

2013

Adrián Álvarez Varela
Alberto Becerro González
Marcos Fernández Alfara
Lara Pérez Martínez



[SALMONELLA]

Microbiología Clínica

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.	2
2. PATOLOGÍA.	2
3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.	3
3.1. Gastroenteritis.	3
3.2. Fiebre entérica o fiebre tifoidea.	4
3.3. Estado portador.	4
4. INTERACCIÓN DE <i>SALMONELLA</i> CON SU HOSPEDADOR.	4
4.1. Determinantes genéticos de virulencia y su regulación.	4
4.2. Etapas de la infección por <i>Salmonella</i> .	6
4.2.1. Adhesión a las células epiteliales.	6
4.2.2. Papel del sistema de secreción tipo III en la entrada de la bacteria en las células epiteliales.	6
4.2.3. Multiplicación de <i>Salmonella</i> en el interior de la vacuola.	10
4.2.4. Señalización de las células epiteliales.	11
4.3. Regulación de la expresión de los genes de virulencia.	13
5. INTERACCIÓN DE <i>SALMONELLA</i> CON LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS.	15
6. EVOLUCIÓN DE <i>SALMONELLA</i> EN SU ADAPTACIÓN AL HOSPEDADOR.	16
6.1. Genes antivirulencia perdidos en la evolución hacia patogénesis en <i>Salmonella</i> .	19
7. REFERENCIAS.	20

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 Typhimurium, 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. En la figura 1 se muestra los principales serotipos que infectan a humanos por continente.

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.

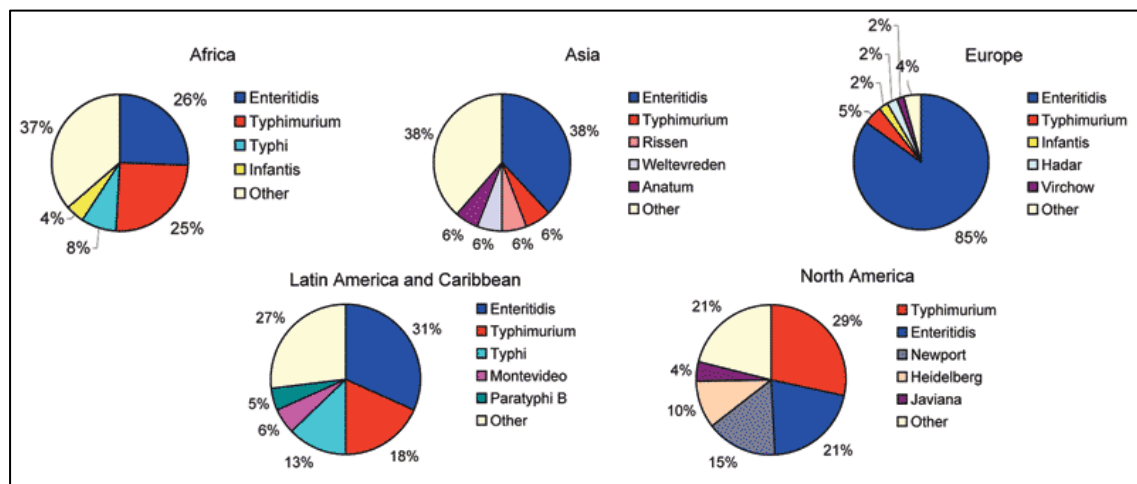


Fig. 1. Distribución de los serotipos de *Salmonella* aislados más frecuentemente en humanos agrupados por continente. 2002. Modificado de Galanis E. et al, 2006.

2. Patología.

Las manifestaciones clínicas particulares están normalmente asociadas con serotipos particulares de *Salmonella* (Tabla 1). 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. 2). 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.

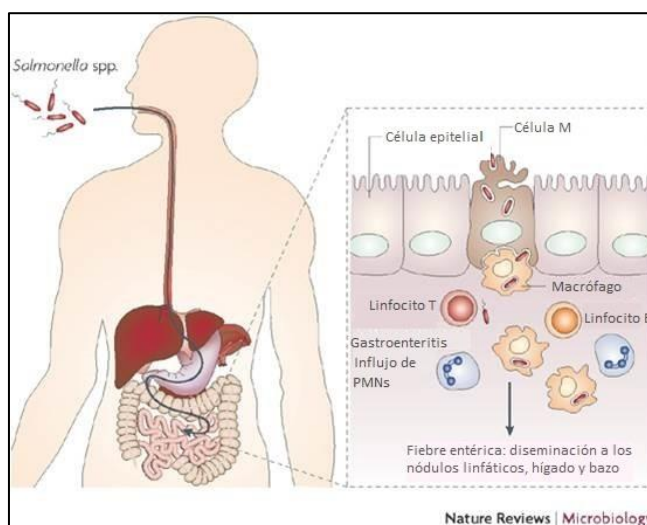


Fig. 2. Infección por *Salmonella*. La bacteria ingerida por vía oral tiene que sobrevivir al bajo pH del estómago y evadir las múltiples defensas que posee el intestino delgado para así poder acceder al epitelio. *Salmonellae* entra preferentemente en las células M, para que las transporte hacia las células linfoides (B y T) que se encuentran en los parches de Peyer subyacentes. Una vez que han atravesado el epitelio, aquellos serotipos de *Salmonella* asociados a enfermedades sistémicas entran en los macrófagos intestinales y se diseminan a lo largo de todo el sistema reticuloendotelial. Por el contrario, las cepas de *Salmonella* no tifoideas inducen una respuesta inflamatoria local temprana, lo que resulta en la infiltración de PMNs (leucocitos polimorfonucleados) en el lumen del intestino y también es inductora de diarrea. Modificado de Haraga, A. *et al.*, 2008.

