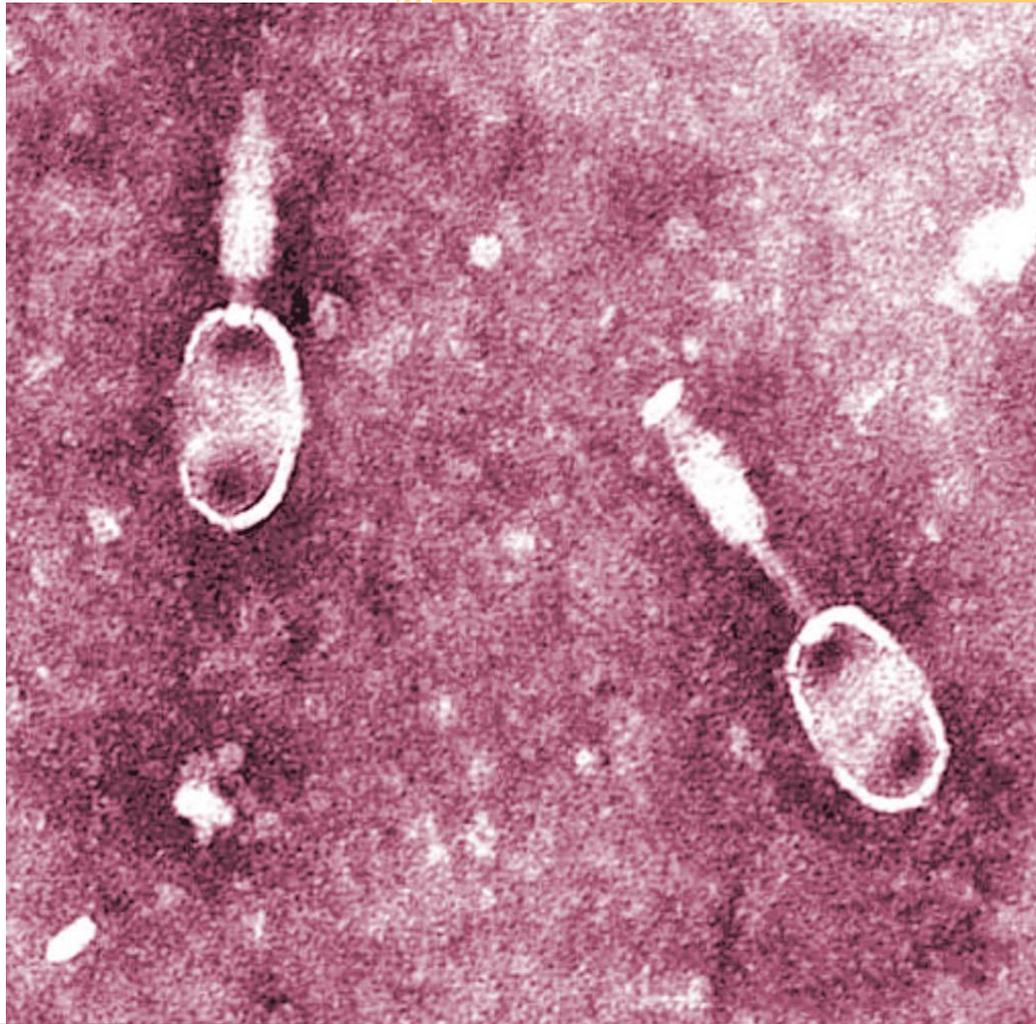


Tema 16. Salmonella



Lydie Charbonneau

Carmen Díaz Sánchez

Noelia López Barba

Marina Martín Urbelz



FACULTAD DE
CIENCIAS

Microbiología clínica

Grado en Bioquímica

Departamento de Biología Molecular



U. A. M. © 2017

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. PATOLOGÍA.....	4
3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	5
3.1. Gastroenteritis.....	5
3.2. Fiebre entérica o fiebre tifoidea.....	6
3.3. Estado portador.....	7
4. INTERACCIÓN DE <i>SALMONELLA</i> CON SU HOSPEDADOR.....	9
4.1. Determinantes genéticos de virulencia y su regulación.....	9
4.2. Etapas de la infección por <i>Salmonella</i>	12
4.2.1. Adhesión a las células epiteliales.....	13
4.2.2. Papel del SST3.....	14
4.2.3. <i>Salmonella</i> promueve una respuesta inflamatoria.....	21
4.2.4. Multiplicación de <i>Salmonella</i> en el interior de la vacuola.....	25
4.3. Regulación de la expresión de los genes de virulencia.....	28
5. INTERACCIÓN CON CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	32
6. EVOLUCIÓN DE <i>SALMONELLA</i> EN SU ADAPTACIÓN AL HOSPEDADOR.....	36
6.1. Genes antivirulencia perdidos en la evolución hacia patogénesis... 43	43

1. INTRODUCCIÓN

La especie *Salmonella enterica* está constituida por patógenos Gram-negativos, intracelulares facultativos, capaces de causar enfermedad en una gran variedad de especies animales. Este género de bacterias fue descubierto en 1885 por dos veterinarios norteamericanos, Daniel Elmer Salmon y Theobald Smith, ayudante del primero. Esta bacteria está emparentada con *Escherichia*, ambos géneros pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*.

En la literatura científica existe cierta confusión en cuanto a la denominación de las variantes de *S. enterica*. Esta especie se divide en 6 subespecies. Estas subespecies se dividen en más de 50 serogrupos, de acuerdo con las características antigénicas del antígeno O (lipopolisacárido o LPS), que a su vez se dividen en más de 2400 serotipos ("serovars"), de acuerdo a diferencias en el antígeno H (flagelina). Algunos de estos serotipos, en el momento de su aislamiento, se les asignó un nombre específico. A veces, de forma errónea estos nombres aparecen escritos como si correspondieran a especies diferentes, ya que el nombre del serovar se indica en cursiva. De acuerdo con la clasificación actual, la forma correcta de referirse a los serovar es la de añadir después de la especie (*S. enterica*) el nombre del serovar, pero sin cursiva; ejemplos: *S. enterica* serovar Thyphimurium, Enteritidis o Choleraesuis.

Algunos serotipos de *Salmonella* están adaptados a un hospedador específico (p. ej., *S. enterica* Typhi y *S. enterica* Gallinarum pueden infectar sólo a humanos o a pollos, respectivamente). Por lo contrario, otros serotipos pueden infectar a un amplio rango de hospedadores (p. ej., *S. enterica* Enteritidis). Las bases moleculares de esta adaptación al hospedador son poco conocidas.

El tipo de enfermedad causada por estos microorganismos depende no sólo del serotipo de *Salmonella* sino también de la especie y del estado inmunológico del hospedador infectado.

En humanos, las manifestaciones clínicas de salmonelosis van desde infección sistémica severa a gastroenteritis moderada.

Una característica de la patogénesis de todas las salmonelas es su habilidad para acceder a células que normalmente no son fagocíticas. Esto incluye no sólo las células del epitelio intestinal, la puerta de entrada de estos organismos, sino también otras células que constituyen "sitios seguros" para las salmonelas en las etapas tardías de su ciclo patogénico, como por ejemplo la vesícula biliar.

2. PATOLOGÍA

Las manifestaciones clínicas particulares están normalmente asociadas con serotipos particulares de *Salmonella* (Tabla 1).

TABLA 1. Enfermedades causadas por serotipos <i>Salmonella</i> (subespecie I) en humanos y vertebrados superiores				
Especie hospedadora	Enfermedad	Serotipo de <i>S. enterica</i> más frecuentemente encontrada	Grupos de edad más susceptibles	Signos o síntomas típicos de la enfermedad
Humanos	Enteritis	Typhimurium, Enteritidis,	Niños (≤4 años)	Diarrea, disenteria, fiebre
	Fiebre tifoidea	Typhi	Niños y adultos	Septicemia, fiebre
	Fiebre paratifoidea	Sendai, Paratyphi A, B y C	Niños y adultos	Septicemia, fiebre
Ganado	Salmonelosis	Typhimurium	Terminos (≤8 semanas)	Diarrea, disenteria, septicemia, fiebre
		Dublin	Terminos y ganado adulto	Diarrea, disenteria, septicemia, abortos, fiebre
Polleria	"Pullorum disease"	Pullorum	Aves recién nacidas	Diarrea, septicemia
	Tifosis aviar	Gallinaurium	Existencias y adultos	Diarrea, cresta descolorida, septicemia
	Paratifosis aviar	Enteritidis, Typhimurium	Aves recién nacidas	Diarrea, septicemia
Oveja	Salmonelosis	Abortusovis	Ovejas adultas	Septicemia, aborto, descargas vaginales
		Typhimurium	Corderos	Diarrea, disenteria, septicemia
Cerdos	Paratifosis porcina	Cholearaesuis	Cerdos destetados y adultos	Decoloración de la piel, septicemia, fiebre
	Salmonelosis	Typhimurium	Cerdos destetados (≤4 meses)	Diarrea
	Paratifosis crónica	Typhisuis		Diarrea intermitente
Caballos	Salmonelosis	Abortusequi	Caballos adultos	Septicemia, aborto
		Typhimurium	Potros	Diarrea, septicemia
Roedores salvajes	Tifosis	Typhimurium, Enteritidis.	Potros	Diarrea, septicemia

Tabla 1. Manifestaciones clínicas de *Salmonella* en función del serotipo y la especie del hospedador. Diferentes serotipos de *Salmonella* (subespecie I) pueden provocar diferentes tipos de enfermedades, tanto en humanos como en otros vertebrados superiores. Álvarez, Becerro, Fernández y Pérez. Microbiología clínica (c13-14).

Prácticamente todas las infecciones de *Salmonella* ocurren por la ingestión oral de la bacteria. Se requiere una dosis importante para superar las defensas del hospedador como son la acidez gástrica, la flora normal y los movimientos peristálticos. La dosis infectiva en humanos va desde 10^6 hasta 10^9 organismos para la mayoría de los serotipos, incluyendo a *S. enterica* Typhi.

Las bacterias se multiplican en el intestino delgado, en aparente competición con la flora normal (Fig. 1). Se piensa que las bacterias penetran a través de células epiteliales especializadas llamadas células M que se encuentran recubriendo los parches de Peyer (que son una especie de folículos linfoides).

Los organismos rápidamente penetran la mucosa intestinal y alcanzan los folículos linfoides mesentéricos donde se multiplican. La mayoría de las infecciones no pasan más allá de estos nódulos linfáticos locales, donde las bacterias van a ser

controladas por las células polimorfonucleares que llegan a esta zona reclamadas por la respuesta inflamatoria local. Sin embargo, las cepas más invasivas como son *S. enterica* Typhi y Choleraesuis entran en macrófagos que les van a servir de vehículos para diseminarse a otros órganos del sistema reticuloendotelial. Esta fase bacterémica conduce a la infección del hígado, el bazo, la vesícula biliar y la bilis. La bilis infectada puede causar una infección intestinal secundaria aproximadamente dos semanas después de la ingestión inicial, especialmente con *S. enterica* Typhi.

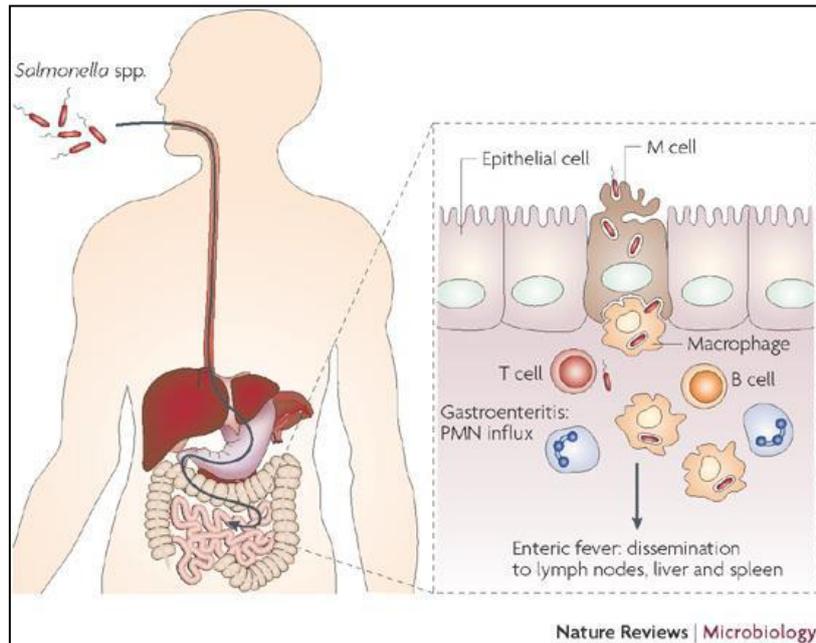


Fig. 1. Biología de la infección por *Salmonella*. Las bacterias logran invadir el organismo hospedador por vía intestinal. Son capaces de competir con las bacterias del microbiota. Pueden penetrar a través de las células M hasta alcanzar los parches de Peyer, y en algunos casos, diseminarse a órganos internos, como los nódulos linfáticos, hígado y bazo, utilizando para su transporte algunas células fagocíticas del sistema inmunitario, y produciendo la patología conocida como fiebre entérica. [Haraga et al \(2008\)](#).

3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El resultado de las infecciones por *Salmonella* depende tanto del serotipo de *Salmonella* que infecta como de la especie y el estado inmunológico del hospedador infectado.

3.1. Gastroenteritis

Gastroenteritis es causada normalmente por los serotipos *S. enterica* Enteritidis y Typhimurium. La gastroenteritis es una enfermedad que se caracteriza por náuseas y vómitos que tienen lugar de 8-48 h después de la ingestión de las bacterias. Diarrea, dolor abdominal y a menudo fiebre siguen después de la infección.

La enfermedad gastrointestinal en niños pequeños y personas con inmunosupresión puede evolucionar a una bacteremia generalizada con consecuencias fatales. De hecho, en países en desarrollo, la mortalidad en niños pequeños que sufren esta infección puede llegar al 20%.

Las gastroenteritis causadas por *Salmonella* son especialmente importantes en regiones del África subsahariana y otros países en desarrollo, siendo causantes de una elevada mortalidad entre niños y personas inmunodeprimidas. Los principales factores de riesgo son la malnutrición, el SIDA y la anemia asociada a la malaria. En muchos casos, la infección por *Salmonella* conduce a estados de bacteremia sin desarrollarse síntomas de gastroenteritis. Así, se estima que el 10% de los adultos africanos HIV-positivos desarrollan infecciones invasivas que llevan asociada una tasa de mortalidad mayor del 20%.

3.2. Fiebre entérica o fiebre tifoidea

Esta enfermedad es normalmente causada por *S. Typhi* o *S. Paratyphi*. La fiebre entérica se caracteriza por fiebre prolongada, la bacteria se mantiene en el torrente sanguíneo (bacteremia), activación del sistema reticuloendotelial y disfunción múltiple de órganos. La bacteria se multiplica dentro de células fagocíticas mononucleares en el hígado, bazo, nódulos linfáticos y parches de Peyer. En algunos casos se puede producir necrosis hemorrágica de los parches de Peyer en el íleon, resultando en una perforación que conduce a peritonitis y posible muerte.

El periodo de incubación para esta enfermedad es mayor que para la gastroenteritis (normalmente 1-2 semanas), y la enfermedad se prolonga más.

La fiebre tifoidea causada por *S. Typhi* y *S. Paratyphi* son aún un grave problema sanitario en países en desarrollo. De acuerdo con las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, se producen anualmente más de 27 millones de casos de fiebre tifoidea en el mundo que ocasionan unas 200.000 muertes al año. Esta enfermedad es común en niños de países de África y Asia y está asociada a pobres condiciones sanitarias en el tratamiento de aguas, que facilitan la transmisión fecal-oral de la infección (**Fig. 2**). En los países desarrollados, la infección por *Salmonella* descendió significativamente en paralelo a la implantación del sistema de alcantarillado y tratamiento de aguas, y la pasteurización de los productos lácteos.

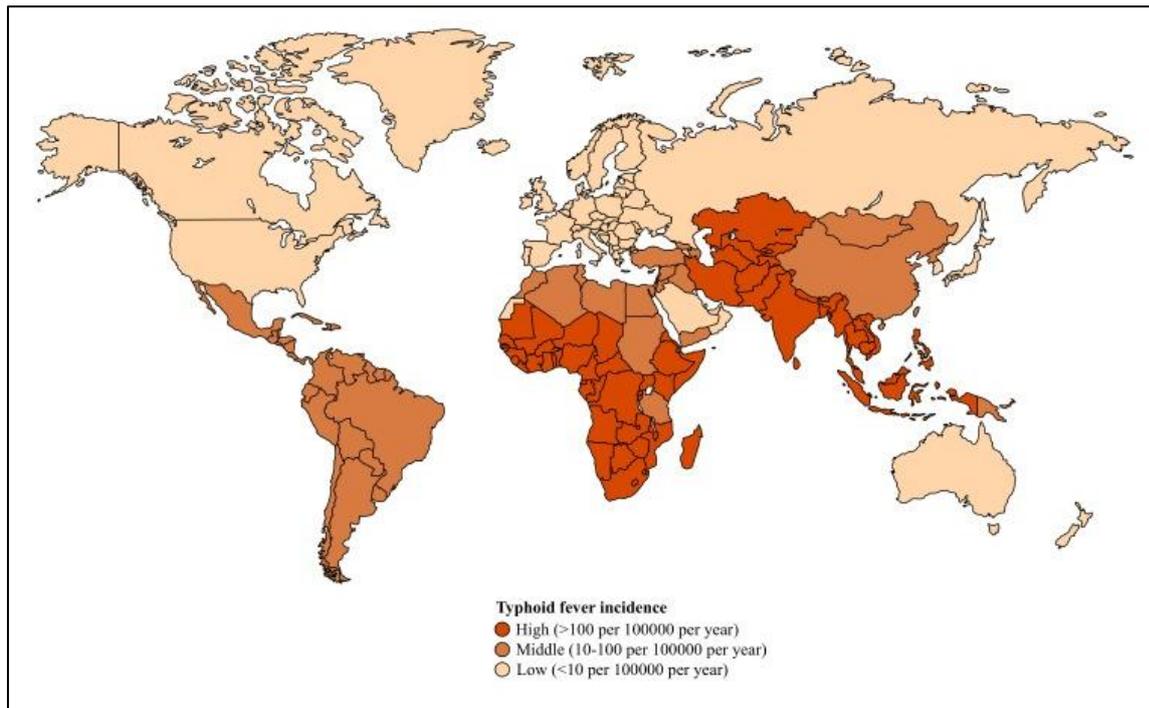


Fig. 2. Incidencia de la fiebre entérica o tifoidea producida por *Salmonella* a nivel mundial. Se puede observar que el mayor número de casos se produce en los países en vías de desarrollo. Amicizia et al (2017).

