válvula proventricular pueda cerrarse y termina además bloqueándola, lo que favorece la regurgitación de estos agregados en la dermis del mamífero cuando las pulgas intentan alimentarse (Fig. 23).

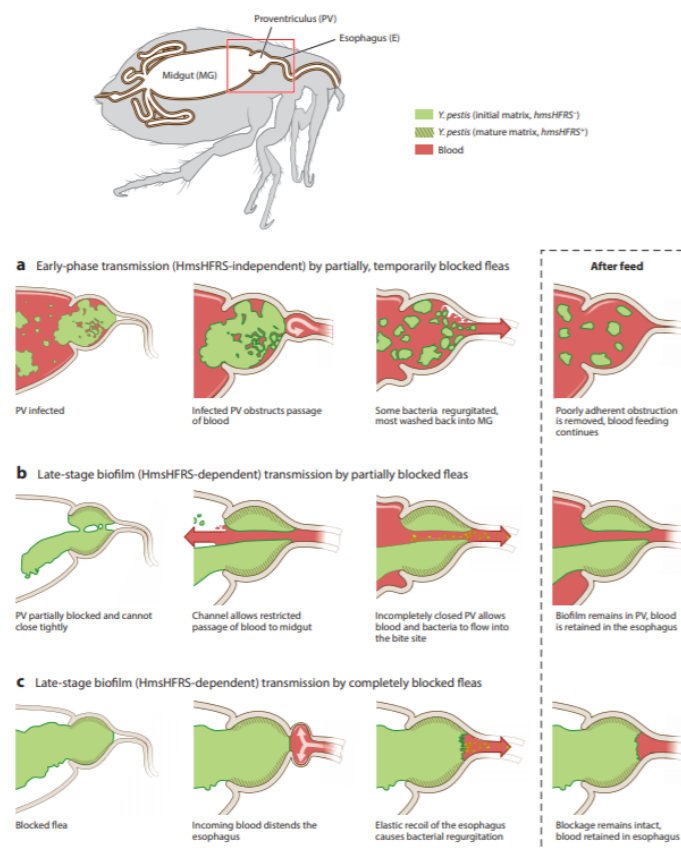


Figura 23. La imagen nos muestra los pasos seguidos en la formación de la biopelícula. En la parte superior (A) se observa la fase temprana de transmisión. Se produce con la entrada de sangre y la acumulación de bacterias formando agregados en el proventrículo. En esta etapa se produce una transmisión temprana durante un tiempo limitado. En la parte intermedia e inferior (B, C) comienza la transmisión dependiente de la biopelícula. La válvula proventricular se vuelve incompetente a medida que la biopelícula se expande. Este proceso favorece la regurgitación del contenido intestinal que sale a través del esófago al lugar de la picadura. Imagen obtenida de Hinnebusch et al (2017).

Además, como el bloqueo impide alimentarse adecuadamente a la pulga, esta comienza a picar frenéticamente en múltiples sitios, lo que favorece la transmisión de la bacteria. (Fig.24)

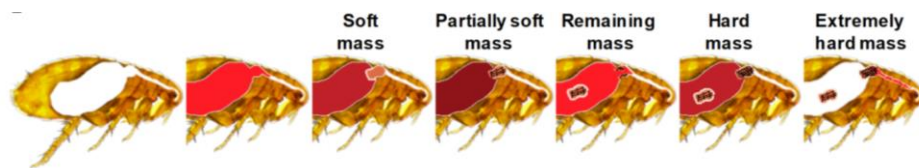


Figura 24. Imagen resumen de los distintos procesos que ocurren tras la infección de *Y.pestis*. Se inicia con la formación de una masa proventricular bactericida blanda. Esta biopelícula se va consolidando hasta ser lo suficientemente fuerte para resistir el flujo de sangre entrante. El bloqueo presentado en la parte derecha de la imagen produce un aumento de la necesidad de alimentación de la pulga, favoreciendo la transmisión de *Yersinia*. Imagen obtenida de Dewitte et al (2020).

6. REFERENCIAS.

- **Baldwin, M.R. and Barbieri, J.T.** (2005) The type III cytotoxins of *Yersinia* and *Pseudomonas aeruginosa* that modulate the actin cytoskeleton. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 291: 147-166.
- **Buracco, S., Claydon, S., & Insall, R.** (2019). Control of actin dynamics during cell motility. *F1000Research*, 8, F1000 Faculty Rev-1977. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18669.1>
- **Carniel, E.** (2002) Plasmids and pathogenicity islands of *Yersinia*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 264: 89-108.
- **Cerdenares Olga Lilia.** (2008) Niveles de fosforilación en tirosina en eritrocitos de ratón balb c durante un proceso infeccioso provocado por *Yersinia pseudotuberculosis*. Tesis Doctoral inédita. Universidad Autónoma de Guerrero (México).
- **Cohn JR, S.K.** (2008). 4 Epidemiology of the Black Death and Successive Waves of Plague. *Medical History. Supplement(27):* 74-100.
- **Cornelis, G.R.** (1994) *Yersinia* pathogenicity factors. *Cur. Top. Microbiol. Immunol.* 192: 243-263.
- **Cornelis, G.R.** (2000) Molecular and cell biology aspects of plague. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8778-8783.
- **Cornelis, G.R.** (2002) *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J. Cell Biol.* 158: 401-408.
- **Cornelis, G.R.** (2002) The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3: 742-752.
- **Cornelis, G.R.** (2006). The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* 4: 811-825.
- **Cornelis, G.R., Boland, A., Boyd, A.P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., Sory, M.-P. and Stainier, I.** (1998) The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1315-1352.
- **Dewitte A, Bouvenot T, Pierre F, Ricard I, Pradel E, Barois N, Hujeux A, Bontemps-Gallo S, Sebbane F.** (2020) A refined model of how *Yersinia pestis* produces a transmissible infection in its flea vector. *PLoS Pathog.*;16(4):e1008440. doi: 10.1371/journal.ppat.1008440.