TABLA 1. Enfermedades causadas por subespecies de *Salmonella* de serotipo I en humanos y vertebrados superiores

Especie hospedadora	Enfermedad	Subespecie de <i>S. enterica</i> de serotipo I más frecuentemente encontrada	Grupos de edad más susceptibles	Signos o síntomas típicos de la enfermedad
Humanos	Enteritis de salmonella Fiebre tifoidea Fiebre paratifoidea	Typhimurium, Enteritidis, Typhi Sendai, Paratyphi A, B y C	Niños (≤ 4 años) Niños y adultos Niños y adultos	Diarrea, disentería, fiebre Septicemia, fiebre Septicemia, fiebre
Ganado	Salmonelosis	Typhimurium Dublin	Terneros (≤ 8 semanas) Terneros y ganado adulto	Diarrea, disentería, septicemia, fiebre Diarrea, disentería, septicemia, abortos, fiebre
Aves de corral	Enfermedad de pullorum Tifosis aviar Paratífosis aviar	Pullorum Gallinaurum Enteritidis, Typhimurium	Aves recién nacidas Existencias y adultos Aves recién nacidas	Diarrea, septicemia Diarrea, cresa decolorada, septicemia Diarrea, septicemia
Oveja	Salmonelosis	Abortusovis Typhimurium	Ovejas adultas Corderos Corderos	Septicemia, aborto, descargas vaginales Diarrea, disentería, septicemia Diarrea, disentería, septicemia
Cerdos	Paratífosis porcina Salmonelosis Paratífosis crónica	Cholearaesuis Typhimurium Typhisuis	Cerdos destetados y adultos Cerdos destetados (≤ 4 meses)	Decoloración de la piel, septicemia, fiebre Diarrea Diarrea intermitente
Caballos	Salmonelosis	Abortusequi Typhimurium	Caballos adultos Potros Potros	Septicemia, aborto Diarrea, septicemia Diarrea, septicemia
Roedores salvajes	Tifosis murina	Typhimurium, Enteritidis.		Septicemia, fiebre

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 ileon, 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 600.000 muertes. Esta enfermedad es común en niños de países de África y Asia y está asociada a pobres condiciones sanitarias en el tratamiento de aguas.

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 o 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.

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.

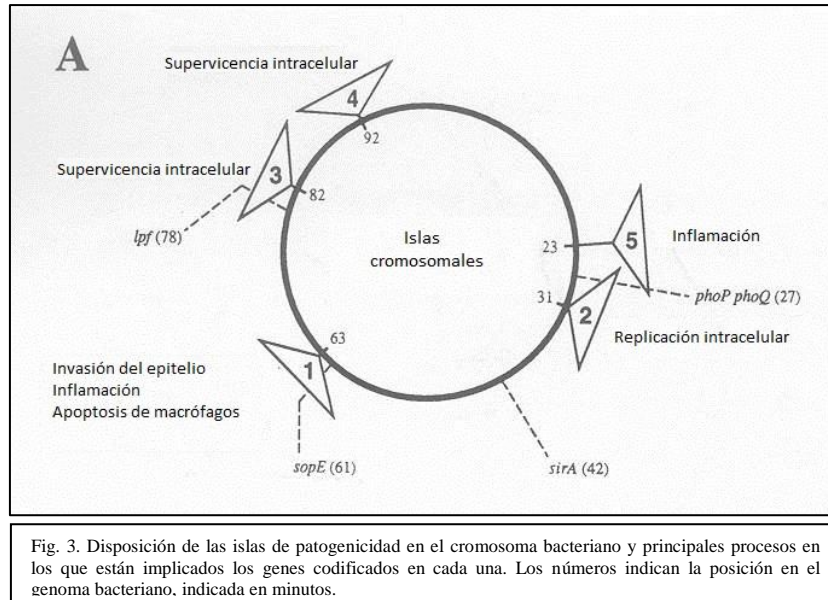
La mayoría de los genes de virulencia de *S. typhimurium* se encuentran agrupados en distintas secuencias referidas como “islas de patogenicidad” o SPI (Fig. 3). Se han identificado unas 12 regiones SPI en el genoma de *Typhimurium*, numeradas de acuerdo al orden cronológico de su descubrimiento. A continuación se describen algunas características de las cinco mejor caracterizadas.

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^{Vai} 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.