3.3. Estado portador

El tercer síntoma causado por los serotipos de *Salmonella* es el estado portador crónico. El estado portador puede ocurrir después de una enfermedad sintomática; entre el 1-5% de las personas que sufren una infección aguda con *S. Typhi*, pasan a ser portadores crónicos que liberan bacterias de forma continua. También se puede establecerse sin ningún síntoma; normalmente ocurre después de la ingestión de un pequeño inóculo de bacteria. El sitio de multiplicación bacteriana y persistencia es normalmente el conducto biliar, aunque otros sitios crónicos han sido descritos.

El estado portador crónico se establece cuando *Salmonella Typhi* utiliza células fagocíticas del sistema inmunitario, como las células dendríticas o los macrófagos, para desplazarse por la sangre o la linfa y alcanzar órganos profundos, hasta llegar a los nódulos linfáticos mesentéricos (**Fig. 3**). Desde ellos, puede alcanzar también otros órganos, como el bazo, la médula ósea, el hígado o la vesícula biliar, donde *Salmonella* es capaz de establecerse y permanecer largos períodos de tiempo.

Desde estos tejidos, *Salmonella* puede reemerger periódicamente hasta el epitelio intestinal, principalmente a través de los conductos biliares, de manera que estas

personas se convierten en importantes reservorios para la transmisión de la bacteria.

Se cree que el propio sistema inmunitario puede desempeñar un papel importante en el mantenimiento de este estado de persistencia: algunas citoquinas, como el INF- γ , producido por linfocitos T, permiten controlar la replicación intracelular de *Salmonella* y por tanto contribuir a que se mantenga este estado. Otras citoquinas que también parecen participar en este proceso son IL-12, que estimula la producción de INF- γ , y TNF- α .

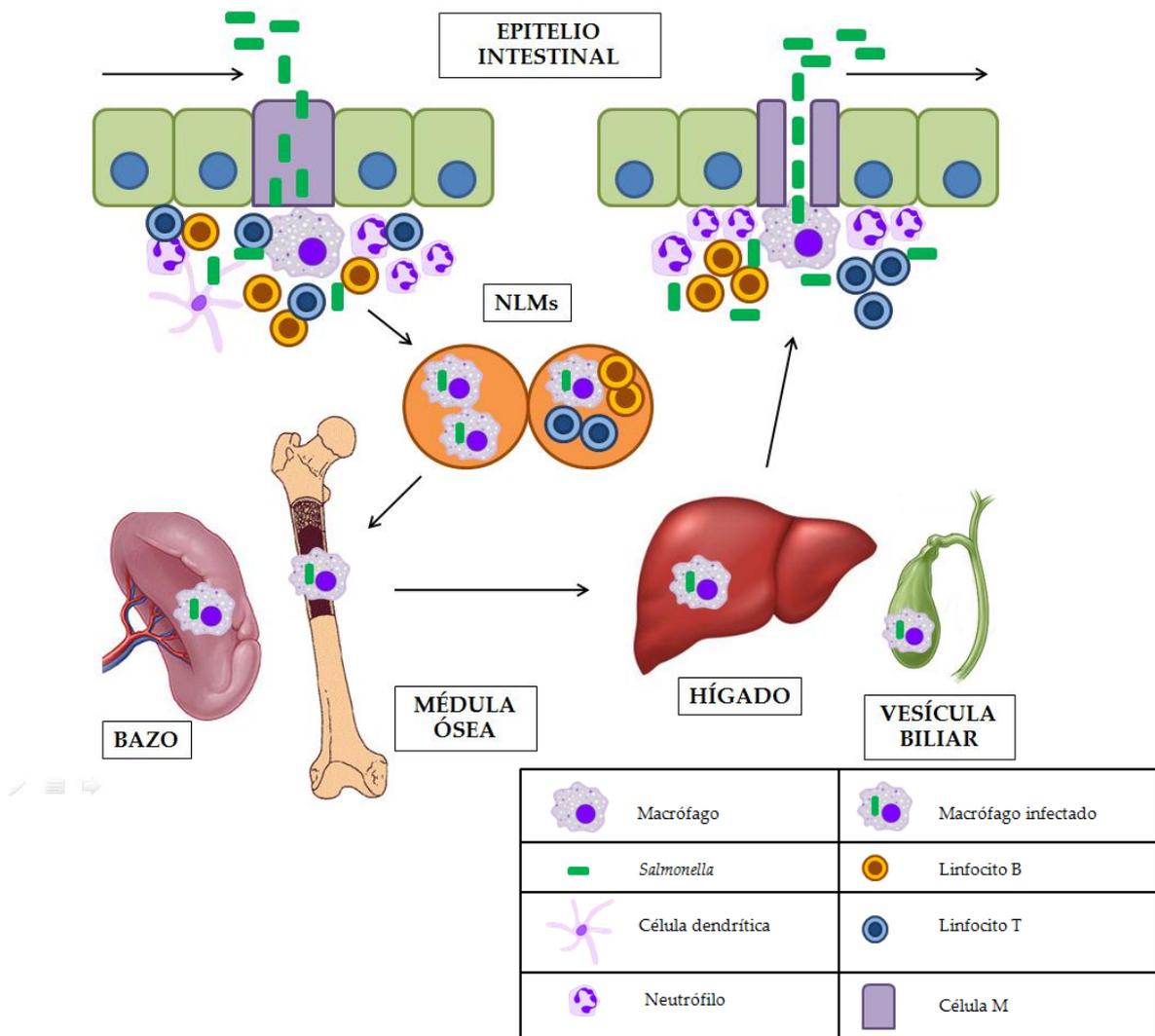


Fig. 3. Representación esquemática de la infección persistente por *Salmonella enterica* Typhi en humanos. *Salmonella*, tras atravesar el epitelio intestinal, puede invadir células fagocíticas del sistema inmunitario y utilizarlas para alcanzar los nódulos linfáticos mesentéricos (NLMs) y otros órganos, donde puede establecerse de por vida y reemerger al epitelio intestinal para ser transmitida a otros hospedadores. Figura de elaboración propia.

Controles sobre un posible estado portador son realizados en profesionales que trabajan en actividades relacionadas con la preparación y manipulación de alimentos.

4. INTERACCIÓN DE *SALMONELLA* CON SU HOSPEDADOR

Cuando examinamos las estrategias empleadas por los patógenos microbianos para colonizar y multiplicarse dentro del hospedador, resulta apropiado hacer una distinción entre los patógenos que accidentalmente se encuentran con un hospedador particular de aquellos que mantienen una larga asociación con los mismos. La distinción es relevante dado que en el primer caso, la interacción hospedador-parásito no ha sido moldeada por fuerzas evolutivas. Con frecuencia, las infecciones por este tipo de microorganismos conducen a enfermedades serias o letales. En cambio, la interacción entre el patógeno adaptado al hospedador y su hospedador normalmente conduce a infecciones subclínicas o autocurantes. *S. enterica* es un buen ejemplo de un patógeno bacteriano cuyas interacciones con los vertebrados han sido modeladas a través de millones de años de coevolución.

Contrario a *S. Typhimurium*, que infecta roedores, vacas y primates, incluidos los humanos, *S. Typhi* es específica para humanos. Dada la falta de sistemas modelo apropiados, la patogénesis de *S. Typhi* y la respuesta del hospedador son conocidas de una forma pobre. *S. Typhimurium* es considerado el equivalente en ratones a *S. Typhi* en humanos, basado en los síntomas similares de fiebre tifoide que ocasionan. Así, como regla se viene haciendo una extrapolación de la investigación de *S. Typhimurium* en ratones a *S. Typhi* en humanos. Sin embargo, no hay que olvidar que ambos serotipos difieren en una gran proporción de sus genomas. No obstante, por todo lo dicho, la mayoría de los datos moleculares a los que me voy a referir se han deducido de los estudios de *S. Typhimurium* y la infección en ratones.

4.1. Determinantes genéticos de virulencia y su regulación.

La mayoría de los genes de virulencia de *S. Typhimurium* se encuentran agrupados en distintas secuencias referidas como “islas de patogenicidad” o SPI (**Fig. 4**). Se han identificado unas 12 regiones SPI en el genoma de *Typhimurium*, numeradas de acuerdo al orden cronológico de su descubrimiento. A continuación se describen algunas características de las cinco mejor caracterizadas.

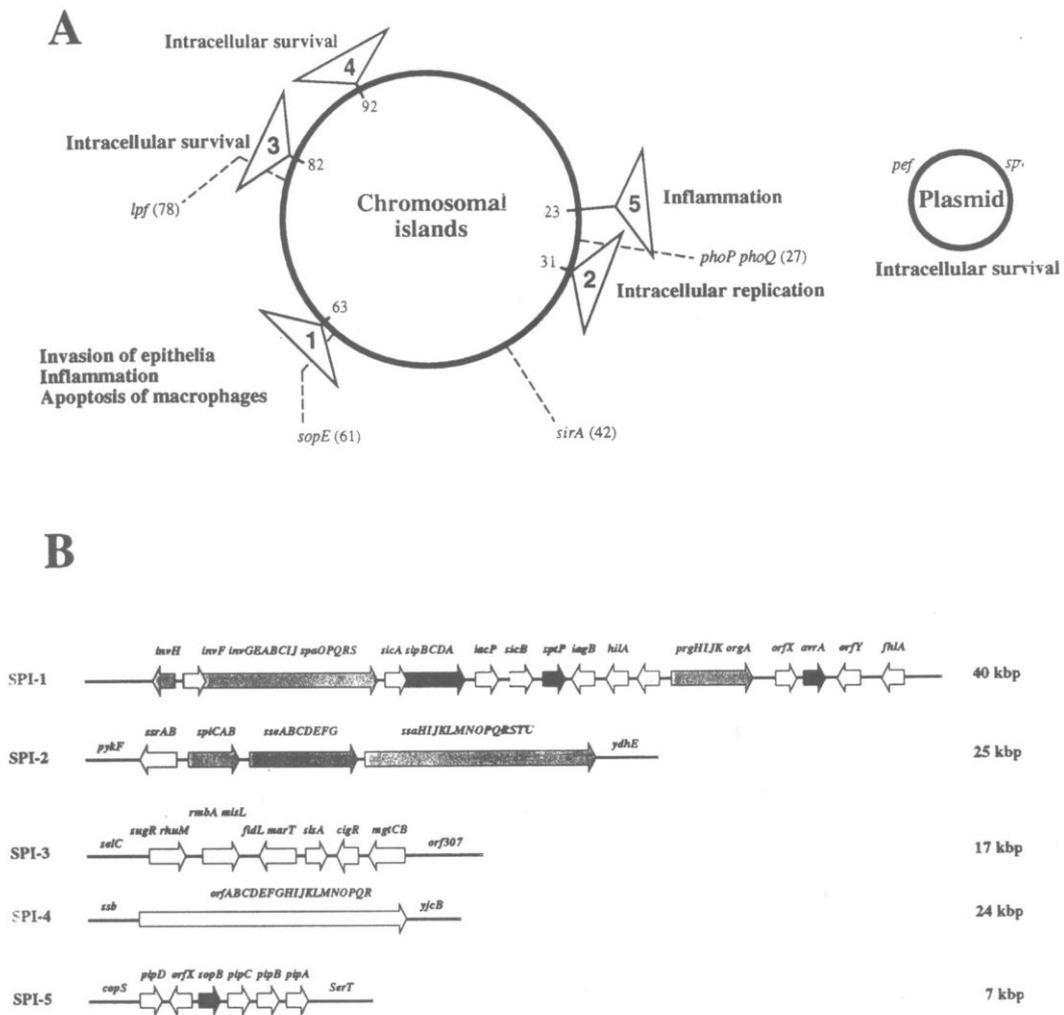


Fig. 4. Factores de virulencia de *S. typhimurium*. Representación esquemática de la disposición de los principales determinantes de virulencia en el genoma de la bacteria. **A.** Islas de patogenicidad situadas en el cromosoma de *S. typhimurium*, factores de virulencia importantes y principales funciones. **B.** Organización genética de cada una de las islas de patogenicidad mostradas en el panel A.

SPI-1 y SPI-2 codifican para sistemas de secreción tipo III, encargados de inyectar proteínas efectoras en el citoplasma de la célula hospedadora a través de “jeringas moleculares”.

La función de SPI-1 es requerida para la invasión de las células no fagocíticas. La maquinaria codificada por SPI-1 inyecta en la célula una serie de proteínas que van a inducir el reordenamiento del citoesqueleto de actina lo que conduce a la aparición de arrugas en la membrana y la internalización de *Salmonella*. Proteínas codificadas en SPI-1 también intervienen en las reacciones inflamatorias generadas por la bacteria en la mucosa intestinal. El contenido en C+G de esta región es considerablemente más bajo

que la del resto del genoma.

SPI-2 consta de genes que controlan la replicación bacteriana en los compartimentos intracelulares de células fagocíticas y epiteliales. Su función es esencial para que *Salmonella* pueda causar las infecciones sistémicas. El locus SPI-2 está al lado de un gen tRNA^{Val} y también tiene un bajo contenido en G+C.

Una característica común a SPI-1 y SPI-2 es que no todas las proteínas efectoras que son translocadas a través de estos sistemas están codificadas por genes situados en las correspondientes islas de patogenicidad. Muchos de los genes codificantes para estas proteínas efectoras están dispersos en el genoma y se encuentran asociados a genomas de bacteriófagos, indicando que también han sido adquiridos por transferencia horizontal. Esto demuestra que una función básica de virulencia puede ser adquirida junto con una isla de patogenicidad y que determinantes de virulencia adicionales pueden ser adquiridos posteriormente a través de bacteriófagos u otros elementos móviles.

SPI-3 se requiere para la supervivencia intracelular en macrófagos. El principal factor de virulencia que está codificado en esta isla es un sistema de transporte con alta afinidad por magnesio. Para replicarse de forma intracelular, *Salmonella* debe adaptarse al ambiente nutricionalmente pobre del fagosoma, donde escasean las purinas, las pirimidinas, muchos aminoácidos y Mg²⁺. Esta isla también tiene un bajo contenido en G+C y está insertada en el gen de un tRNA.

SPI-4 codifica un sistema de secreción tipo I encargado de la secreción de toxinas y se piensa que interviene en la adaptación de *Salmonella* al ambiente intracelular del macrófago.

Finalmente, SPI-5 codifica factores implicados en la secreción de fluidos y en la reacción inflamatoria en la mucosa intestinal y también para la invasión, como es SopB (SigD), una proteína efectora secretada a través del aparato SPI-1. También tiene un bajo contenido en G+C y está insertado adyacente en un gen tRNA^{Ser}.

Además existen otras islas de patogenicidad que están presentes en algunos serotipos y ausentes en otros. Por ejemplo, en el serotipo Typhi existe una isla de patogenicidad de enorme tamaño (146,9 kb), asociada con el gen tRNA^{Phe}. En esta región se sitúan varios factores de virulencia: (i) la ruta de biosíntesis de cápsula polisacáridica típica del serotipo Typhi; (ii) el gen codificante para la proteína SopE, que inyectada en la célula por el sistema de secreción codificado en la SPI-1 va a ser fundamental para la invasión de células no fagocíticas por parte de la bacteria; y (iii) un

grupo de genes que codifican para los pili tipo 4 que son importantes para la invasión de células epiteliales.

Otro ejemplo, es el locus asociado a resistencia frente a varios antibióticos (ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfonamidas y tetraciclina) que está presente en algunos aislados del serotipo Typhimurium. Este locus, además de los genes de resistencia a drogas, posee los genes codificantes para enzimas implicadas en la movilidad del DNA (transposasas, integrasas, etc.), lo que le da características de transposón.

Algunos factores de virulencia pueden encontrarse también en forma de plásmidos. Algunos de ellos pueden transferirse a otras bacterias por conjugación. No están presentes en todos los serotipos de *Salmonella*, pero sí se observan en los que producen infecciones en humanos más frecuentemente, como *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* y *S. Choleraesuis*. Pueden codificar para factores de resistencia contra antimicrobianos, fimbrias y factores de resistencia al suero, entre otros.