- **Dewoody, R. S., Merritt, P. M., & Marketon, M. M.** (2013). Regulation of the *Yersinia* type III secretion system: traffic control. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 4. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00004>
- **Donnenberg, M.S.** (2000) Pathogenic strategies of enteric bacteria. *Nature* 406: 768-774.
- **Heasman, S. J., & Ridley, A. J.** (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(9), 690–701. <https://doi.org/10.1038/nrm2476>
- **Hinnebusch, B.J., Jarrett, C.O., and Bland, D.M.** (2017). “fleaing” the Plague: Adaptations of *Yersinia pestis* to Its Insect Vector That Lead to Transmission. *Annu. Rev. Microbiol.* 71: 215–232.
- **Hinnebusch BJ, Bland DM, Bosio CF, Jarrett CO** (2017) Comparative Ability of *Oropsylla montana* and *Xenopsylla cheopis* Fleas to Transmit *Yersinia pestis* by Two Different Mechanisms. *PLoS Negl Trop Dis* 11(1): e0005276. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005276>
- **Hodge, R. G., & Ridley, A. J.** (2016). Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 17(8), 496–510. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.67>
- **Hu, P., Elliott, J., McCready, P., Skowronski, E., Garnes, J., Kobayashi, A., Brubaker, R. R., & Garcia, E.** (1998). Structural organization of virulence-associated plasmids of *Yersinia pestis*. *Journal of bacteriology*, 180(19), 5192–5202. <https://doi.org/10.1128/JB.180.19.5192-5202.1998>
- **Isberg, R.R.** (1996) Uptake of enteropathogenic *Yersinia* by mammalian cells. *Cur. Top. Microbiol. Immunol.* 209: 1-24.
- **Kirjavainen, V., Jarva, H., Biedzka-Sarek, M., Blom, A.M., Skurnik, M. y Meri, S.** (2008). *Yersinia enterocolitica* Serum Resistance Proteins YadA and Ail Bind the Complement Regulator C4b-Binding Protein. *PLOS Pathogens*, 4(8): e1000140. doi: 10.1371/journal.ppat.1000140.
- **Matsumoto, H., & Young, G. M.** (2009). Translocated effectors of *Yersinia*. *Current opinion in microbiology*, 12(1), 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.12.005>
- **McEvedy, C.** (1988) La Peste Negra. *Investigación y Ciencia* 139: 82-87.
- **Mühlenkamp, M., Oberhettinger, P., Leo, J. C., Linke, D., & Schütz, M. S.** (2015). *Yersinia* adhesin A (YadA)--beauty & beast. *International Journal of Medical Microbiology*: 305(2), 252-258. doi:10.1016/j.ijmm.2014.12.008
- **Peters, K. N., Dhariwala, M. O., Hughes Hanks, J. M., Brown, C. R., & Anderson, D. M.** (2013). Early apoptosis of macrophages modulated by injection of *Yersinia pestis* YopK promotes progression of primary pneumonic plague. *PLoS Pathogens*, 9(4), e1003324. doi:10.1371/journal.ppat.1003324
- **Ramamurthi, K.S. and Schneewind, O.** (2003) Substrate recognition by the *Yersinia* type III protein secretion machinery. *Mol. Microbiol.* 50: 1095-1102.
- **Sepúlveda, R. A., Tagle, R., Jara, A., Sepúlveda, R. A., Tagle, R., & Jara, A.** (2018). Síndrome hemolítico urémico atípico. *Revista Médica De Chile*, 146(6), 770-779. doi:10.4067/s0034-98872018000600770
- **Swietnicki, W., Carmany, D., Retford, M., Guelta, M., Dorsey, R., Bozue, J., Lee, M. S., & Olson, M. A.** (2011). Identification of small-molecule inhibitors of *Yersinia pestis* Type III secretion system YscN ATPase. *PloS one*, 6(5), e19716.
- **Thomas, N. A., Ma, I., Prasad, M. E., & Rafuse, C.** (2012). Expanded roles for multicargo and class 1B effector chaperones in type III secretion. *Journal of bacteriology*, 194(15), 3767–3773. <https://doi.org/10.1128/JB.00406-12>
- **Viboud, G.I. and Bliska, J.B.** (2005) *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 59: 69-89.
- **Walløe, L.** (2008). 3 Medieval and Modern Bubonic Plague: Some Clinical Continuities. *Medical History. Supplement*(27): 59-73.
- **Zhang, Y. and Bliska, J.B.** (2005) Role of macrophage apoptosis in the pathogenesis of *Yersinia*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 289: 151-173.

PÁGINAS WEB

- <https://hyefvc.wordpress.com/1/>
- Peste negra: El apocalipsis en forma de epidemia que devastó a Europa en la Edad Media.
<https://www.reporteindigo.com/piensa/peste-negra-el-apocalipsis-en-forma-de-epidemia-que-devasto-a-europa-en-la-edad-media/>.
- La Peste Negra sigue causando estragos en la actualidad.
<https://www.nationalgeographic.es/historia/la-peste-negra-sigue-causando-estragos-en-la-actualidad>.