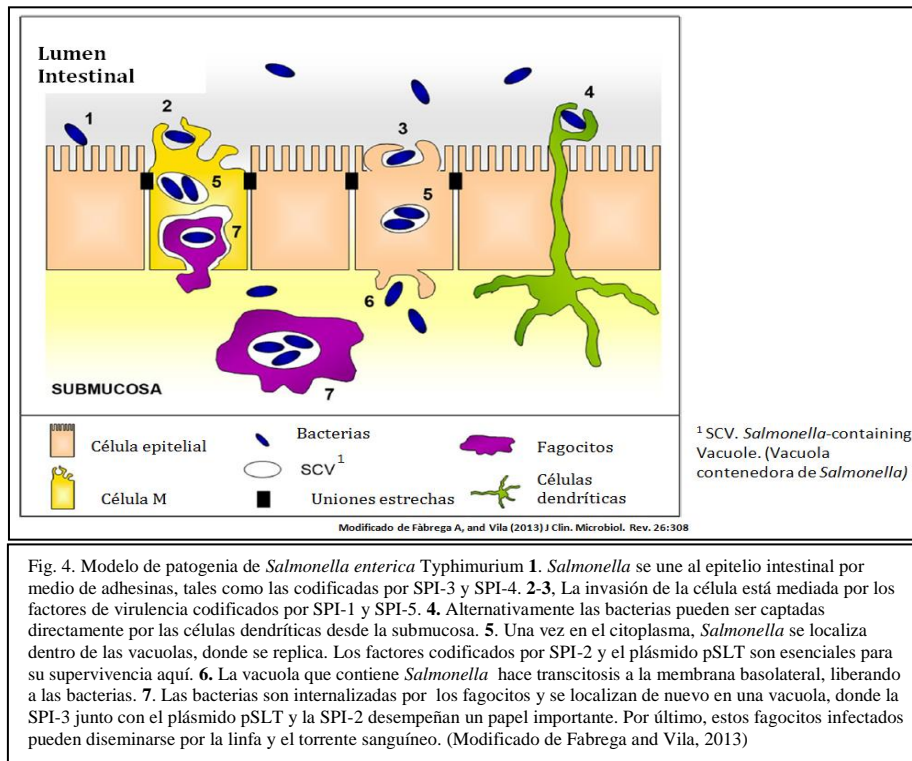
Finalmente, SPI-5 codifica factores implicados en la secreción de fluidos y en la reacción inflamatoria en la mucosa intestinal y también para la invasión, como es SopB (SigD), una proteína efectora secretada a través del aparato SPI-1. También tiene un bajo contenido en G+C y está insertado adyacente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

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. 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. Después de esto, *Salmonella* se ve asociada con células reticuloendoteliales y PMNs, 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. En la figura 4 se resumen las principales etapas.



4.2.1. Adhesión a las células epiteliales.

Es un prerequisite para que la infección tenga lugar. La interacción de la bacteria con las células epiteliales a través del mucus es mediada por pilis 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. Aparecen microfotografiadas en la figura 5. 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. 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*.

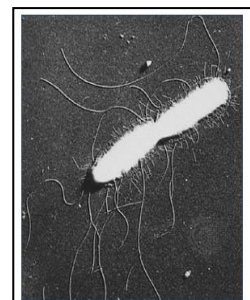


Fig 5. Imagen de *Salmonella typhi* donde se muestran los flagelos y las fimbrias (más cortas). Aumentado 7800 veces. (Encyclopedia Britannica)

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 (Fig. 3). 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*. 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. 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. 6). 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 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.

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,

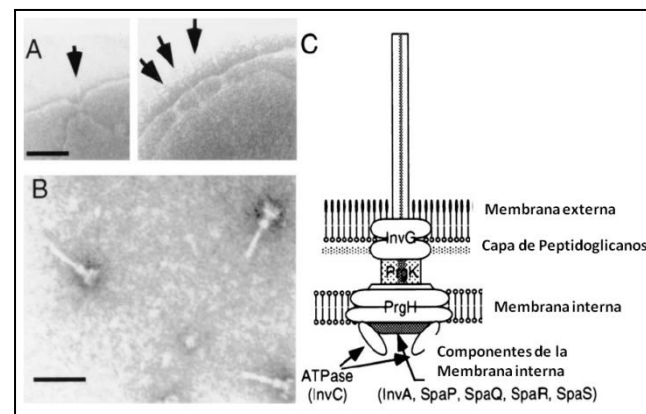


Fig. 6. "Complejo aguja" de *S. typhimurium* del sistema de secreción tipo III. (A) Micrografía electrónica de *S. typhimurium* mostrando este complejo en la envuelta bacteriana (señalado con flechas). (B) Micrografía electrónica de complejos aguja purificados. (C) representación esquemática del complejo aguja y sus componentes. La localización de algunos componentes es hipotética y más proteínas pueden formar parte del complejo. (Figura adaptada de Galan and Zhou (2000))

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 de 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 tal 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 formas 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 las proteín-quinasas activadas por mitógenos Jnk y p38.

De las proteínas efectoras que son inyectadas por el sistema T3SS-SPI1 (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. 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 (Kcat) 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 RhoGTPasas 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).