4.2. Etapas de la infección por *Salmonella*

Las infecciones de *Salmonella* se inician principalmente después del consumo de alimentos o agua contaminados. Las bacterias ingeridas alcanzan el tracto digestivo donde interactúan con las células de la mucosa intestinal (**Fig.5**) Como un resultado de esta interacción, los microorganismos inducen cambios en la membrana de las células M y los enterocitos que conducen a la entrada de la bacteria al interior. *Salmonella* atraviesa la barrera epitelial preferentemente a través de las células M, que son células especializadas del epitelio intestinal encargadas de “muestrear” antígenos intestinales mediante pinocitosis y transportarlos a las células linfoides de los parches de Peyer subyacentes. Estudios han demostrado que el estrés por altas temperaturas va a dañar el epitelio intestinal, provocando así un aumento de la permeabilidad y de la posibilidad de infección. Después de esto, *Salmonella* se ve asociada con células reticuloendoteliales y PMNs (leucocitos polimorfonucleares), que han sido reclutados al foco de la infección por la producción de quimioquinas y prostaglandinas por parte de las células epiteliales infectadas por *Salmonella*. Finalmente, tras alcanzar la lámina propia, donde se replican, pueden caminar hacia tejidos más profundos presumiblemente transportados dentro de macrófagos no activados.

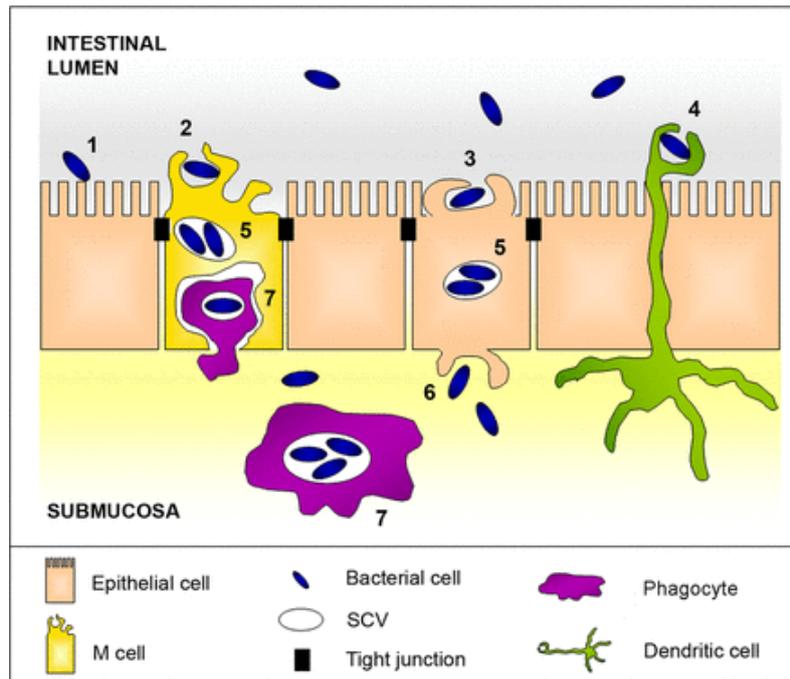


Fig. 5. Modelo de patogénesis de *Salmonella Typhimurium*. *Salmonella* se adhiere al epitelio intestinal y es endocitada por estas células. Dentro de la célula, *Salmonella* va a replicarse dentro de vacuolas (SCV). Las bacterias llegan por transcitosis a la submucosa intestinal, donde podrán ser fagocitadas por fagocitos que han sido reclutados a esa zona, formándose de nuevo una vacuola parasitófora (principales células donde *Salmonella* se replica). Algunos fagocitos infectados van a viajar a través de la linfa y la sangre. Fábrega & Vila (2013).

4.2.1. Adhesión a las células epiteliales

Es un prerrequisito para que la infección tenga lugar. La interacción de la bacteria con las células epiteliales a través del mucus es mediada por pili o fimbrias. [Los pili son organelas adherentes semejantes a pelos que sobresalen de la superficie de la bacteria. Dado que los pili pueden ser utilizados como apéndices para transferir material genético durante la conjugación bacteriana, el término “fimbria” se utiliza con frecuencia para referirse a pili cuya función está dedicada al anclaje de la bacteria a una superficie] Se han identificado al menos cuatro tipos de fimbrias, codificados por los genes: *lpf*, *fim*, *agf* y *pef*, implicadas en la adhesión de *S. Typhimurium* a células en cultivo. Es posible que estas fimbrias ayuden a *Salmonella* a conseguir un contacto más fuerte con la célula intestinal y a permitir la interacción de determinados factores y que sea posible la migración transepitelial de los neutrófilos reclutados al lugar de infección. Sin embargo, la disrupción de estos genes de fimbrias no suprime totalmente la virulencia de *Salmonella* en ratones, lo que sugiere que otros factores median la

adhesión a las superficies epiteliales *in vivo*.

La redundancia en los factores de adhesión probablemente refleja los distintos tropismos y el amplio rango de células epiteliales intestinales y hospedadores que puede infectar *Salmonella*.

4.2.2. Papel del sistema de secreción tipo III en la entrada de la bacteria en las células epiteliales

Estudios de microscopía electrónica de células animales infectadas indican que poco después de entrar en contacto con el epitelio intestinal, *S. Typhimurium* induce cambios profundos en la membrana plasmática de las células infectadas.

Como elemento central de los mecanismos empleados por *Salmonella* para acceder al interior de células no fagocíticas está el sistema de secreción tipo III, que está codificado en la isla de patogenicidad 1 (SPI1) localizada en el centisoma 63 de su cromosoma y abarca 40 kb. La composición de nucleótidos de esta isla de patogenicidad sugiere que estos genes han sido adquiridos por transferencia horizontal a partir de otro organismo. Este suceso probablemente tuvo lugar en los primeros pasos evolutivos de *Salmonella*. La SPI-1 se divide en dos grupos de genes que codifican para la maquinaria de secreción que va a permitir la invasión de la mucosa intestinal: *inv-spa* y *prg-org*.

Este sistema de secreción de proteínas tipo III está encargado de la secreción y translocación dentro de la célula del hospedador de una serie de proteínas bacterianas que tiene la capacidad de modular una gran variedad de funciones de la célula hospedadora. Entre estas funciones está la habilidad de *Salmonella* de reorganizar el citoesqueleto de actina de la célula hospedadora para inducir su propia internalización dentro de la célula no fagocítica, paso esencial para llevar a cabo su patogenicidad.

Estos sistemas de secreción tipo III están ampliamente distribuidos entre bacterias patógenas tanto de plantas como de animales. Se han encontrado en *Yersinia*, *Erwinia*, *Shigella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia* y *Pseudomonas syringae*. Estos sistemas están evolutivamente relacionados con el sistema de exportación y formación de flagelos en bacterias. Están compuestos por más de 20 proteínas y constituyen uno de los sistemas de secreción más complejos. Esta complejidad viene dictada por su función tan especializada, que no es sólo la de secretar proteínas a partir del citoplasma bacteriano, sino que también las tiene que liberar en el interior de la célula hospedadora. Además, la complejidad aumenta por el hecho de que estas

proteínas deben ser secretadas en un momento y ambiente precisos.

Una serie de componentes del sistema de secreción tipo III se ensamblan formando un organelo, llamado el “complejo aguja”, que atraviesa tanto las membranas interna y externa de la cubierta bacteriana (**Fig. 5**). Los mecanismos por los que este complejo media la liberación de proteínas efectoras dentro de la célula hospedadora no son conocidos. Otros componentes importantes de este sistema de secreción son las proteínas chaperonas, cuya función es ayudar al correcto plegamiento de las proteínas efectoras y evitar su degradación en el citoplasma bacteriano. Una ATPasa (Inv C) localizada en la base del complejo aguja, además de proveer la fuerza en el proceso de transporte, facilita la liberación de las chaperonas de las proteínas efectoras antes del transporte. Aunque el complejo aguja es muy similar en las diferentes bacterias, las proteínas efectoras son únicas para cada especie.

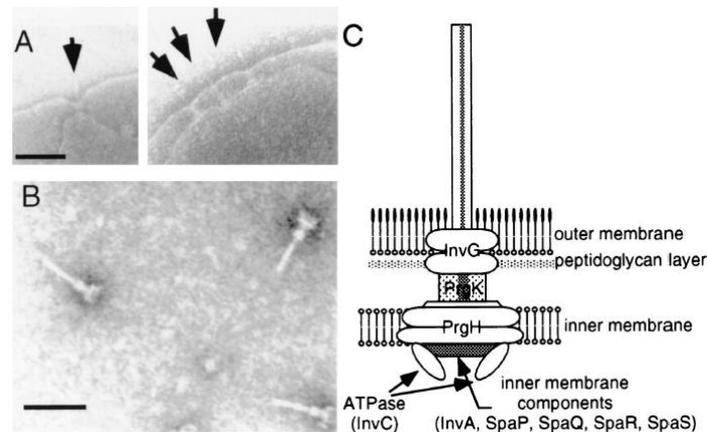


Fig. 6. A y B: imágenes de microscopía. “Complejo de aguja” que forma *Salmonella* en su proceso de infección de células no fagocíticas y fagocíticas. **C.** Representación esquemática de ese complejo y las distintas proteínas que lo forman. Galan & Zhou (2000).

No todas las proteínas efectoras secretadas a través del aparato de secreción tipo III, codificado dentro de SPI-1, están codificadas dentro de esta isla de patogenicidad. Así, la proteína SopE, cuyo papel es fundamental en la infección (ver más adelante), es parte del genoma de un bacteriófago que se encuentra integrado en ciertas cepas de *S. enterica*, como son los serovars Dublin y Typhi y algunas cepas del serovar Typhimurium.

Inmediatamente después de contactar con la célula hospedadora, *Salmonella* induce cambios rápidos en la organización del citoesqueleto de actina. La citocalasina D, una droga que desestabiliza el citoesqueleto de actina, impide eficientemente la entrada de la bacteria, una indicación de que los reordenamientos del citoesqueleto

inducidos por la bacteria son esenciales para el proceso de internalización. La modificación local del citoesqueleto es seguida por cambios grandes en la superficie de la célula hospedadora dando lugar a la aparición de grandes rugosidades en la membrana. Como una consecuencia, las células internalizan grandes partículas tales como bacterias en un proceso conocido como macropinocitosis.

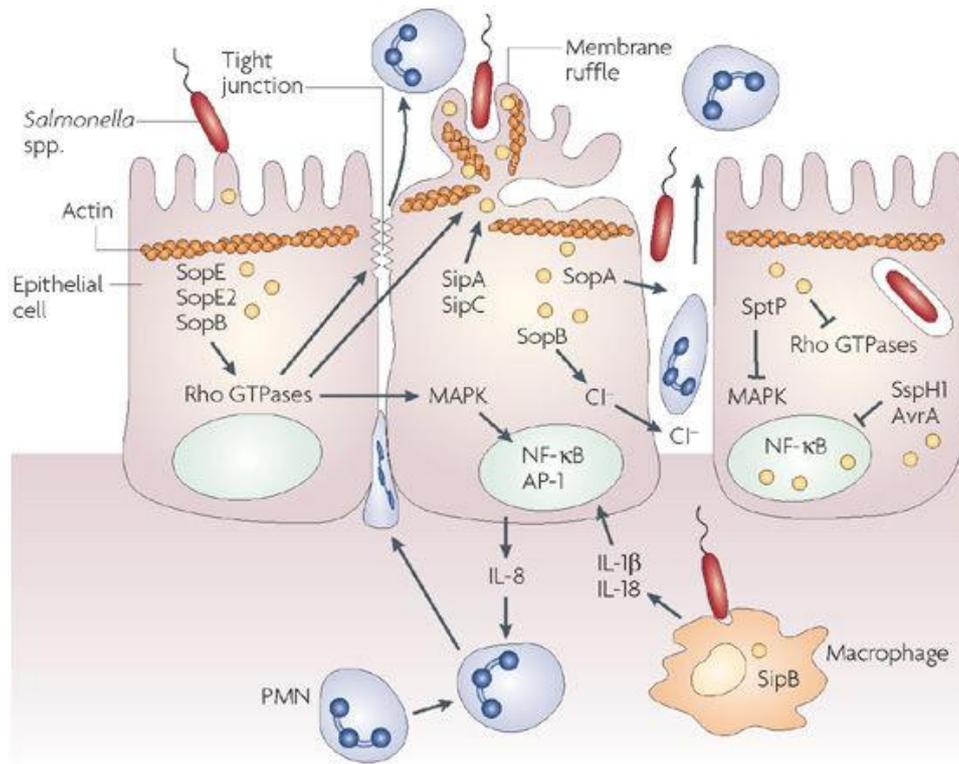
Un importante hallazgo para entender las respuestas celulares que conducen a la internalización de la bacteria fue que Cdc42 y Rac, dos miembros de la subfamilia Rho de proteínas pequeñas de unión a GTP organizadoras de actina, eran esenciales para la entrada de *Salmonella* en la célula hospedadora. Estas pequeñas proteínas se pueden encontrar en dos estados, unidas a GDP (inactivas) y unidas a GTP (activas). En la conformación activa estas proteínas pueden unirse a una gran variedad de proteínas efectoras. Así, estas proteínas pueden verse como unos “interruptores moleculares” muy efectivos para controlar procesos de señalización de forma temporal y espacial. Así, se ha visto que las bacterias no pueden penetrar en células mutantes para estas GTPasas. La estimulación de estas GTPasas por *Salmonella* conduce a la activación de las proteín-quinasas activadas por mitógenos Jnk y p38.

De las proteínas efectoras que son inyectadas por el sistema T3SS-SPII (sistema de secreción tipo III de la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella*) se han identificado tres, SopE, SopE2 y SopB, que activan a las Rho GTPasas Cdc42, Rac1 y RhoG, lo que a su vez conduce a la reorganización del citoesqueleto de actina, la aparición de arrugas en la membrana y la internalización mediante macropinocitosis de *Salmonella* (y la posterior formación de la vacuola parasitófora). Consistente con esta actividad, la microinyección o la expresión transitoria de SopE en células conduce a marcadas reorganizaciones del citoesqueleto de actina y a cambios en la membrana semejantes a los que induce *Salmonella*.

Mientras SopE y SopE2 son potentes factores de intercambio de nucleótidos de guanina (“GEFs”) para las tres GTPasas, SopB estimula sólo a Cdc42 y RhoG de una forma indirecta mediante su actividad fosfoinosítido fosfatasa; aunque el mecanismo de acción de SopB no es conocido todavía. Es de destacar que la constante catalítica (K_{cat}) de SopE es de 10 a 100 veces mayor que la de los GEFs (“G-nucleotide exchange factors”) eucarióticos. Esta alta actividad va a asegurar la activación de una fracción significativa de las Rho GTPasas celulares poco después de su entrada en la célula.

La activación de las Rho GTPasas conduce a la activación de miembros de la familia WASP (“Wiskott-Aldrich Syndrome protein”), N-WASP y WAVE2, lo que

produce el reclutamiento del complejo Arp2/3 (“actin-related protein-2/3”) a los sitios de membrana y la estimulación de la polimerización de actina (**Fig. 7**).



Nature Reviews | Microbiology

Fig. 7. El SST3 de la SPI-1 induce cambios en la célula hospedadora. Cuando *Salmonella* entra en contacto con la célula epitelial del intestino, se produce el ensamblaje del Sistema de Secreción tipo III (SST3) de la SPI-1 y se secretan al interior de la célula eucariota una serie de proteínas efectoras. Se va a producir un reordenamiento del citoesqueleto de actina (a través de la acción de las proteínas SipA y SipC) en la célula debido a la interacción de las proteínas efectoras SopE, SopE2 y SopB con las RhoGTPasas de la célula hospedadora, y, en consecuencia, esta se deforma. Por otro lado, debido a la activación de las MAPK se van a debilitar las uniones estrechas, y se va a dar una respuesta inflamatoria (producción de leucocitos polimorfonucleares pro-inflamatorios (PMNs), e IL-8 debido a la activación de los factores NF-κB y AP-1). SipB va a activar a caspasa 1 en macrófagos, aumentando la respuesta inflamatoria en la zona debido a la producción de IL-8 e IL-1β. Por su parte, SopB va a estimular la secreción de Cl⁻ debido a su actividad fosfoinositol fosfatasa. El debilitamiento de las uniones estrechas permite la trans migración de PMNs desde la región basolateral a la apical; aunque puede producirse esta trans migración sin el debilitamiento de las uniones estrechas, gracias a la acción de SopA. SptP va a inactivar a las MAPK y va a permitir que la membrana de la célula vuelva a la normalidad (restauración del citoesqueleto de actina). Se va a controlar así la respuesta inflamatoria que se estaba produciendo. Los factores SspH1 y AvrA van a inhibir la vía NF-κB. Haraga et al. (2008).

Para que la reorganización de los filamentos de actina sea eficiente en rodear la bacteria y promover su entrada, otras proteínas bacterianas participan en el proceso. SipA, otra proteína efectora inyectada a través del SPI1-T3SS, colabora en el proceso de

iniciación de la polimerización de actina. Otra proteína efectora, SipC, participa en la nucleación y formación de haces de actina. Ambas proteínas contribuyen a la acumulación de filamentos de actina en el punto de contacto entre la bacteria y la célula hospedadora y facilitan la formación de rugosidades en la membrana promovidas por las GTPasas de la familia Rho.