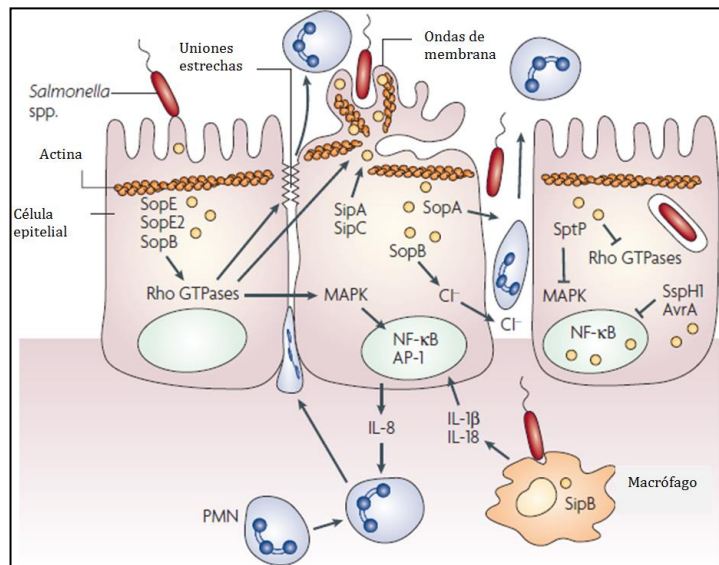


Fig 7. Cambios inducidos por SPI-1 en la célula huésped. En contacto con la célula epitelial, *Salmonella* arma el sistema de secreción tipo III codificado en la SPI-1(T3SS) y transloca efectores (esferas amarillas) en el citoplasma de las células eucariotas. Efectores como SopE, SopE2 y SopB activan a las Rho GTPasas del hospedador, resultando en un reordenamiento del citoesqueleto de actina formando esas ondas o “ruffles” de membrana, además de la inducción de la vía de las MAPK y la desestabilización de las uniones estrechas. Estos cambios en el citoesqueleto de actina, que son modulados por las proteínas de unión a actina SipA y SipC conducen a la captación de la bacteria. La señalización de MAPK activa a AP-1 y al nuclear factor-κB (NF-κB), el cuál activa la producción de quimiocinas pro-inflamatorias (IL-8) que atraen a los leucocitos polimorfonucleados (PMN). SipB induce la activación de la caspasa 1 en los macrófagos, con la liberación de IL-1β y IL-18, lo que conduce a un aumento en la respuesta inflamatoria. Además SopB estimula la secreción de Cl⁻ por la actividad de inositol fosfatasas. La desestabilización de las uniones estrechas permite la trans migración de PMNs desde la parte basolateral a la superficie apical. Sin embargo, la trans migración de PMNs también ocurre sin que se desorganicen las uniones estrechas, y se promueve por SopA. El citoesqueleto de actina es restaurado y se para la señalización de MAPK por la actividad enzimática de SptP. Esto también resulta en una modulación negativa de la respuesta inflamatoria, a la cual contribuyen SspH1 y AvrA, a través de la inhibición de NF-κB. (Modificado de 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 SPII-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.

La estimulación de Cdc42 por SopE, SopE2 y SopB también disparan las vías de las MAPK (“mitogen-activated protein kinase”) Erk, Jnk y p38, lo que conduce a la activación de los factores de transcripción AP-1 (“activator protein-1”) and NF-κB (“nuclear factor κB”) (Fig. 7). Estos factores transcripcionales dirigen entonces la producción de citoquinas pro-inflamatorias, tales como IL-8, que estimulan la trans migración de PMN y también son causa de la diarrea que acompaña a la infección por esta bacteria. Además, SopB también promueve 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.

SipB, otra proteína efectora inyectada a través del SPII-T3SS, también contribuye a la respuesta inflamatoria al aumentar la producción de citoquinas pro-inflamatorias IL-1β e IL-18 a través de su unión y activación de la caspasa-1.

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 proteínas

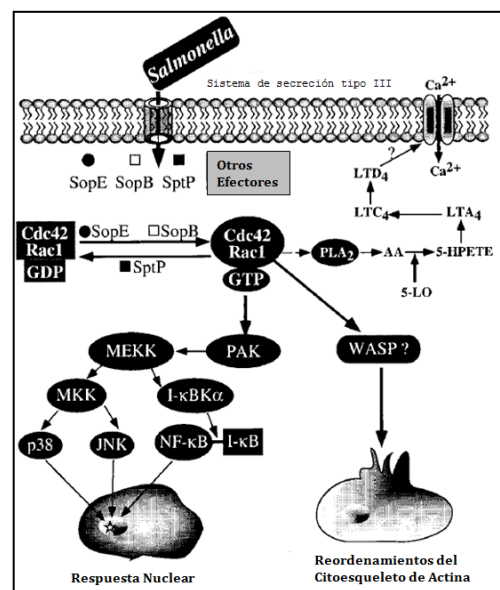


Fig. 8. Vías de transducción de señales estimuladas por *Salmonella* en la célula huésped durante la invasión mediada por proteínas efectoras inyectadas a través del Sistema de Secreción tipo III. Modificado de Galán, J.E. y Zhou, D. (2000).

quinasas activadas por mitógenos que conducen a inducir respuestas nucleares, que van a producir los síntomas de gastroenteritis que acompañan a la infección (Fig. 8).

Estudios de microscopía electrónica han puesto de manifiesto que poco después de la infección, la membrana de las células epiteliales

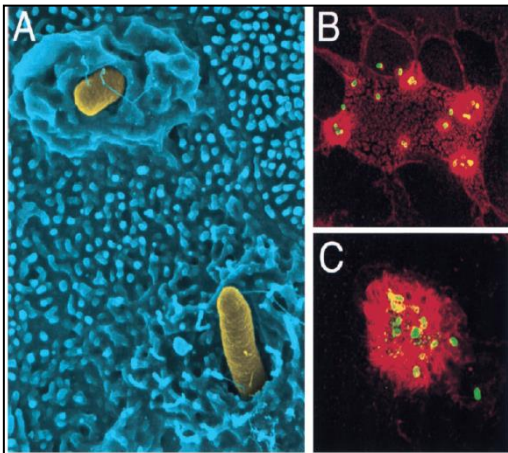


Fig 9. Interacción de *S. typhimurium* con las células epiteliales. A) Micrografía electrónica de barrido del epitelio intestinal infectado con *S. Typhimurium* (células Caco-2). (B y C) Reordenamientos en el citoesqueleto de actina en epitelio intestinal infectado con *S. Typhimurium*. Los filamentos de actina fueron marcados con rodamina faloidina (en rojo) y *S. Typhimurium* con un anticuerpo conjugado con FITC en verde. (Modificado de Galán, J.E. and Zhou, D. (2000)).

infectadas por *Salmonella* recupera su apariencia normal (Figura 9). 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. 10). 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.

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 es que, aunque ambas proteínas hayan sido inyectadas simultáneamente, actúen de una manera secuencial durante la interacción de *Salmonella* con su célula hospedadora.

Por otro lado, 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. 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-κB.