Estudios de microscopía electrónica han puesto de manifiesto que poco después de la infección, la membrana de las células epiteliales infectadas por *Salmonella* recupera su apariencia normal, es decir las modificaciones que *Salmonella* va a inducir sobre la membrana de la célula son transitorias. Sobre este efecto, otra proteína secretada por el sistema tipo III, llamada SptP, parece estar implicada en este proceso. Así, se observa que el efecto inducido por SopE resulta bloqueado con la co-microinyección de SptP, lo que hizo pensar que esta proteína tendría una función antagonista sobre Cdc42/Rac-1.

Las proteínas G tienen una actividad GTPasa intrínseca que les permite a ellas “apagarse” después de la activación al alcanzar la conformación de unión a GDP (inactiva). Sin embargo, tal actividad intrínseca es muy baja salvo que se produzca en presencia de proteínas activadoras de GTPasas (GAPs), las que estimulan la actividad GTPasa en varios órdenes de magnitud. Consistente con su función antagónica, SptP actúa como una potente GAP para Cdc42 y Rac-1. Esta función puede preservar la integridad de su nicho intracelular durante el suficiente tiempo como para permitir su replicación.

En resumen, la entrada de *Salmonella* en la célula hospedadora requiere de la acción coordinada de varias proteínas efectoras bacterianas que, una vez liberadas en la célula hospedadora, ejercen su acción de una forma coordinada temporalmente (**Fig. 8 y 9**). Así, la activación de Cdc42 y Rac por SopE y SopB conduce a la reorganización del citoesqueleto de actina, que es modulado adicionalmente a través de la actividad de la proteína de unión a actina SipA. SipA antagoniza las funciones del factor desestabilizador de actina (cofilina) y de la proteína que corta filamentos de actina (gelsolina), impidiendo, en conjunto, el desensamblaje de las fibras de actina formadas. A continuación, las respuestas celulares inducidas por la bacteria son revertidas por otra proteína efectora bacteriana, SptP, que contrarresta las actividades de SopB y SopE.

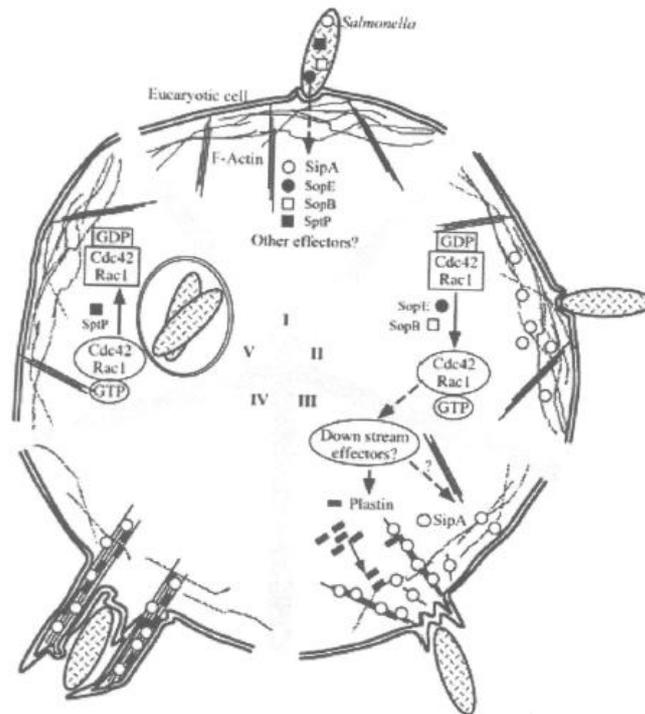


Fig 8. Representación esquemática del mecanismo de entrada utilizado por *Salmonella*. *Salmonella* inyecta a través del ‘‘complejo de aguja’’ una serie de proteínas efectoras que van a actuar en la célula hospedadora de forma coordinada. Inicialmente, SopE, SopE2 y SopO inducen un reordenamiento del citoesqueleto de actina y una respuesta inflamatoria (a través de la activación de Cdc42 y Rac). SptP mantiene la integridad de la célula e inhibe la respuesta inflamatoria (GAP de Cdc42 y Rac). Galan & Zhou (2000).

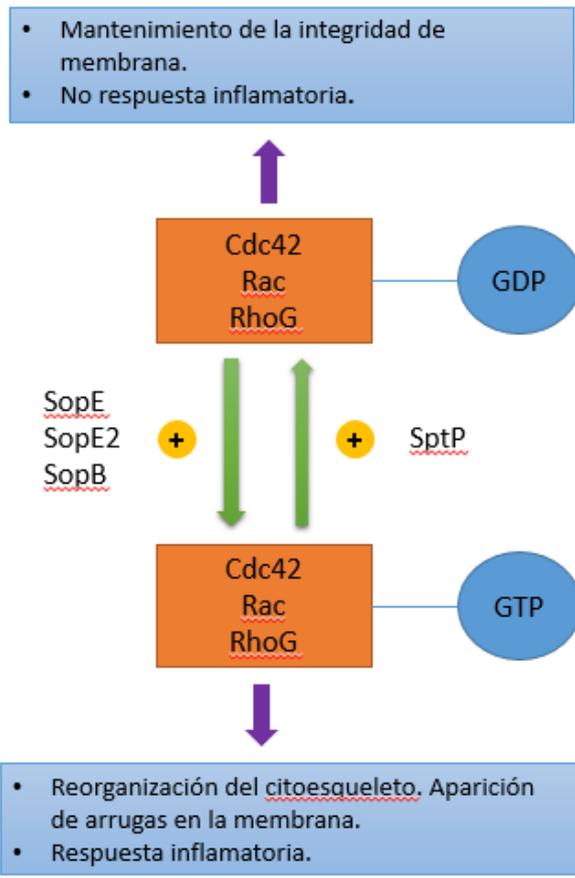


Fig.9. Representación esquemática de la acción de las proteínas efectoras secretadas por el SST3 de la SPI-1. SopE, SopE2 y SopB actúan como GEFs de las proteínas celulares Cdc42, Rac1 y RhoG al principio de la infección: se produce la reorganización del citoesqueleto, la aparición de arrugas en la membrana y la posterior macropinocitosis, y una respuesta inflamatoria (IL-8 e IL-1 β). Al poco tiempo, SptP actúa como GAP de Cdc42, Rac1 y RhoG, recuperándose así la integridad de membrana e inhibiéndose la respuesta inflamatoria. Esquema de elaboración propia.

Puede resultar llamativo que proteínas con funciones opuestas sean inyectadas a la vez en la célula blanco. Parece ser que, aunque son introducidas cantidades similares, SopE es degradada de una forma rápida por una vía dependiente del proteasoma, mientras que SptP es más estable. Así, *Salmonella* explota la degradación dependiente de ubiquitina de la célula hospedadora para coordinar la función de sus proteínas efectoras. Esto hace que el efecto final sea que, aunque ambas proteínas hayan sido inyectadas simultáneamente, actúen de una manera secuencial durante la interacción de *Salmonella* con su célula hospedadora.

Por tanto, la interacción de *Salmonella* con sus células hospedadoras es un ejemplo elocuente de lo sofisticado de los mecanismos empleados por los patógenos bacterianos que han mantenido una larga asociación con sus hospedadores. Tal sofisticación es el resultado de fuerzas evolutivas que han operado durante largos periodos de tiempo, conduciendo a una interacción bien balanceada que permite la replicación de la bacteria mientras impide un excesivo daño en el hospedador.

4.2.3. *Salmonella* promueve una respuesta inflamatoria que favorece la infección

El epitelio de las mucosas discrimina entre las señales procedentes de organismos beneficiosos (comensales) y peligrosos (patogénicos). Las células epiteliales responden a patógenos ambientales a través de la liberación de moléculas señalizadoras tales como citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas. Como resultado de la continua interacción que existe entre el microbiota y las células epiteliales del intestino, se produce cierta migración de neutrófilos a través del epitelio, que es inducida por un quimioatrayente epitelial inducido por el patógeno (PEEC, “pathogen-elicited epithelial chemoattractant”) que es liberado apicalmente en respuesta a señales de peligro percibidas por las células epiteliales. Al mismo tiempo, se produce un incremento en la expresión de ICAM-1 (“intercellular adhesion molecule”) sobre la

superficie apical de los enterocitos mediando, así, la unión de los neutrófilos a las células epiteliales e impidiendo su liberación al lumen.

La activación de las Rho GTPasas por las proteínas efectoras SopB, SopE y SopE2 también conlleva las vías de las MAPK quinasas que, a través de la activación del factor NF κ B (“nuclear factor- κ B”) y de AP1 (“activator protein 1”), van a activar la producción de la citoquina pro-inflamatoria IL-8. Esta citoquina va a promover la migración transepitelial de los neutrófilos desde el lumen intestinal hasta la submucosa. Por su parte, SipA, otra proteína efectora de la bacteria, va a activar a la caspasa 3, que, a su vez, va a procesar proteolíticamente a SipA, y entonces la SipA procesada también va a contribuir a estimular la migración transepitelial de los neutrófilos.

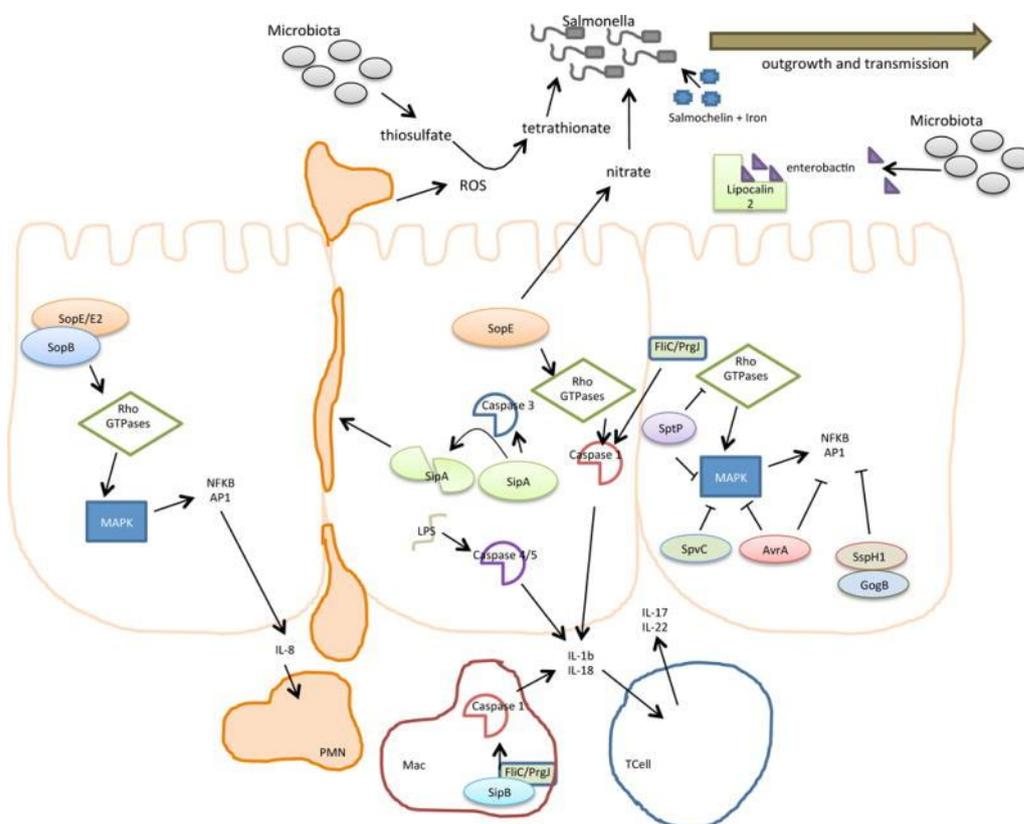


Figura 10a. La inflamación inducida por *Salmonella* promueve la transmisión de patógenos. La inflamación localizada en el tracto intestinal es importante para promover la transmisión de la salmonelosis. La activación de RHO GTPasas mediante los efectores SopB, SopE y SopE2, induce la vía de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), activando, por tanto, al factor nuclear Kappa-Beta (NF-KappaBeta), y la proteína activadora 1 (AP1), la cual estimula la producción de la citoquina pro-inflamatoria interleuquina delta (IL-delta), para promover la migración transepitelial de neutrófilos desde el lumen intestinal hasta la mucosa del intestino. SipA activa a la caspasa 3 y es a continuación cortada por esta proteasa; la rotura de SipA promueve la migración transepitelial de los neutrófilos. La caspasa 1 es activada por FliC (una proteína flagelar), PrgJ (una proteína del sistema de secreción tipo III), y posiblemente por el efector SipB en macrófagos, el cual estimula la liberación de IL-1Beta y de IL-delta. La activación por SopE de RHO GTPasas puede también activar la caspasa 1 en las células

epiteliales. Los lipopolisacáridos intracelulares (LPS) pueden activar las caspasas 4 y 5, resultando en la liberación de IL-1Beta maduro y de IL-1delta, lo cual promueve la síntesis de IL-17 y de IL-22 por las células T, y amplifica la inflamación en la mucosa intestinal. SopE también induce la producción de nitrato por las células hospedadoras, que puede ser usado por la bacteria luminal, para su respiración. La invasión del patógeno también induce la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y lipocalina 2. ROS convierten el producto de respiración tiosulfato (generado por la microbiota) en tetratiónato, que puede ser usado por *Salmonella* spp. (pero no por la microbiota) para la respiración. Lipocalina 2 secuestra el sideróforo de hierro enteroquelina de la microbiota, pero el sideróforo de *Salmonella* spp., salmoquelina, escapa al secuestro. Juntos, estos cambios promueven el crecimiento y la transmisión de *Salmonella* spp., que reside en el lumen intestinal. La respuesta inflamatoria de MAPK es silenciada por las actividades de SptP, SpvC, AvrA, SspH1 y GogB, pero el mecanismo básico de esto no se comprende totalmente. TNF: factor de necrosis tumoral. Modificada a partir de figura en LaRock et al. (2015).

Por otro lado, la caspasa 1 de células epiteliales o de macrófagos infectados va a ser activada por las proteínas FliC (una flagelina) y PrgJ (una proteína estructural del sistema de secreción tipo III), y posiblemente también la proteína efectora SipB en macrófagos, lo que va a estimular la liberación de las citoquinas IL-1 β e IL-18. La activación de las Rho GTPasas por parte de SopE en células epiteliales también puede conducir a la activación de la caspasa 1. La liberación de IL-1 β e IL-18, a su vez, va a promover la síntesis de IL-17 e IL-22 por linfocitos T, lo que va a contribuir a aumentar la inflamación en la mucosa intestinal. IL-17 e IL-22 actúan atrayendo a los neutrófilos al sitio de infección. Además, una de las principales funciones de las citoquinas IL-17 e IL-22 es la de inducir la expresión por las células del intestino de proteínas antimicrobianas, entre las que se encuentran las proteínas quelantes de metales, lipocalina-2 y calprotectina. Mediante la liberación de estas proteínas, el hospedador limita la disponibilidad de iones metálicos en el intestino como una estrategia para impedir el crecimiento de los microbios patógenos. La lipocalina-2 es producida por las células epiteliales y los neutrófilos que son reclutados, y su secreción va a disminuir el acceso de las bacterias al hierro al secuestrar a las pequeñas moléculas, conocidas como sideróforos, que son liberadas por las bacterias para captar hierro. De igual manera, la calprotectina, un heterodímero de las subunidades S100A8 y S100A9, es producida por las células epiteliales y los neutrófilos, y ejerce su actividad antimicrobiana a través de secuestrar zinc y manganeso. Sin embargo, *Salmonella* expresa un sideróforo (salmoquelina) que no es unido por la lipocalina-2 y, por otro lado, posee un transportador de zinc de alta afinidad que permite al patógeno captar zinc aun en presencia de calprotectina.

La activación de la caspasa-1 por SipB en macrófagos conduce también a

inducir la muerte celular a través del mecanismo de piroptosis, que conlleva la simultánea activación de una fuerte respuesta inflamatoria. La activación de esta vía por *S. Typhimurium* se ha visto que es fundamental para la diseminación de la infección desde el sitio de entrada a otros órganos. Como refuerzo experimental se encuentra el hecho de que ratones deficientes (“knock-out”) en caspasa-1 son muy resistentes a la infección por *Salmonella* administrada por vía oral. En consecuencia, la finalidad de inducir la activación de la caspasa-1 por *S. Typhimurium* es la de inducir una respuesta inflamatoria que va a favorecer el reclutamiento de células inmunitarias que van a ayudar a expandir la infección.

SopE también induce la producción de nitrato por las células hospedadoras, que es utilizado por *Salmonella* en el proceso de respiración. Además, como consecuencia de la inducción de una respuesta inflamatoria, los neutrófilos van a liberar especies reactivas de oxígeno (ROS, “reactive oxygen species”), y las células epiteliales, lipocalina 2. Los altos niveles de ROS y RNS producidos por los neutrófilos van a generar un ambiente oxidativo que no es permisivo para el crecimiento de Clostridiales y Bacteroidetes, filos de bacterias anaerobias estrictas que constituyen alrededor del 90% del microbiota intestinal. En consecuencia, la disminución de estas poblaciones que se produce durante la infección de *Salmonella*, y dada la resistencia de ésta a estas condiciones oxidativas, va a ser un factor que favorece la replicación de la bacteria.

Las especies reactivas de oxígeno van a reaccionar con el tiosulfato (que es generado por la actividad respiratoria del microbiota) transformándolo en tetrionato, que puede ser utilizado por *Salmonella*, pero no por el microbiota habitual del intestino. *Salmonella* es capaz de utilizar al tetrionato como aceptor final de electrones, lo que favorece el crecimiento de la bacteria en un ambiente anaeróbico. Por otro lado, entre las RNS producidas durante la inflamación está el peroxinitrito que espontáneamente isomeriza en nitrato, que también puede ser utilizado por *Salmonella* como un aceptor final de electrones durante la respiración.

Por su parte, la lipocalina 2 secuestra a la enteroquelina (un sideróforo producido por el microbiota que une hierro), pero no al sideróforo salmoquelina, producido por *Salmonella*. Todos estos procesos van a favorecer el crecimiento de *Salmonella* presente en el lumen intestinal y su transmisión.

Finalmente, la respuesta inflamatoria es apagada por las actividades de varias proteínas efectoras (SptP, SpvC, AvrA, SspH1 y GogB), pero los mecanismos a través de los que llevan a cabo estos efectos no son conocidos en su totalidad. Se sabe que

SptP, una proteína multifuncional, también está implicada en una inhibición de la respuesta proinflamatoria inducida durante la invasión. Esta proteína tiene actividad tirosín-fosfatasa, lo que va a conducir a la desactivación de la MAPK Erk. (Mitogen-activated protein kinase). MAPK es una serín-treonín kinasa, que interviene en la estabilidad de microtúbulos, y en muchas cascadas de señalización reguladoras de transcripción proteica. MAPK y ERK son sinónimos: es decir, son dos nombres que se le asignan a la misma kinasa. Además, es importante conocer el dato de que hay dos isoformas: ERK1 y ERK2.

En *Salmonella Typhimurium*, MAPK está muy relacionada con el efector SrfH, cuando interacciona con él por la región C-terminal.

A su vez, SrfH tiene 3 dianas de interacción: TRIP6 (Thyroid Receptor Interacting Protein 6), IQGAP1 (IQ containing GTPase Activating Protein 1) y Filamina. Estas interacciones son relevantes en el proceso de infección de *Salmonella*; en general, son determinantes para el funcionamiento del citoesqueleto.

.SrfH-TRIP6: promueve movilidad fagocítica y diseminación sistémica.

.SrfH-IQGAP1: impide que *Salmonella* migre al bazo.

→ Son fenotipos contradictorios, que se deben a un polimorfismo en un único nucleótido, que determina que SrfH se una a TRIP6 o a IQGAP1. Aún no se conoce la relación que puede haber entre las distintas dianas de este factor, pero se sabe que IQGAP1 es regulado en parte por MAPK, mientras que TRIP6 está regulado por otras kinasas.

SrfH provoca una bajada de los niveles de MAPK-fosforilada, en igual magnitud tanto para ERK1 como para ERK2.

NOTA: Sin embargo, hay que tener en cuenta que la interacción por la que conlleva a la disminución de MAPK, es directa en el caso de SrfH-ERK2, pero indirecta cuando se trata de SrfH-ERK1. El hecho de que induzca una disminución de MAPK-fosforilada, tiene como consecuencia la inhibición de su actividad.

Otra proteína efectora, SspH1, también ayuda en el proceso; SspH1, una proteína con repeticiones LRR (“leucine-rich repeat”), se localiza en el núcleo de la célula invadida e inhibe la expresión génica dependiente del factor NF- κ B.

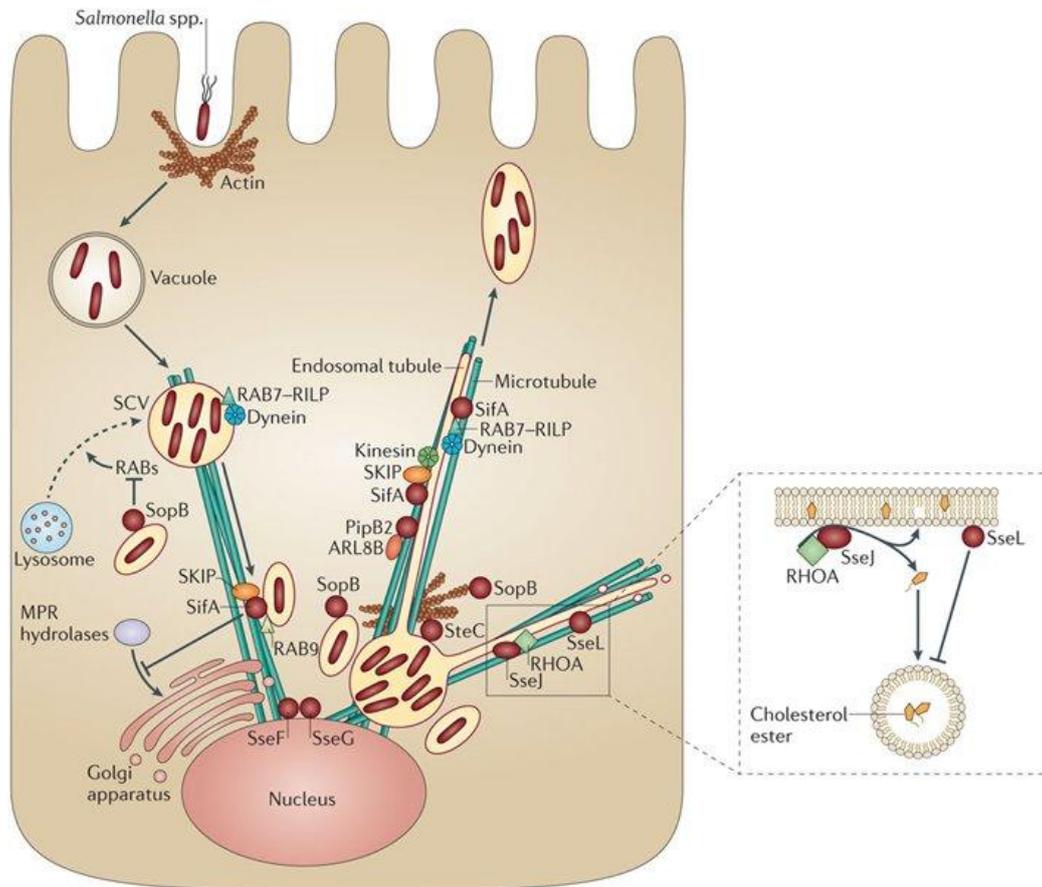
En resumen, la estimulación de las GTPasas Rho por *Salmonella* conduce a dos respuestas claramente definidas: (a) reorganizaciones del citoesqueleto de actina que conducen a la “toma” de la bacteria, y (b) la estimulación de las vías de las proteín-

quinasas activadas por mitógenos que conducen a inducir respuestas inflamatorias que, además de ser responsables de los síntomas de gastroenteritis que acompañan a la infección, van a favorecer la expansión de la infección (**Fig. 7**).

SopB (proteína efectora inyectada a través del SPI1-T3SS) también contribuye a agudizar los síntomas de la enfermedad intestinal al aumentar la concentración intracelular de D-mio-inositol 1,4,5,6-tetrafosfato, un compuesto que estimula la secreción de cloro y el flujo de fluidos desde las células del epitelio intestinal.

4.2.4. Multiplicación de *Salmonella* en el interior de la vacuola

Una vez que se produce la entrada en la célula, *Salmonella* se va a localizar en una vacuola que va a experimentar modificaciones importantes en su superficie, por lo que es denominada SCV (“*Salmonella*-containing vacuole”). En las células epiteliales, esta SCV adquiere marcadores lisosomales, como son LAMP1 (“lysosome-associated membrane protein 1”), RAB7, ATPasa vacuolar y colesterol. RAB7 interacciona con RILP (“RAB interacting lysosomal protein”) y la proteína del motor microtubular dineína, lo que va a favorecer el movimiento de la SCV a posiciones más centrales en la célula (**Fig. 10b**). En ese momento, la bacteria va a secretar una serie de proteínas efectoras a través del sistema de secreción tipo III de la SPI-2. Estas proteínas efectoras van a alterar el tráfico vesicular, de tal manera que moléculas metabólicamente importantes, como aminoácidos y lípidos, van a ser dirigidos a la vacuola SCV. Probablemente con la finalidad de aumentar la superficie de intercambio, la bacteria va a inducir la formación de prolongaciones tubulares de la SCV. La proteína efectora SifA va a interacción con la proteína celular SKIP (“kinesin interacting protein”), que va a activar a la proteín-quinasa (kinesina) del motor microtubular para la formación de estas extensiones tubulares.



Nature Reviews | Microbiology

Figura 10b. Manipulación de las membranas del hospedador por parte de Salmonella spp.

Después de la invasión, *Salmonella* spp. reside en un compartimento vacuolar que sufre varios cambios en su superficie, y alteraciones que la distinguen morfológicamente, formando la vacuola que contiene a *Salmonella* (SCV). En algunos tipos celulares (como las células epiteliales), las SCV adquieren marcadores de compartimento endosomal tardío, incluyendo la proteína de membrana 1 asociada a lisosomas (LAMP1), RAB7, ATPasa vacuolar, y colesterol. RAB7 interacciona con la proteína lisosomas que interacciona con RAB (RILP), y la proteína dineína motora de microtúbulos, y este complejo es importante para el movimiento centrípeto de la SCV en la célula en la infección temprana. Los efectores de la isla de patogenicidad 2 de *Salmonella* (SPI-2), son liberados por la membrana de la SCV, al citosol de la célula hospedadora, mediante el sistema de secreción tipo III. Estos efectores se distribuyen a diferentes localizaciones en la célula, y son requeridos para las modificaciones vacuolares de SCV, y el movimiento basado en microtúbulos, incluyendo el promover la formación dinámica de túbulos endosomales. La unión de SseF a RHOA resulta en una modificación directa del contenido lipídico de SCV y túbulos endosomales (productores de ésteres de colesterol), mientras que SseF contrarresta esta actividad disminuyendo la acumulación de gotas lipídicas en las células. SseF y SseG promueven la construcción de microtúbulos y la agregación de vesículas endosomales, así como reclutan vesículas derivadas del Golgi a la SCV. SteC induce

reorganizaciones en la actina alrededor de la SCV y puede alterar la posición de la SCV dentro de la célula, y SopB induce la fosforilación y activación de miosina II indirectamente. La actividad fosfatasa de SopB reduce la carga de la membrana de SCV previniendo la acumulación de RABs, que son importantes para promover la fusión de SCV al lisosoma. SifA se une a SifA eucariótico, y a las proteínas que interactúan con kinesina (SKIP9, que activan la proteína motora microtubular kinesina, para mediar la extensión de los túbulos endosomales. PipB2 está involucrado en reclutar a kinesina a la SCV y los túbulos endosomales donde probablemente contribuye a la formación de microtúbulos con ARLdeltaB. SifA-SKIP también se une a PLEKHM1, que resulta en el reclutamiento del complejo RAB7-HOPS para mediar la llegada de membrana fagolisosomal a la SCV. La unión de SifA a RAB7 puede modificar las interacciones entre RAB7-RILP y dineína, lo que podría resultar en un movimiento periférico incrementado de los túbulos endosomales. La unión de SifA a RAB9 bloquea el transporte retrógrado de los receptores de manosa-6-fosfato y las hidrolasas MPR hacia el aparato de Golgi, lo que bloquea la fusión lisosomal con las SCV. *Salmonella* spp. Manipula las células hospedadoras para dirigir SCV hacia el núcleo y entonces promover el movimiento de la SCV hacia la periferia celular, donde las bacterias serán liberadas al lumen intestinal para infectar las células vecinas. LaRock et al (2015).

Durante la maduración de la vacuola SCV, en un proceso también dependiente de la actividad del SPI2 T3SS, la bacteria induce la formación de una malla de actina alrededor de la vacuola y que parece ayudar a mantener la integridad de la misma. La importancia de esta modificación del citoesqueleto resulta evidente de experimentos con inhibidores de la polimerización de actina; en presencia de estos inhibidores, la bacteria termina accediendo al citoplasma donde no es capaz de replicarse.

Por otro lado, la migración de la SCV a una posición perinuclear, en proximidad con el aparato de Golgi, va a facilitar una mejor intercepción de vesículas de transporte (endocítico y exocítico) para así obtener nutrientes y componentes membranosos.

La proteína SopB, mediante su actividad fosfatasa, reduce la carga de la membrana de la SCV, lo que va a limitar la presencia de moléculas RABs, y la fusión de nuevos lisosomas. La unión de SifA a RAB9 también va a contribuir a bloquear la fusión de lisosomas a la SCV.

También se ha visto que en fases avanzadas de la multiplicación intracelular la SCV migra desde su localización perinuclear hacia la periferia, lo que podría favorecer una fusión con la membrana celular y la liberación de la bacteria al lumen intestinal desde donde podría infectar a otras células epiteliales.

SCV interacciona, además, con diferentes Sintaxinas, en función de la etapa de maduración en que se encuentre. En las últimas etapas, recluta en gran medida a Sintaxina 6, mediante la interacción de su motivo Snare, con la región C-terminal de SipC.

SipC es una proteína imprescindible para la invasión bacteriana de las células epiteliales, y se ha demostrado mediante una serie de experimentos Knock-out (cepas bacterianas carentes de SipC), que SipC tiene un papel importante al dirigir la vacuola de *Salmonella* hacia el aparato de Golgi (al igual que SipB, ambos mediante SPI-2 TTSS), dentro de los macrófagos. Además, es importante para reclutar al marcador LAMP1 (en esta interacción, también interviene Sintaxina 6).

4.3. Regulación de la expresión de los genes de virulencia

Salmonella tiene que adaptarse a cambios ambientales drásticos cuando pasa a lo largo del tracto digestivo y cuando se mueve desde el medio extracelular al intracelular. Durante este proceso, la bacteria va a modular su metabolismo, expresando componentes protectores y produciendo factores tóxicos.

La expresión de los genes de virulencia va a ser dictada por factores ambientales, que actuando sobre vías de regulación génica van a iniciar el proceso de invasión y patogénesis. Se han descrito un número grande de proteínas reguladoras que establecen una compleja red. En la **figura 11** se muestra la red de regulación que opera sobre la isla de patogenicidad 1. A continuación se describen los principales factores de regulación.

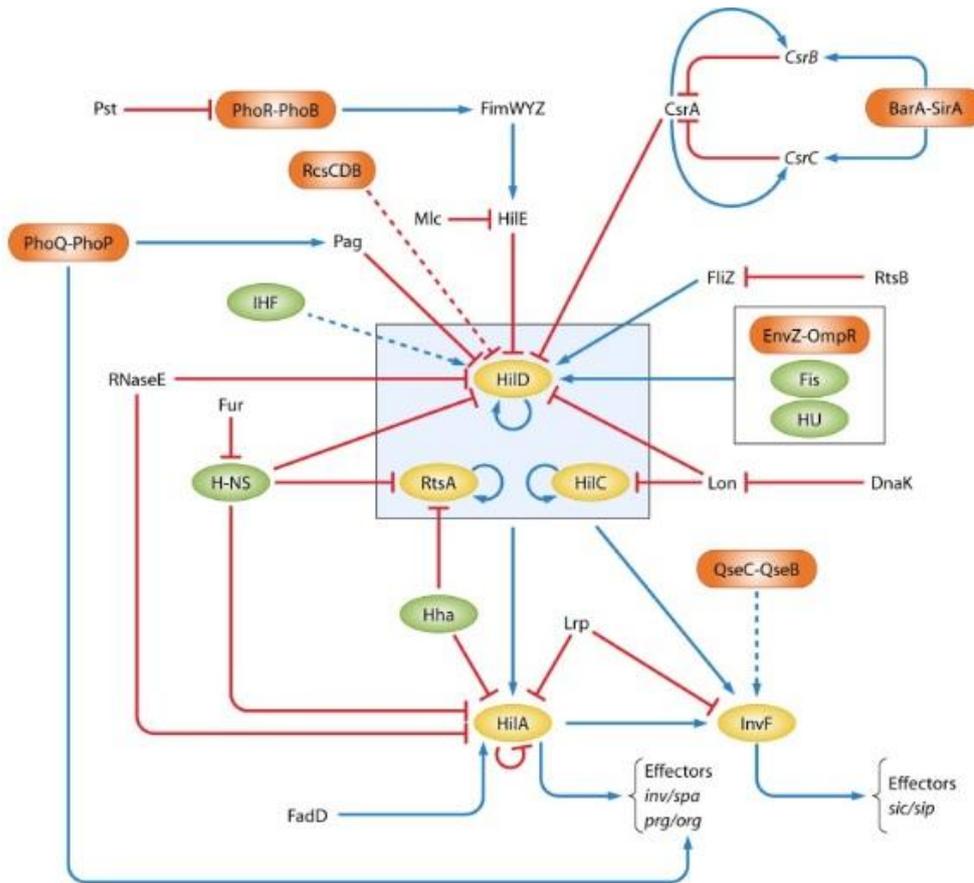


Figura 11. Red de regulación de SPI-1. Las flechas azules indican activación o auto-activación, mientras que las flechas con final rojo indican represión o auto-represión. Las flechas discontinuas sugieren la regulación putativa de la diana propuesta en este modelo. Los reguladores en amarillo son aquellos codificados por el SPI-1 (a excepción de RtsA), que juegan un papel crítico en la regulación del fenotipo de invasión. Los azules se refieren a NAPs, mientras que el naranja claro es usado para 2CRSs. Las interacciones positivas de regulación entre HilD, HilC y RtsA han sido omitidas para evitar complicar la figura. La activación directa de HilA por SirA no ha sido incluida en este modelo debido a la falta de datos que la corroboren. La activación de IHF se deduce que es mediada por HilD y por Fis y HU, de acuerdo con la información proporcionada en el texto. El efecto represor PhoQ-PhoP en los genes prg, podría ocurrir mediante la represión de HilA por medios de represión post-transcripcional de HilD, puesto que no se ha reportado ningún efecto directo en estos genes SPI-1. De acuerdo con este modelo, todos los 2CRSs ejercen su efecto mediante HilD, a excepción de QscC-QscB, que se sabe actualmente que afecta sólo a InvF. Por esta razón, hemos usado una flecha discontinua, a pesar de la posibilidad de que también esté actuando a nivel de HilD. Es más, la mayoría de señales de regulación son integradas a nivel de HilD, principalmente por la modulación post-transcripcional, que conlleva la jerarquía de los reguladores codificados por SPI-1. Fabrega and Vile (2013).