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

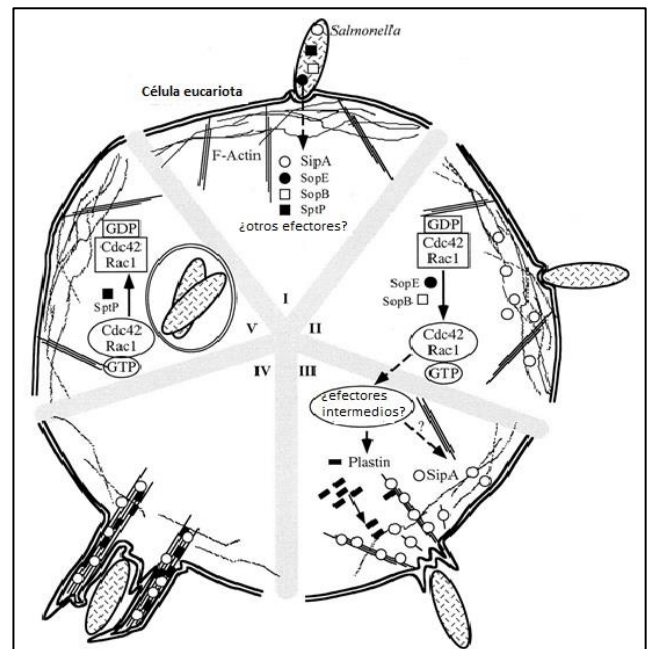


Fig. 10. Modelo que ilustra las etapas en la interacción de *S. Typhimurium* con la célula huésped (I-V) **I** El contacto con la célula huésped activa al sistema de secreción tipo III asociado a la invasión, resultando en la entrada de proteínas efectoras (por ejemplo SopE, SopB, SipA, y SptP). **II** El factor SopE y la inositol fosfatasa SopB promueven una activación de Cdc42 y Rac-1. **III** Estimulación de otras vías de señalización “corriente abajo”, y el reclutamiento de plasmina y otras moléculas que se asocian a ondas de membrana. **IV** Se inicia la reorganización de la actina. La proteína bacteriana efectora SipA ayuda en este proceso de polimerización de actina, de este modo estimula la actividad agrupadora de la plasmina, y se estabiliza la F-actina. Esta actividad tiene como consecuencia una extensión más localizada y pronunciada de las rugosidades de membrana hacia el exterior. **V** Subsecuentemente a la estimulación de Cdc-42 y Rac-1 por SopE y SopB, la proteína efectora SptP revierte la activación de estas proteínas G al estimular su actividad GTPasa intrínseca y de esta manera facilita la recuperación celular. (Modificado de Galán, J.E. and Zhou, D. (2000))

excesivo daño en el hospedador.

4.2.3. Multiplicación de Salmonella en el interior de la vacuola.

Aunque *Salmonella* es capaz de infectar y multiplicarse dentro de muchos tipos celulares, se piensa que van a ser los macrófagos las principales células en las que las bacterias se van a multiplicar. De hecho, cepas de *Salmonella* que son defectivas para replicarse en macrófagos resultan menos virulentas en modelos de infección en ratón, lo que ilustra la importancia que tiene para la bacteria la supervivencia y replicación en macrófagos.

La entrada de la bacteria en macrófagos puede realizarse por diversos procesos endocíticos, incluido el mediado por la macropinocitosis inducida por SPII T3SS. Una vez dentro de las células, *Salmonella* va a residir dentro de vacuolas tanto en células fagocíticas como no fagocíticas.

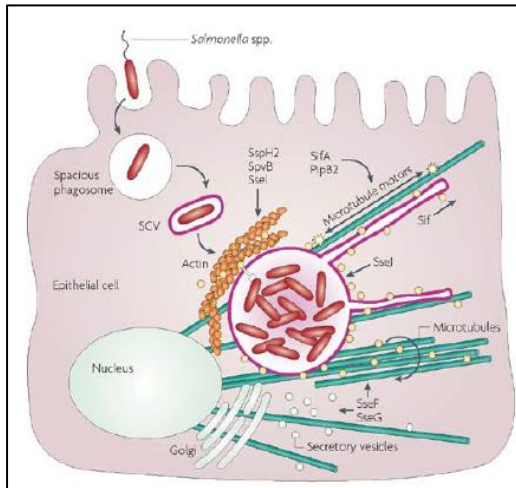


Fig. 11. Formación de la vacuola SCV e inducción del SPI2-T3SS en la célula hospedadora. Tras la internalización por macropinocitosis, *Salmonella* se encierra en un fagosoma espacioso formado por pliegues membranosos. Más tarde, el fagosoma se fusiona a lisosoma, se acidifica y encoje y así se adhiere en torno a la bacteria. Esta vacuola final se conoce como la vacuola que contiene a *Salmonella* (SCV), que también contiene la proteína asociada a membrana marcadora de endocitosis (LAMP1). La bacteria debe hacer uso de ciertas proteínas efectoras encargadas de la atracción de nutrientes y modificación del citoesqueleto, así como la protección frente a sustancias bactericidas producidas por la célula infectada (CAMPs y otros) y las condiciones desfavorables (pH en torno a 5, bajas concentraciones de iones metálicos, etc). Por ello, la isla de patogenicidad 2 de *Salmonella* (del sistema de secreción de tipo 3) (SPI2-T3SS) se induce en la vacuola y es la encargada de translocar proteínas efectoras a través de la membrana de la vacuola varias horas después de la fagocitosis. Los efectores SifA y PipB2 contribuyen a la formación de filamentos inducidos por *Salmonella* (Sif) a lo largo de los microtúbulos y regulan la acumulación de microtúbulos motores en los Sif y CSV. SseI es una deacilasa que se activa en la membrana del fagosoma. SseF y SseG causan acumulación de microtúbulos junto a la SCV y dirigen el tráfico de vesículas derivadas del Golgi hacia la SCV. La actina se acumula alrededor de la SCV de forma dependiente a la SPI2-T3SS, donde se piensa que SspH2, SspV y SseI están involucrados. Adaptada de Haraga et al. (2008).