HilA es un activador transcripcional que pertenece a la familia OmpR/ToxR; está codificado en la SPI-1 y se autorregula de forma negativa. Este regulador desempeña un papel central y, de hecho, una delección del gen *hilA* es equivalente a la delección completa del locus SPI-1. HilA también es un activador transcripcional del operón SPI-4 y del gen *sigD* (SPI-5). En cambio, HilA tiene un efecto represor sobre la expresión de los genes SPI-2.

La expresión de HilA está controlada por tres activadores transcripcionales de la familia AraC: HilC y HilD (ambos codificados en la SPI-1), y RtsA. Cada uno de estos activadores se une al promotor de *hilA* y también tienen un efecto autoactivador de su propia expresión.

El regulador negativo más importante de la expresión de HilA es HilE. Se encuentra codificado fuera de la SPI-1. La interacción con la proteína HilD parece ser el mecanismo por el que ejerce su efecto represor de la expresión de *hilA* (**Fig. 12**).

Una vez dentro de la vacuola, *Salmonella* va a activar la expresión génica de factores que contrarresten los efectos dañinos del ambiente fagosomal. Con este fin, *Salmonella* cuenta con el sistema PhoPQ que va a “sentir” los cambios ambientales que se producen en la vacuola que contiene a la bacteria.

Los sistemas reguladores de dos componentes son empleados por los microorganismos para sentir y responder a los cambios del ambiente. Por lo general, estos sistemas están formados por una histidín-quinasa, que siente un determinado estímulo ambiental, y un regulador que media la respuesta celular, principalmente a través de la expresión diferencial de ciertos genes. En respuesta a una determinada señal ambiental, la proteína sensor se autofosforila en un residuo de histidina localizado en el dominio transmisor. A continuación, el grupo fosforilo es transmitido a un aspartato localizado en un dominio receptor de la molécula reguladora. Los reguladores también contienen un dominio efector, que tras la fosforilación adquiere una mayor afinidad por el DNA y su unión va a conducir a una modificación de la transcripción de los genes blanco.

El sistema PhoPQ está compuesto de un sensor unido a membrana, la quinasa PhoQ (conocida también como PagJ), y el regulador de respuesta PhoP (también llamado PagK), que es citosólico (**Fig. 12**). PhoQ es una proteína de membrana con un dominio sensor situado en el periplasma y un dominio quinasa situado en el citoplasma. La activación de PhoQ en respuesta a señales ambientales específicas (bajo pH o la presencia de CAMPs) conduce a una autofosforilación de PhoQ y una posterior

transferencia del grupo fosfato a PhoP. La forma Fosfo-PhoP va a activar o reprimir la transcripción de alrededor de 200 genes. Entre los genes que se reprimen están el sistema de secreción tipo III (de la SPI-1) y los genes codificantes para proteínas del flagelo. En cambio, PhoPQ activa muchos genes de virulencia entre los que se encuentran el sistema de secreción tipo III (de la SPI-2), muy importante en la modificación de la vacuola a un nicho favorable para la replicación de la bacteria.

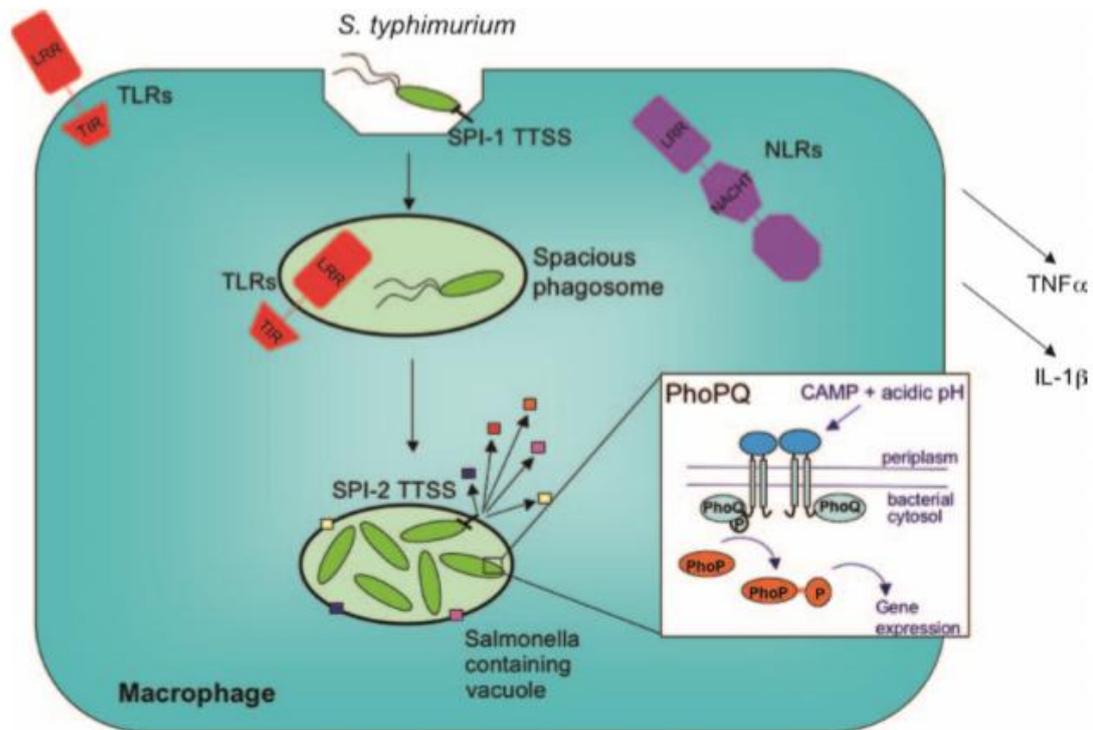


Figura 12. Supervivencia de Salmonella en el interior del macrófago. Siguiendo la entrada mediada por SPI-1 TTSS, Salmonella se encuentra en un fagosoma. A medida que la infección progresa, el ambiente fagosomal activa el sistema PhoQ, mostrado en el panel. PhoQ activa muchos genes de virulencia, incluyendo el SPI-2 TTSS, que se encuentra involucrado en la remodelación de la vacuola, para ser un nicho replicativo. Mientras tanto, los receptores de los macrófagos de la respuesta inmunitaria innata, los TLRs y NLRs, reconocen los ligandos bacterianos y causan secreción de señales inflamatorias, incluyendo IL-1Beta y TNF-alfa. LRR, “Repeticiones rica en Leucina”, TLR, “Receptores de Interleuquina 1 Toll”. Prost et al. (2007).

->Hay otro homólogo de PhoP (PagK), nombrado como PagK2.

->Se necesitan los 3 factores del sistema PhoPQ para que se desarrolle la virulencia del complejo, y los tres precisan de su región N-terminal para poder ser funcionales.

Las bacterias Gram negativas en general, producen OMVs (outer membrane vesicles): son unas vesículas compuestas por proteínas de membrana extracelular, proteínas específicas periplásmicas, lipopolisacáridos y fosfolípidos. Sirven para transferir determinantes de virulencia a bacterias adyacentes, o a células eucarióticas. Se ha observado que PagK2 es transportado en estas OMVs, así como una exotoxina de *S. Typhi* (la exotoxina CdtB), en un entorno de infección. **(Fig.13)**. Estas OMVs son producidas como un factor de virulencia, en respuesta al sistema inmune del hospedador. Aún no se conoce bien el bucle de retroalimentación que se establece entre el SPI-2 tipo III de secreción, y el transporte de proteínas en las OMVs, ni cómo las proteínas específicas son introducidas en las mismas, ni cómo éstas son depositadas en las SCVs.

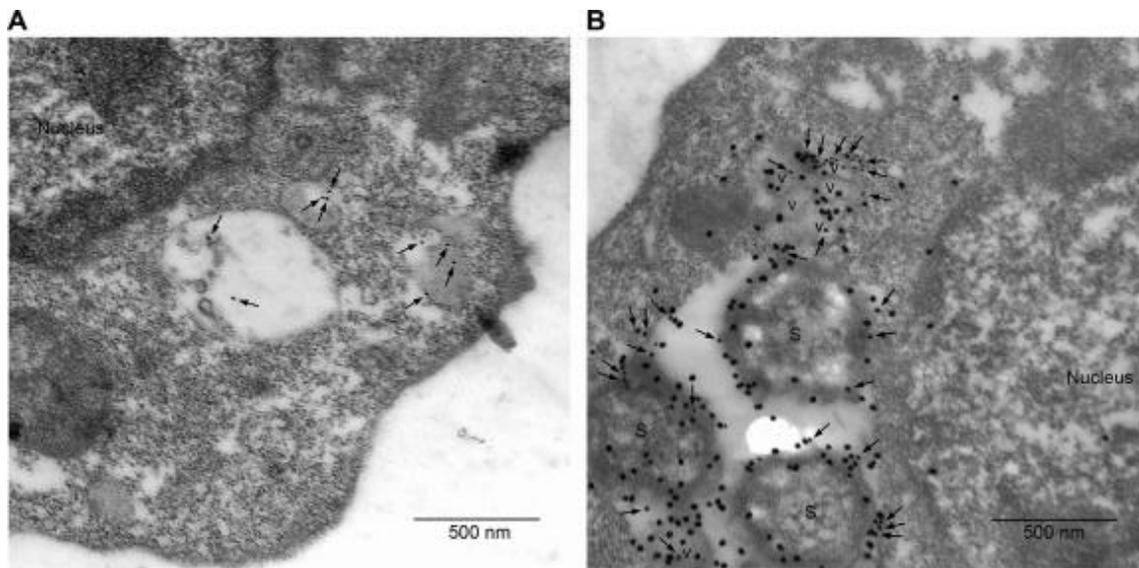


Figura 13. Macrófagos sin infectar (A) y macrófagos infectados por *Salmonella* (B).

Salmonella y las OMVs están marcadas con “S” y “V”, respectivamente. [Hyukin Yoon et al \(2011\)](#).

5. INTERACCIÓN DE *SALMONELLA* CON LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas (DCs) constituyen el eslabón entre la inmunidad innata y la adaptativa. En el estado normal, las DCs se encuentran estratégicamente localizadas en tejidos periféricos que están expuestos a la infección por patógenos. En estos sitios, las DCs actúan de centinelas para la detección de cualquier microbio invasor. Las DCs, a través de receptores específicos tales como los TLRs (“Toll-like receptors”),

reconocen a los PAMPs (“Pathogen-associated molecular patterns”) bacterianos. Antes del reconocimiento de los PAMPs, las DCs están en un estado inmaduro, en el que son muy eficientes en la captura de antígenos microbiales a través de fagocitosis. Como una consecuencia del reconocimiento de los PAMPs, las DCs experimentan cambios metabólicos y fenotípicos conocidos como maduración, entre los que se encuentran una disminución en su capacidad fagocítica y una expresión aumentada de moléculas de superficie requeridas para una activación eficiente de células T “naïve” específicas de antígeno; entre otras, se aumenta la expresión en superficie de moléculas MHC-I y –II. Además, durante la maduración, las DCs adquieren la capacidad para migrar desde los tejidos periféricos a los órganos linfoides secundarios, donde residen las células T “naïve”. En los nódulos linfáticos, las DCs activan a las células T mediante la presentación de antígenos microbianos acoplados a MHC al tiempo que se activan vías de señalización a través de moléculas coestimuladoras. Así, las DCs activan células T específicas de antígeno que promueven el establecimiento de eficientes respuestas inmunitarias adaptativas celulares y humorales, encaminadas a frenar la proliferación y diseminación de los microbios en el hospedador. En este proceso de activación también son secretadas varias citoquinas que son importantes para el propio proceso de activación

En los últimos años se ha puesto de manifiesto la importancia que las DCs, situadas en los sitios de entrada de *Salmonella*, desempeñan en la diseminación de la bacteria. Estudios *in vivo* han mostrado que las DCs son capaces de captar *S. Typhimurium* en el sitio de infección. Además, se ha visto que la flagelina de *Salmonella* induce la secreción, por parte de las células epiteliales, de la citoquina CCL20, que es quimioatrayente de DCs inmaduras. El lipopolisacárido (LPS) de *Salmonella* también se ha visto que es capaz de inducir la maduración y migración de DCs. Dado que las DCs son capaces de captar a *S. Typhimurium* y responder a los PAMPs derivados de este patógeno, iniciando su maduración y migración desde los sitios periféricos de infección a los tejidos linfoides, parece que en estos primeros momentos *S. Typhimurium* no interfiere significativamente con la función de las DCs. Esta migración hacia tejidos más profundos representa una ayuda para la diseminación sistémica de estos patógenos bacterianos (**Fig.14**)

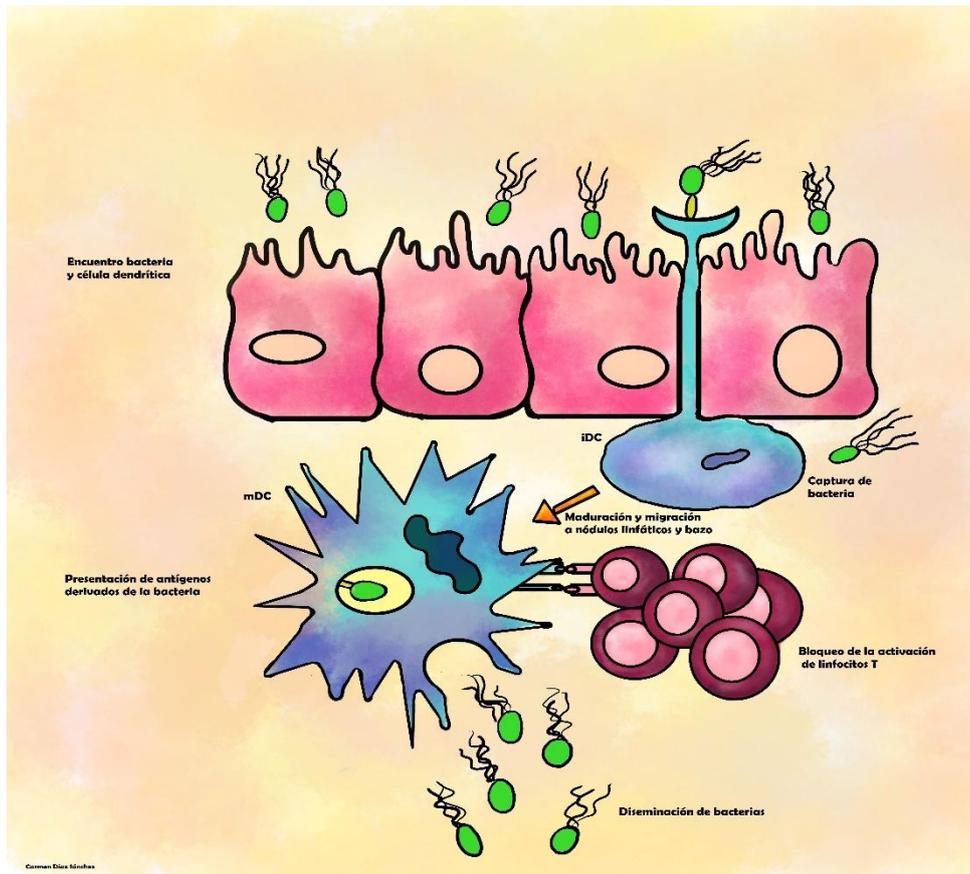


Figura 14. Captura y diseminación de *Salmonella*. Figura de elaboración propia.

Sin embargo, aunque las DCs infectadas con *Salmonella* son capaces de llegar a los nódulos linfoides, éstas no son capaces de iniciar una respuesta inmunitaria efectiva frente a la bacteria, probablemente porque las DCs infectadas tienen una capacidad reducida para activar a las células T “naïve” específicas frente a *Salmonella*. Se ha encontrado que la infección por *S. Typhimurium* reduce la expresión de moléculas MHC en la superficie de las células dendríticas, tanto humanas como de ratón. En consecuencia, *Salmonella* ha evolucionado adquiriendo mecanismos moleculares que permiten secuestrar a las DCs y usarlas como vehículos (caballos de Troya) para expandirse sistémicamente.

Una vez dentro de las DCs, *S. Typhimurium* es capaz de sobrevivir en estas células durante largos periodos de tiempo, residiendo en vacuolas especializadas. Hay varias evidencias experimentales que indican que *Salmonella* interfiere en el proceso de fusión fagosoma/lisosoma en las DCs. Además, para este proceso se requiere de la inoculación a través del sistema de secreción tipo III (codificado en la SPI-2) de proteínas efectoras en el citoplasma de las DCs. Entre las proteínas bacterianas responsables de este efecto está la proteína SpiC, una proteína ácida codificada en la

SPI-2 y que es introducida en el citoplasma de la célula hospedadora a través del sistema de secreción tipo III también codificado en el SPI-2. Cuando SpiC se encuentra ya en el citoplasma, interactúa con SsaM (una proteína codificada por SPI-2), y permite que muchas más proteínas efectoras procedentes de SPI-2, sean translocadas al interior de las células diana. De esta manera se interfiere con la presentación de antígenos por las DCs y la no activación de respuestas de células T específicas, lo que va a favorecer la expansión sistémica de esta bacteria.

SpiC es necesaria para la supervivencia de *Salmonella* dentro de CDs, macrófagos y otras células del sistema inmunitario, mediante la modificación de la expresión de FlicC (proteína flagelar), lo que condiciona el ensamblaje del flagelo.

El flagelo es una estructura esencial para la movilidad de la bacteria, y posee un cuerpo, un gancho y un filamento, generado por la acción de, aproximadamente, 50 genes, cuya expresión está organizada en 3 categorías. Entre estas categorías, podemos encontrar: operón flhDC (que permite la transcripción de genes para la cascada flagelar), operón de clase 2 (contiene genes para proteínas asociadas al gancho y cuerpo, algunas proteínas reguladoras, y un componente flagelar específico de la vía de exportación), y el operón de clase 3 (genes implicados en la formación y rotación flagelar, y en quimiotaxis).

En *S. enterica* Typhimurium, el orden de estos 3 operones es jerárquico y necesario; es decir, se expresa en primer lugar el 1, después el 2, y, finalmente, el 3, de forma que si no se expresa el primero, no es posible la expresión de los que le suceden. Si SpiC interfiere directamente con los genes del operón flhDC, no habrá ningún tipo de motilidad. Si interfiere con genes de la clase 3, como puede ser el gen motA (necesario para rotación), existirán débiles capacidades de movimiento. Esta influencia en las características del flagelo, determinarán una mayor o menor virulencia en *Salmonella*.

SpiC induce, además, SOCS-3, que inhibe la señalización vía citoquinas en las células infectadas. Esto ocurre corriente abajo de las vías de ERK y p38 MAPK. A esta regulación, también contribuye el factor NF-KappaB.

Además, SpiC favorece la expresión de IL-8 mediante la translocación de flagelina a la membrana baso lateral por el sistema SPI-2.

6. EVOLUCIÓN DE *SALMONELLA* EN SU ADAPTACIÓN AL HOSPEDADOR

Los datos derivados del análisis de la evolución de los diferentes serotipos de *Salmonella* sirven para ilustrar aspectos importantes tales como el origen de las enfermedades infecciosas y la emergencia de nuevos patógenos, y cómo las bacterias son capaces de, atravesando la “barrera de especies”, adaptarse a nuevos hospedadores, con los que llegan a establecer relaciones muy especializadas.

De acuerdo a la divergencia de secuencia entre genes ortólogos de diferentes serotipos de *Salmonella* y teniendo en cuenta su origen clonal, se ha estimado que el ancestro común del género debió existir hace unos 25 a 40 millones de años. Por otro lado, se considera que las especies *E. coli* y *S. enterica* compartieron un mismo ancestro hace unos 100 millones de años.

Se ha propuesto que la virulencia en el género *Salmonella* ha debido evolucionar en tres etapas (**Fig. 15**). La primera fase consistió en la adquisición de la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI1) mediante transferencia génica horizontal mediada por fagos o plásmidos. SPI1 debió ser adquirida por alguna línea ancestral de todos los serotipos de *Salmonella*, dado que está presente en todas las líneas filogenéticas del género *Salmonella* pero ausente de *E. coli* y otros organismos relacionados.

SPI1 codifica para los factores de virulencia que median los mecanismos empleados por los serotipos de *Salmonella* durante su fase intestinal de infección, incluyendo la invasión de las células del epitelio intestinal, la inducción del reclutamiento de neutrófilos y la secreción de fluidos intestinales.

El análisis comparativo de secuencias de genes codificantes y genes rRNA ha revelado que el género *Salmonella* consta de dos linajes, que se han propuesto como dos especies distintas, designadas *S. enterica* y *S. bongori* (**Fig. 15**). La formación de estas dos especies puede considerarse como una segunda fase en la evolución de la virulencia en el género *Salmonella*, dado que en el paso de separación de ambas especies tuvo lugar la adquisición de nuevos determinantes de virulencia mediante transferencia génica horizontal.

Los serotipos de *S. enterica* poseen una segunda isla de patogenicidad, designada SPI2, que no está presente en los serotipos de *S. bongori*. Un posible mecanismo para la adquisición de SPI2 mediante transferencia horizontal se sugiere por su inserción en el gen que codifica para el tRNA^{Val}, una región de DNA que facilita la

integración de material genético dado que los genes tRNA sirven como sitios de anclaje para las integrasas de los bacteriófagos.

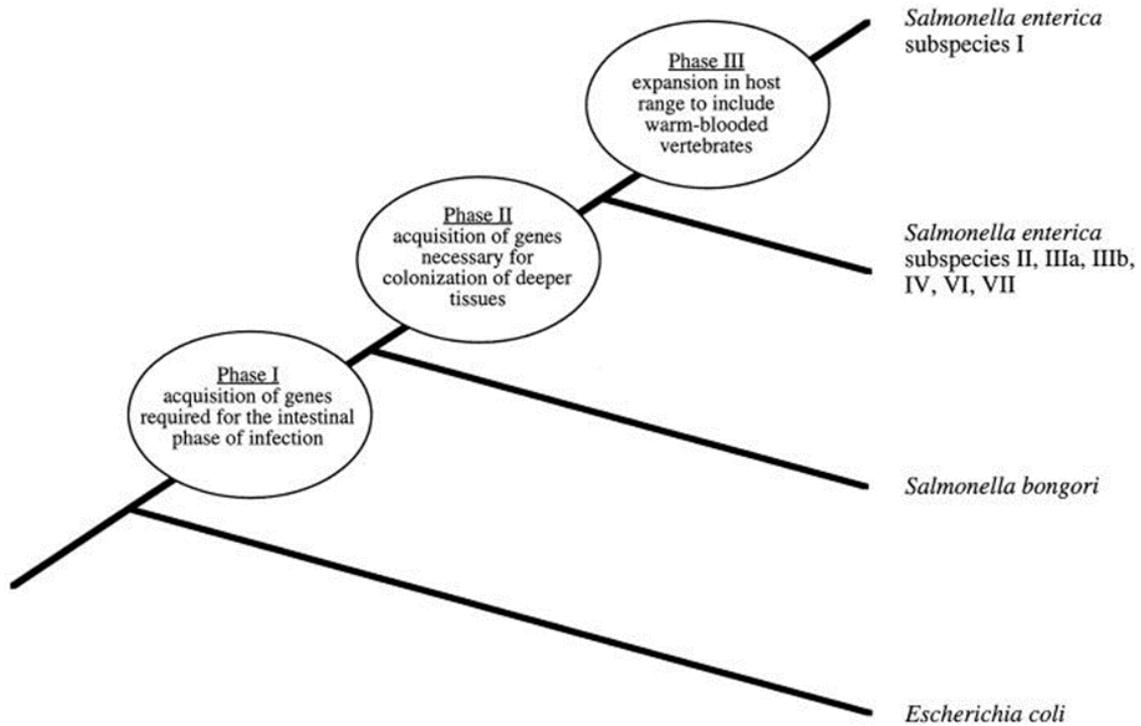


Figura 15: Modelo de la evolución de la virulencia en el género *Salmonella*. Desde su separación con la línea de *E.coli*, la evolución de *Salmonella* se realizó en tres fases. El árbol filogenético no está hecho a escala. Baumler et al (1998).

Experimentos realizados en ratones revelaron que las mutaciones en SPI1 atenúan al serotipo *Salmonella* Typhimurium entre 15 y 50 veces después de la inoculación oral pero no muestran ningún fenotipo atenuado cuando la fase intestinal de la infección es evitada mediante la inyección intraperitoneal. En contra, mutantes en SPI2 atenúan al serotipo *Salmonella* Typhimurium más de 10.000 veces aunque se realice una inoculación intraperitoneal. Estos datos indican que los genes de virulencia localizados en SPI1 y SPI2 se requieren en fases diferentes, durante las fases intestinal y sistémica, respectivamente, de la infección.

La transición entre los sistemas SPI-1 y SPI-2 depende de las condiciones ambientales en el hospedador y de mecanismos de regulación.

Fue demostrado que SsrB es clave para la transición de expresión de SPI-1 a SPI-2.

Según investigaciones recientes, SsrB reprime la expresión de SPI-1 y de los genes implicados en el desarrollo del flagelo in vitro cuando *S. Typhimurium* está dentro de un macrófago. Un regulador de la transcripción, TyiA, reprime también la expresión de

los genes de SPI-1 y del desarrollo del flagelo y permite también evitar la piroptosis del macrófago. (**Figura 16**).

Los datos demuestran que SsrB reprime la expresión de SPI-1 actuando sobre los genes de regulación *hilD* e *hilA*. Fijándose sobre el promotor de *hilD*, SsrB impide la unión de la RNA polimerasa al promotor y así inhibe también la expresión de *hilA*.

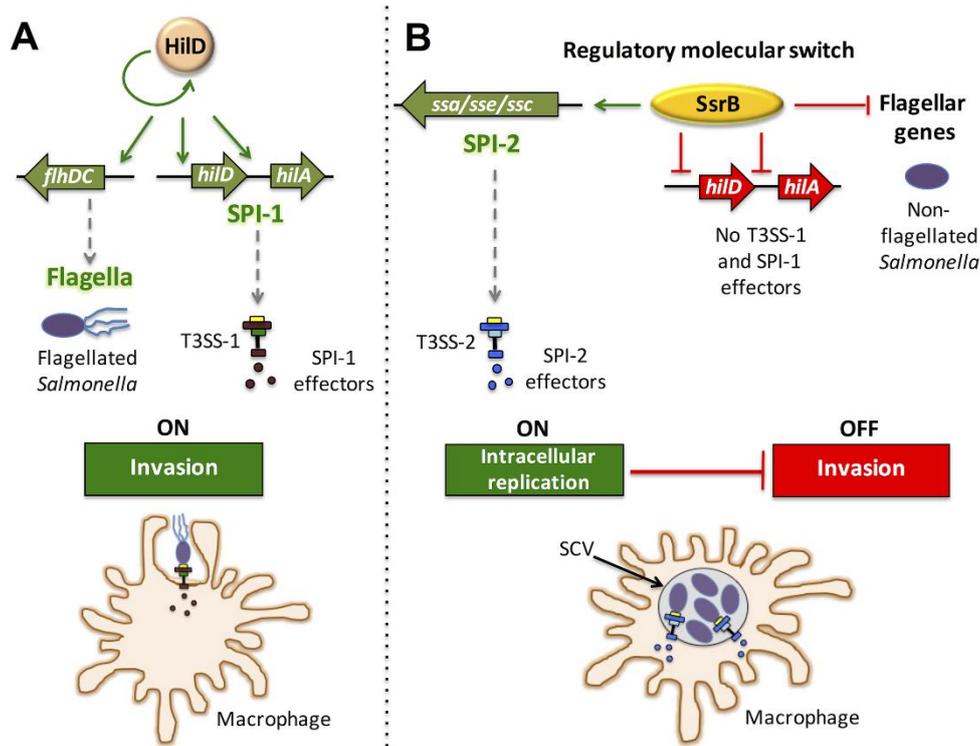


Figura 16: SsrB está implicada en la regulación molecular de la transición entre las fases de infección y de supervivencia dentro de los macrófagos.

- A. HilD activa directamente o indirectamente la expresión de los genes SPI-1 y otros genes, incluidos los del desarrollo del flagelo, necesarios para la invasión de las células hospedadoras.
- B. Salmonella sobrevive dentro una vacuola donde SsrB induce la expresión de los genes SPI-2 y otros genes necesarios para sobrevivir y replicarse. Además, SsrB reprime la expresión de *hilD* e *hilA*, que regulan la expresión de los genes de SPI-1, y reprime genes del desarrollo del flagelo.

Pérez-Morales et al (2017).

La SPI2 tiene un tamaño de 40-kb y por análisis de secuencia se ha estimado que existen 42 fases de lectura abierta (**Fig. 17**). Esta región se subdivide en dos partes; la

primera tiene un tamaño de 25 kb y codifica por el sistema de secreción tipo III. Está presente en los serotipos de *S. entérica* pero no en los serotipos de *S. bongori*. La segunda parte tiene un tamaño de 15 kb y codifica por la tetrionate reductasa implicada en la respiración anaeróbica. Los serotipos de *S. bongori* y *S. enteérica* la poseen ambos. Esta segunda parte no es esencial para la virulencia de Salmonella. La región SPI-2 es rica en AT. Muchos de los genes del locus SPI2 muestran similitud de secuencia con proteínas de los sistemas de secreción tipo III y se ha propuesto una nomenclatura para estos genes que refleja su posible función. Así, los genes que codifican para los componentes del aparato de secreción tipo III se designan como *ssa* (“secretion system apparatus”), los genes que codifican para proteínas sustrato tipo III y sus chaperonas específicas se designan como *sse* (“secretion system effector”) y *ssc* (“secretion system chaperone”), respectivamente. Los genes que codifican para proteínas reguladoras de los genes de virulencia SPI2 se llaman *ssr* (“secretion system regulator”).

Se considera que es muy improbable que los genes SPI2 sean el resultado de una duplicación de los genes homólogos del locus SPI1, sino que han evolucionado siguiendo caminos diferentes.

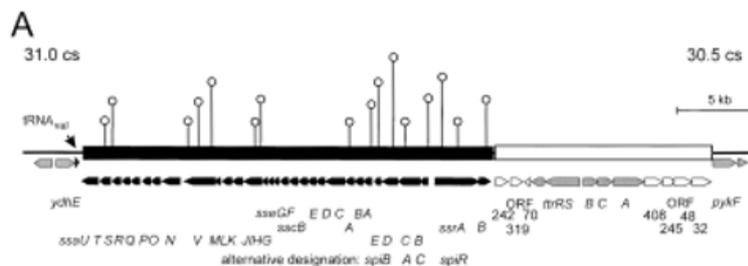


Figura 17: Organización genética de SPI-2.

A. Se muestra el orden y la nomenclatura de los genes de SPI-2. Los genes codificantes para proteínas estructurales y los elementos de regulación del sistema de secreción tipo 3 están representado con fechas llenas. Los genes codificantes para la tetrionato reductasa o con una función no conocida están indicados con flechas sombreadas o abiertas respectivamente. Hensel (2000).

Los análisis *in vitro* sobre las condiciones que inducen la expresión de los sistemas de secreción tipo III de SPI1 o SPI2 indican que ambos sistemas requieren condiciones ambientales diferentes para su inducción óptima. La expresión de SPI1 aumenta por limitación de oxígeno, alta osmolaridad y en la fase tardía del crecimiento

exponencial, condiciones que reflejan las condiciones que encuentra *S. typhimurium* en el lumen del intestino. En cambio, la expresión de los genes SPI2 es inducida por falta de nutrientes, lo que puede reflejar la situación en el interior del fagosoma de la célula hospedadora.

Además, la transición de SPI-1 a SPI-2 depende también de cambios en la estructura del DNA. El gene *invA* (localizado en SPI-1) está reprimido por la relajación de DNA mientras que la expresión de *SsrA* esta activada. La topología de DNA es modificada por las condiciones ambientales.

El DNA experimenta una relación cuando *Salmonella* está dentro del macrófago, pero no dentro de las células epiteliales.

Las moléculas implicadas en la regulación del sistema de secreción tipo III codificado por SPI-1 son las siguientes: *HilA*, sus activadores *HilD*, *HilC* y *RtsA* y su inhibidor *HilE*.

El sistema T3SS-2 está regulado por tres sistemas de dos-componentes: *SsrA/SsrB*, *PhoP/PhoQ* y *EnyZ/OmpR*. El principal es el sistema *SsrA/SsrB* porque *SsrB* activa directamente la transcripción de T3SS-2.

El sistema *PhoP/PhoQ* es necesario para la virulencia de *Salmonella* y su supervivencia dentro los macrófagos.

Además, la expresión de SPI-2 puede ser reprimida por la fijación de la proteína H-NS, que es una NAP (Nucleoid-Associated Proteins) que se une a las regiones ricas en AT como SPI-2 y así inhibe su expresión.

En resumen, en *S. enterica* se da una situación única: existen dos sistemas de secreción tipo III implicados en importantes estrategias de virulencia. El sistema codificado por SPI1 es de importancia fundamental para las funciones de virulencia relacionadas con la interacción con las mucosas, tal como la invasión de las células epiteliales, la inflamación y la inducción de diarrea. En cambio, el sistema codificado por SPI2 se activa bajo condiciones intracelulares y se requiere para la supervivencia y proliferación intracelulares de *Salmonella* (**Fig. 18**). Así, SPI2 representa un ejemplo de un sistema de secreción tipo III empleado para modificar el destino de un patógeno intracelular.