El ambiente de esta vacuola fagosomal es ácido, con un pH en el rango de 5-5,5. Se trata de un ambiente con concentraciones limitantes de Mg²⁺, Ca²⁺ y Fe²⁺ en el rango de 1 mM. También contiene péptidos antimicrobianos y radicales de oxígeno y nitrógeno que pueden dañar la pared celular.

Una vez que *Salmonella* se encuentra en la vacuola, las moléculas de LPS presentes en su membrana van a ser reconocidas por el TLR-4 situado en el endosoma, que a su vez va a señalar al macrófago para que produzca citoquinas y otros factores, como son los péptidos catiónicos antimicrobianos (CAMPs, "Cationic antimicrobial peptides"). Los CAMPs constituyen un componente evolutivamente antiguo del sistema inmunitario innato, muy eficiente para matar un amplio rango de organismos tales como bacterias, hongos y virus con cubierta. Aunque variables en secuencia, los CAMPs suelen ser anfipáticos, con regiones de residuos catiónicos e hidrofóbicos.

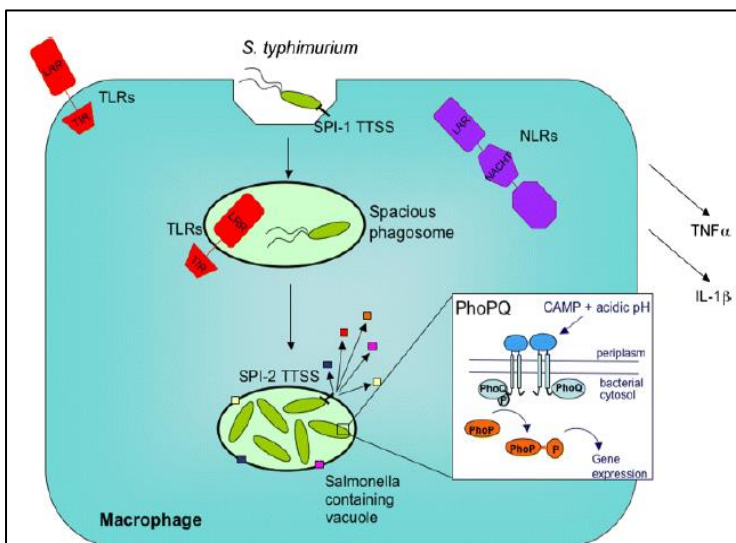


Fig. 12 Invasión por Salmonella de un macrófago. Tras la entrada mediada por SPI-1-T3SS, *Salmonella* se encuentra en un fagosoma espacioso. A medida que la infección progresa, el ambiente del fagosoma activa el sistema PhoPQ que, a su vez, activa genes de virulencia incluidos el sistema SPI2-T3SS, que está implicado en la remodelación de la vacuola para transformarla en un nicho replicativo. Al mismo tiempo, los receptores del sistema inmune innato del macrófago (TLR y NLR) reconocen ligandos en la bacteria y producen la secreción de señales proinflamatorias como IL1 β , TNF α , LRR (repeticiones ricas en leucina) y TIR (dominio del receptor Toll/IL1). Ciertos componentes bacterianos son reconocidos por estos receptores del macrófago, lo que conduce a la liberación de citoquinas y otros factores como CAMPs. Los mecanismos de defensa celular dirigen intermediarios reactivos de oxígeno o nitrógeno, restringen las concentraciones de iones metálicos y dirigen la vesícula hacia la vía endocítica de fusión a lisosomas, entre otros. La bacteria es capaz de contrarrestar estos procesos mediante la secreción de proteínas efectoras al citoplasma celular mediante el SPI2 T3SS.

Por su lado, en el ambiente fagosomal, la bacteria va a inducir la expresión y el ensamblaje del sistema de secreción tipo III, codificado en la SPI-2, cuya función es la de translocar alrededor de 20 proteínas efectoras a través de la membrana fagosomal al citoplasma de la célula

eucariótica. 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 (“Salmonella-containing vacuole”) al tiempo que ésta se expande. Asimismo, se ha demostrado que entre las funciones de SPI-2 está la de impedir la colocalización de la fagocito-oxidasa y de la óxido nítrico sintasa en la vacuola que contiene a *Salmonella*. Así, en su localización intracelular, queda protegida de los efectos dañinos de los intermedios reactivos de oxígeno y nitrógeno, y frente a la potente actividad microbicida del peroxinitrito, que se genera por la reacción de los intermedios reactivos de oxígeno y nitrógeno.

Además, la alteración de la vía endocítica producida por la bacteria va a evitar la fusión de lisosomas secundarios con la vacuola SCV. En esta etapa, dos proteínas efectoras, SigD y SsaB (SpiC), se han implicado en la alteración del tráfico vesicular, evitando la fusión de la vacuola SCV con los lisosomas. La proteína SsaB, que es un componente del aparato T3SS-2 también funciona como proteína efectora. Una vez liberada al citoplasma, SsaB inactiva a la proteína Hook3, un componente de la vía endocítica que facilita la interacción entre los microtúbulos y los orgánulos. Como consecuencia se produce una inhibición del tráfico de lisosomas hacia la vacuola SCV. SigD (SopB) también ha sido implicada en inhibir el tráfico vesicular a través de la alteración del metabolismo de fosfoinosítidos.