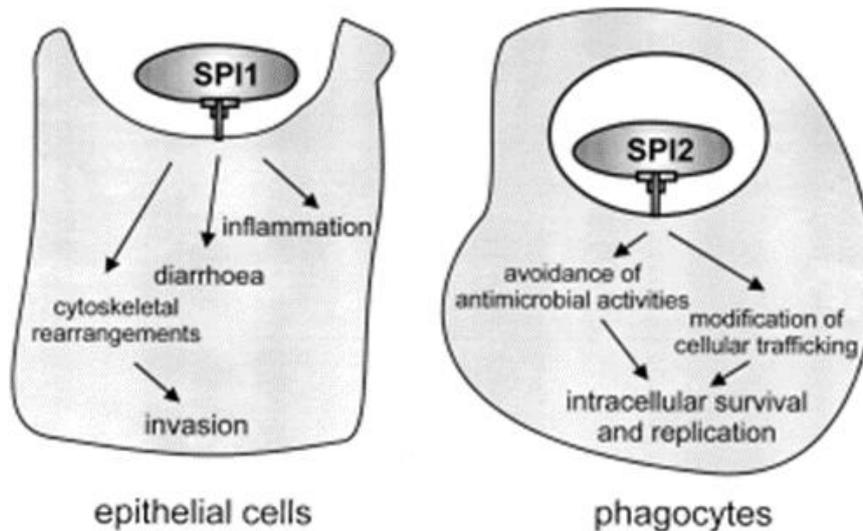


Figura 18: Interacción entre *Salmonella* y las células hospedadoras. *Salmonella* ha desarrollado dos estrategias de virulencia utilizando sistema de secreción. La función del T3SS codificado por SPI-1 es necesaria para invadir las células hospedadoras. Mientras que el sistema T3SS codificado por SPI-2 permite a *Salmonella* sobrevivir y replicarse dentro de las células. Hensel (2000).

Finalmente, *S. enterica* se ha dividido en varios grupos filogenéticos, que se consideran como subespecies. La aparición de uno de estos grupos, *S. enterica* subespecie I, supuso una expansión brusca en el rango de hospedador: mientras que *S. bongori* (esta especie, durante mucho tiempo se clasificó como una subespecie, la V, de *S. enterica*) y las subespecies II, IIIa, IIIb, IV, VI y VII de *S. enterica* están asociadas a vertebrados de sangre fría, los miembros de *S. enterica* subespecie I se aíslan más frecuentemente de aves y hospedadores mamíferos. La adaptación de hospedador de *S. enterica* subespecie I a vertebrados de sangre caliente constituye una tercera fase en la evolución de virulencia del género *Salmonella* (**Fig. 15**).

¿Qué nuevas barreras se encuentran los serotipos de *S. enterica* subespecie I en aves y mamíferos? El sistema inmunitario está más desarrollado y muestra una mejor organización en vertebrados superiores que en los vertebrados de sangre fría. Por ejemplo:

1. Los nódulos linfoides asociados al tubo digestivo de mamíferos y aves están organizados en órganos complejos como los parches de Peyer, las amígdalas, el apéndice o la bolsa de Fabricio en las aves, mientras que esta asociación no existe en los vertebrados de sangre fría. Los nódulos linfáticos periféricos de vertebrados superiores actúan como sistemas de filtración de patógenos, lo que

limita la expansión de los mismos.

2. En aves y mamíferos, las variantes de linfocitos B pueden aparecer después de hipermutación somática y son seleccionadas en los centros germinales de los órganos linfoides al aumentar la afinidad por el antígeno. Por lo contrario, como los vertebrados de sangre fría carecen de estos centros germinales, la afinidad de los anticuerpos no aumenta durante la respuesta inmunitaria. Así, el repertorio de anticuerpos de los vertebrados inferiores (peces, anfibios y reptiles) es mucho menor que en los mamíferos. Las células B seleccionadas en los centros germinales de los vertebrados superiores muestran cambio isotípico y se acumulan como células de memoria. En vertebrados de sangre fría, por otro lado, la memoria inmunológica está pobremente desarrollada y la inmunización repetida con *S. enterica* induce sólo la producción de anticuerpos IgM en reptiles, lo que indica que el cambio de isotipo no ocurre durante la infección con este patógeno.

Dado que los macrófagos de las distintas especies de animales homeotérmicos difieren en su capacidad para neutralizar un serotipo particular de *S. enterica*, la adaptación a nuevos hospedadores debe requerir la adaptación a sus fagocitos mononucleares (**Tabla 1**). Por ejemplo, el serotipo Typhi es capaz de sobrevivir *in vitro* en macrófagos humanos pero no en macrófagos de ratón, mientras que el serotipo Typhimurium, que causa una enfermedad sistémica en ratones, sobrevive bien *in vitro* en macrófagos de ratón pero no en macrófagos humanos. Así, parece que los fagocitos mononucleares son una barrera importante que restringe el rango de hospedador de los serotipos de *S. enterica*.

Aunque *S. enterica* subespecie I contiene 1.531 serotipos diferentes, sólo uno o unos pocos se encuentran asociados a los casos de enfermedad de una especie particular de ave o de mamífero (**Tabla 1**). Los serotipos se establecen en base a las diferencias antigénicas en el antígeno de superficie O (lipolisacárido o LPS) y el antígeno H (flagelar). Estos serotipos muestran diferentes grados de adaptación al hospedador. Los patógenos que carecen de especificidad de hospedador, tales como los serotipos Typhimurium y Enteritidis, tienden a estar más frecuentemente asociados con la enfermedad en animales jóvenes, sugiriendo que no están adaptados de forma óptima para enfrentarse con un sistema inmunitario maduro. Los serotipos que son específicos de hospedador, por otro lado, han adquirido la capacidad de romper los mecanismos de

defensa en animales maduros, como indica su asociación, con similares índices, con la enfermedad en todos los grupos de edad. Además, los serotipos específicos de hospedador tienden a ser más virulentos como lo ilustra el hecho de que causen mayores índices de mortalidad.

Muchos de los genes codificantes para proteínas efectoras asociadas a patogenicidad se encuentran en locus correspondientes a bacteriófagos, tanto crípticos como funcionales, lo que indica que estos genes efectores constituyen un conjunto dinámico y móvil de genes asociados a virulencia. La combinación de genes efectores en los distintos serotipos de *Salmonella* van a contribuir a la especificidad de hospedador y a la severidad de la enfermedad que son característicos de los diferentes serotipos.

Otras diferencias entre los diferentes serotipos de *Salmonella* parecen radicar en los llamados plásmidos de virulencia. Sin embargo, hasta el momento no se conoce el o los organismos de procedencia de estos plásmidos. Además de la transferencia horizontal, sucesos de delección y de divergencia de secuencia por mutaciones puntuales son también eventos que han contribuido a cambios en los rangos de hospedador de los serotipos de *S. enterica*.

6.1. Genes antivirulencia perdidos en la evolución hacia patogénesis en *Salmonella*

La pérdida de genes puede ser tan importante como la adquisición de otros para la supervivencia del patógeno en el hospedador. Es común que cuando una bacteria se adapta a un nicho más específico se produce un fenómeno de pérdida de función en algunos genes. Cuando ciertos productos génicos o vías metabólicas pasan a ser superfluos en el nuevo ambiente, las mutaciones comienzan a acumularse en estos genes prescindibles. En estas primeras etapas de la evolución reduccionista se generan muchos pseudogenes en vías metabólicas no necesarias, aunque se siguen manteniendo otros funcionales. En una etapa posterior, todos o la mayoría de los genes superfluos quedan inactivados, pero restos de los mismos aun permaneces en el genoma. Esta etapa intermedia de evolución reduccionista se observa en patógenos como *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica*, y *Yersinia pestis*. Con el tiempo, las regiones carentes de genes funcionales van a ser gradualmente eliminadas del genoma. En la etapa final de la evolución reduccionista, las bacterias poseen genomas considerablemente más pequeños

y pocos pseudogenes. Los organismos que se encuentran en esta etapa son los endosimbiontes y los patógenos intracelulares obligados, tales como *Buchnera*, *Mycobacterium leprae* y *Chlamydia trachomatis*; estos microorganismos se han adaptado para obtener la mayoría de los nutrientes de sus hospedadores, habiendo perdido numerosas vías biosintéticas.

Una segunda fuerza evolutiva que conduce a una pérdida de genes es la que ocurre en los patógenos. Como la virulencia es un factor crítico para la supervivencia del patógeno en el hospedador, la expresión de cualquier gen que interfiera con la virulencia será perjudicial para el patógeno. En consecuencia, cualquier gen, cuyo producto interfiera con la adecuada expresión de un nuevo factor de virulencia adquirido por el patógeno, va a sufrir un proceso de selección. Así, estos genes que interfieren con los factores de virulencia, y que se les conoce como genes antivirulencia (AVGs, “antivirulence genes”), van a ser inactivados, delecionados o regulados de forma diferencial. Así, un AVG se puede definir como un gen cuya expresión en un patógeno es incompatible con la virulencia del patógeno.

Una de las características que distingue a *Salmonella* de *E. coli* es la capacidad de fermentar lactosa, mientras que *E. coli* es capaz de utilizar la lactosa, *Salmonella* no lo hace. Esto puede resultar paradójico, pues ambos microorganismos se multiplican en el intestino, donde la lactosa es una fuente de energía muy abundante.

En *E. coli* el sistema Lac contiene cuatro genes, tres de ellos forman un operón: *lacZ* (β -galactosidasa), *lacY* (permeasa de lactosa) y *lacA* (transacetilasa). El cuarto gen, *lacI*, codifica el represor del operón y regula negativamente el sistema cuando no hay lactosa en el medio.

En *S. bongori* el sistema Lac ya no es funcional, pues en su genoma solo se encuentran los genes *lacI* y *LacZ*, y el primero es un pseudogén. En la mayoría de las cepas de *S. enterica* no existe ninguno de los cuatro genes.

Cuando de forma experimental se introduce el gen *lacI* funcional en *Salmonella* (carente del operón Lac funcional), la virulencia se reduce de forma significativa en ratones. Aunque la bacteria que expresa *lacI* es capaz de atravesar la barrera intestinal, ésta ha perdido la capacidad de multiplicarse dentro de macrófagos. Estudios con “microarrays” indican que varios de los genes de la SPI-2, codificantes para el sistema de secreción tipo III implicado en la supervivencia dentro de la vacuola, presentan una expresión muy baja en las bacterias que expresan *lacI*.

Aunque el mecanismo exacto de acción no se ha podido dilucidar todavía, la consecuencia funcional es que la bacteria pierde su capacidad para sobrevivir en la vacuola del macrófago y, por tanto, *lacI* debe ser considerado como un AVG en *Salmonella*.

Referencias:

- **Alhenaki A, Abdelgader A, Abuajamieh M, Al-Fataftah AH.** (2017) The effect of heat stress on intestinal integrity and Salmonella invasion in broiler birds. *J. Therm. Biology*: 70, 9-14.
- **Amicizia D, Arata L, Zangrillo F, Panatto D, Gasparini R.** (2017) Overview of the impact of Typhoid and Paratyphoid fever. Utility of Ty21a vaccine. *J. Prev. Med. Hyg.* 58: E1-E8.
- **Bäumler, A.J., Tsolis, R.M., Ficht, T.A. and Adams, L.G.** (1998) Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* 66: 4579-4587.
- **Bernal-Bayard J., Ramos-Morales F.** (2017) Molecular Mechanisms Used by Salmonella to Evade the Immune System. *Current Issues of Molecular Biology.* 25: 133-168.
- **Bliven, K.A. and Maurelli, A.T.** (2012). Antivirulence genes: insights into pathogen evolution through gene loss. *Infect Immun* 80: 4061-4070.
- **Brumell, J. H. and Grinstein, S.** (2004). *Salmonella* redirects phagosomal maturation. *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 78-84.
- **Bueno, S.M., Tobar, J.A., Iruetagoiena, M.I. and Kalergis, A.M.** (2005) Molecular interactions between dendritic cells and *Salmonella*: escape from adaptive immunity and implications on pathogenesis. *Crit. Rev. Immunol.* 25: 389-403.
- **Cardona-Castro N, Sánchez Jiménez MM.** (2003). Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. *Asociación colombiana de Infectología.* Vol 1 (7), 22-29.
- **Cotter, P.A. and DiRita, V.J.** (2000) Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 519-565.
- **Cossart, P. and Sansonetti, P. J.** (2004). Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* 304: 242-248.
- **Crump, J.A., Sjolund-Karlsson, M., Gordon, M.A., and Parry, C.M.** (2015). Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, Antimicrobial Resistance, and Antimicrobial Management of Invasive *Salmonella* Infections. *Clin Microbiol Rev* 28: 901-937.
- **Donnenberg, M.S.** (2000) Pathogenic strategies of enteric bacteria. *Nature* 406: 768-774.
- **Everest, P., Wain, J., Roberts, M., Rook, G. and Dougan, G.** (2001) The molecular mechanisms of severe typhoid fever. *Trends Microbiol.* 9: 316-320.
- **Ephraim Fass, Eduardo A. Groisman** (2009). Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Current Opinion in Microbiology* 2009, 12: 199-204.
- **Eswarappa SM, Karnam G., Nagarajan AG., Chakraborty S., Chakravorty D.** (2009). Lac Repressor Is an Antivirulence Factor of *Salmonella enterica*: Its Role in the Evolution of Virulence in *Salmonella*. *PLoS ONE* 4(6): e5789.
- **Fabrega, A. and Vila, J.** (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev* 26: 308-341.
- **Finlay, B.B.** (1994) Molecular and cellular mechanisms of *Salmonella* pathogenesis. *Cur. Top. Microbiol. Immunol.* 192: 163-185.
- **Galán, J.E.** (1996) Molecular and cellular bases of *Salmonella* entry into host cells. *Cur. Top. Microbiol. Immunol.* 209: 43-60.
- **Galán, J.E., and Wolf-Watz, H.** (2006). Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* 444: 567-573.
- **Galán, J.E. and Zhou, D.** (2000) Striking a balance: modulation of the actin cytoskeleton by *Salmonella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8754-8761.
- **Haraga, A., Ohlson, M.B. and Miller, S.I.** (2008). Salmonellae interplay with host cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 53-66.
- **Hensel, M.** (2000) *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol. Microbiol.* 36: 1015-1023.
- **Hyunkin Yoon, Charles Ansong, Joshua N. Adkins, Fred Heffron.** (2011). Discovery of *Salmonella* Virulence Factors Translocated via Outer Membrane Vesicles to Murine Macrophages. *Infection and Immunity.* Vol. 79 no. 6 2182-2192
- **Kaur J, Jain SK.** (2011) Role of antigens and virulence factors of *Salmonella enterica* serovar

- Typhi in its pathogenesis. *Microbiological Research*. Volume 167, Issue 4, Pages 199-210.
- **Kei-ichi Uchiya, Asami Sugita, Toshiaki Nikai** (2009) Involvement of SPI-2 encoded SpiC in flagellum synthesis in *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. *BMC Microbiology*. 9: 179
 - **Kei-ichi Uchiya, Toshiaki Nikai.** (2008) Salmonella virulence factor SpiC is involved in expression of flagellin protein and mediates activation of the signal transduction pathways in macrophages. *Microbiology*. 154: 3491-3502.
 - **Kingsley, R.A. and Baumler, A.J.** (2002) Pathogenicity islands and host adaptation of *Salmonella* serovars. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 264: 67-87.
 - **LaRock, D.L., Chaudhary, A. and Miller, S.I.** (2015). Salmonellae interactions with host processes. *Nat Rev Microbiol* 13: 191-205.
 - **Lucas, R.L. and Lee, C.A.** (2000) Unravelling the mysteries of virulence gene regulation in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 36: 1024-1033.
 - **Pérez-Morales D, Banda MM, Chau NYE, Salgado H, Martínez-Flores I, Ibarra JA, et al.** (2017) The transcriptional regulator SsrB is involved in a molecular switch controlling virulence lifestyles of *Salmonella*. *PLoS Pathog* 13(7): e1006497.
 - **Richa Madan, Ruchir Rastogi, Seetharam Parashuraman, Amitabha Mukhopadhyay.** (2001) *Salmonella* Acquires Lysosome-associated Membrane Protein 1 (LAMP1) on Phagosomes from Golgi via SipC Protein-mediated Recruitment of Host Syntaxin6. *Journal of Biological Chemistry*. 287(8): 5574-87
 - **Ryan L. Sontag, Ernesto S. Nakayasu, Roslyn N. Brown et al.** (2016). Identification of Novel Host Interactors of Effectors Secreted by *Salmonella* and *Citrobacter*. *Host-Microbe Biology*.
 - **Schlumberger, M.C. and Hardt, W.D.** (2005) Triggered phagocytosis by *Salmonella*: bacterial molecular mimicry of RhoGTPase activation/deactivation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 291: 29-42.
 - **Schmidt, H., and Hensel, M.** (2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 17, 14-56.
 - **Sirard, J.-C., Niedergang, F. And Kraehenbuhl, J.-P.** (1999) Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines. *Immunol. Rev.* 171: 5-26.
 - **Sontag RL, Nakayasu ES, Brown RN, Niemann GS, Sydor MA, Sanchez O, Ansong C, Lu S-Y, Choi H, Valleau D, Weitz KK, Savchenko A, Cambronne ED, Adkins JN.** (2016). Identification of novel host interactors of effectors secreted by *Salmonella* and *Citrobacter*. *mSystems* 1(4):e00032-15.
 - **Thomas P. Moest, Stéphane Méresse.** (2013) *Salmonella* T3SSs: successful mission of the secret(ion) agents. *Current Opinion in Microbiology* 2013, 16: 38-44.
 - **Wallis, T.S. and Galyov, E.E.** (2000) Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol. Microbiol.* 36: 997-1005.