Durante la maduración la vacuola SCV migra a una posición perinuclear, en proximidad con el aparato de Golgi, lo que va a facilitar una mejor intercepción de vesículas de transporte (endocítico y exocítico) para así obtener nutrientes y componentes membranosos.

SPI2 T3SS también induce la formación de estructuras filamentosas de membrana denominadas SIFs (“Salmonella-induced filaments”) que parten de la SCV y se extienden por toda la célula . Aunque no está claro el mecanismo de formación, su función podría estar relacionada con un aumento de superficie de la vacuola para la captación de nutrientes desde el citoplasma. También se observa la condensación de actina alrededor de la SCV, proceso que también depende de la actividad del SPI2 T3SS. El ensamblaje de actina ayuda a estabilizar la membrana de la SCV. La importancia de esta modificación del citoesqueleto resulta evidente en 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.

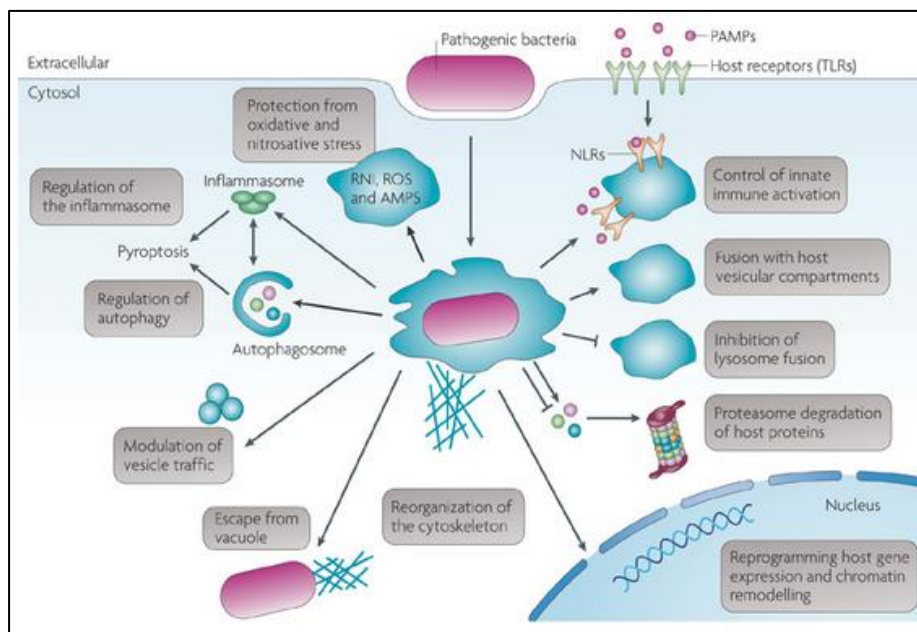


Fig. 13. Efectos producidos por *Salmonella* en la célula hospedadora. Tras la compartimentalización de la bacteria, ésta es capaz de controlar vías de señalización activadas por la célula huésped, interaccionar con la vía endocítica, escapar del fagosoma, inhibir la fusión a lisosomas (proceso en el que están implicadas las proteínas SigD y SsaB.), manipular el tráfico vesicular y el citoesqueleto (donde se ve implicada la proteína SigD (SopB)) y evitar la activación del inflammasoma. Diacovich, L and Gorvel JP. (2010).

4.2.4. Señalización de las células epiteliales.

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.

Así, el anclaje de *Salmonella* a las monocapas epiteliales es suficiente para inducir la liberación de IL-8 a través de la superficie basolateral de la célula; sustancia que actúa reclutando neutrófilos (PMN).

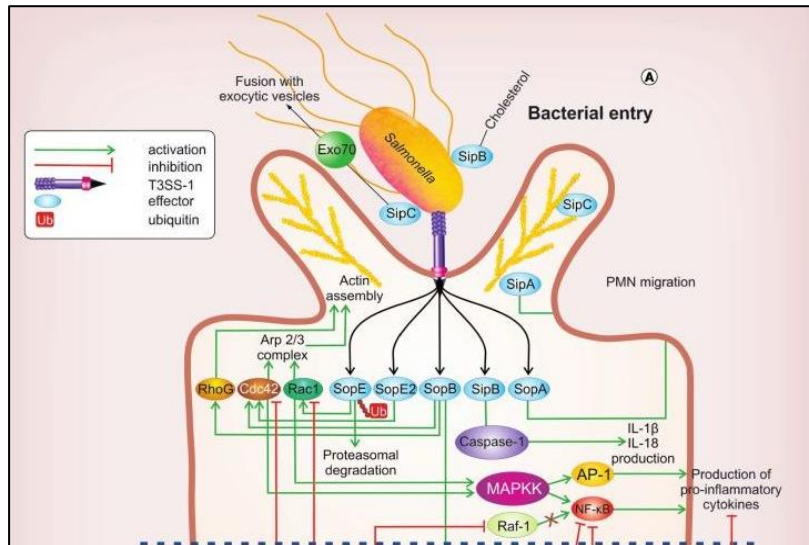


Fig. 14. Reclutamiento de neutrófilos por Salmonella. Tras el complejo mecanismo de entrada a las células, Salmonella en último término consigue secretar citocinas proinflamatorias como IL-8. Esta molécula promueve el reclutamiento de neutrófilos (células polimorfo nucleares (PMN) del sistema inmunitario) a la zona de infección. También en respuesta al patógeno se produce un incremento de la producción de sustancias quimioatrayentes como ICAM-1 para el reclutamiento de neutrófilos. Fuente: Heijden y Finlay (2012).

También se produce cierta migración de neutrófilos a través del epitelio inducida por un quimioatrayente epitelial inducido por el patógeno (PEEC, "pathogen-elicited epithelial chemoattractant") que es liberado apicalmente. De forma destacable, se produce un incremento en la expresión de ICAM-1 ("intercellular adhesion molecule") sobre la superficie apical de los enterocitos mediante así la unión de los neutrófilos a las células epiteliales e impidiendo su liberación al lumen.

Salmonella tiene la capacidad de inducir muerte celular en las células hospedadoras, especialmente en macrófagos y células epiteliales. Esta muerte celular está mediada por la proteína SipB, que es una proteína efectora secretada por el sistema de secreción tipo III codificado en SPI-1.

La muerte celular inducida por *S. Typhimurium* tiene características intermedias en la apoptosis y la necrosis, y algunos autores la denominan piroptosis. Esta clase de muerte celular es inflamatoria y depende de la activación de la caspasa-1, una cistein-aspartato proteasa que, además de inducir la muerte celular, es responsable del procesamiento de los precursores de IL-1 β e IL-18 a sus formas activas. 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 ("knockout") 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 ayuda a expandir la infección.

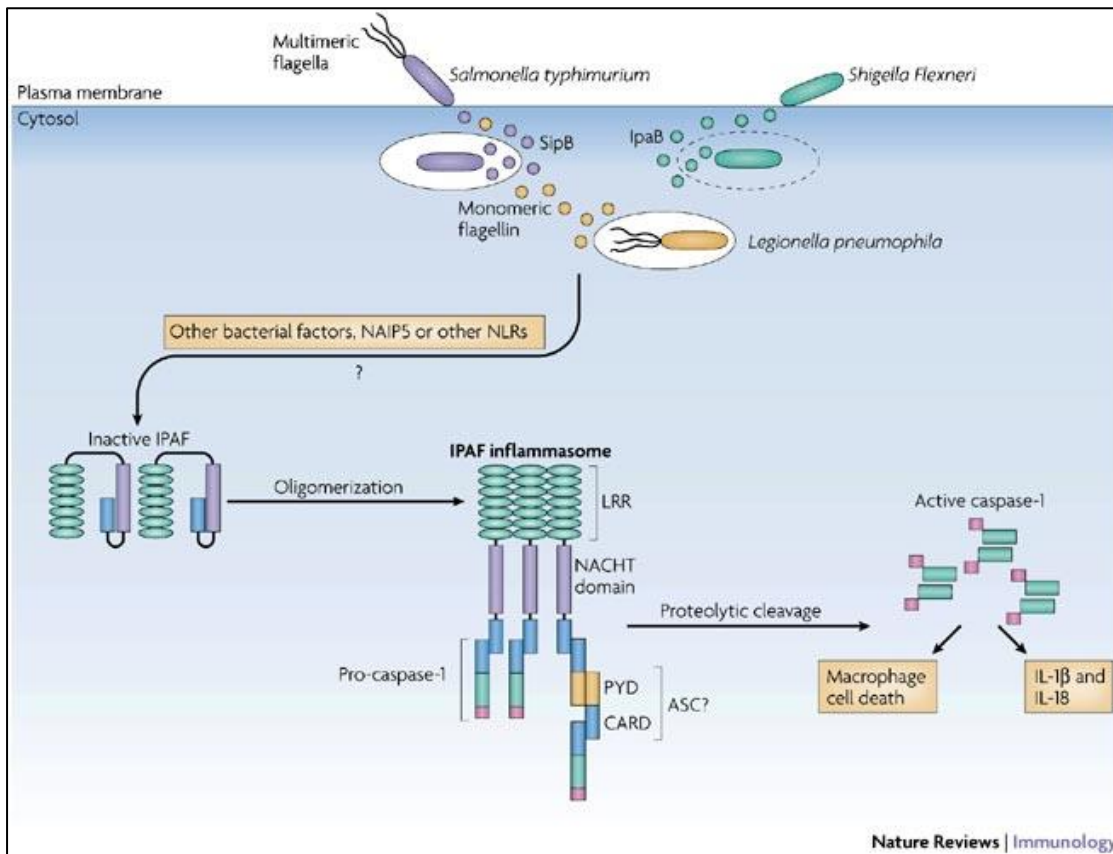


Fig. 15. Inducción de la apoptosis por Salmonella. La figura representa el mecanismo de regulación por el cual Salmonella consigue inducir apoptosis en las células infectadas (proceso mediado por SipB, secretada por el sistema de secreción tipo III de la SPI-1). En este proceso, se consigue la activación de la caspasa 1, que induce la liberación de IL-1 e IL-18 así como la muerte del macrófago. La detección intracelular de Salmonella parece estar mediado por la detección de flagelina. Por otro lado, la proteína SipB desencadena la cascada de señalización que finalmente activan la caspasa 1. Esta actividad tiene como finalidad la inducción de una respuesta inflamatoria que reclute nuevas células del sistema inmune, facilitando así la expansión de la infección. Otras bacterias consiguen el mismo fin (activación de caspasa 1) mediante otras proteínas efectoras. Fuente: Mariathasan y Monack (2007).

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 patógenesis. Se ha descrito un número grande de proteínas reguladoras que establecen una compleja red. En la figura se muestra la red de regulación que opera sobre la isla de patogenicidad 1 (SPI-1). A continuación se describen los principales factores de regulación.

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. 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.

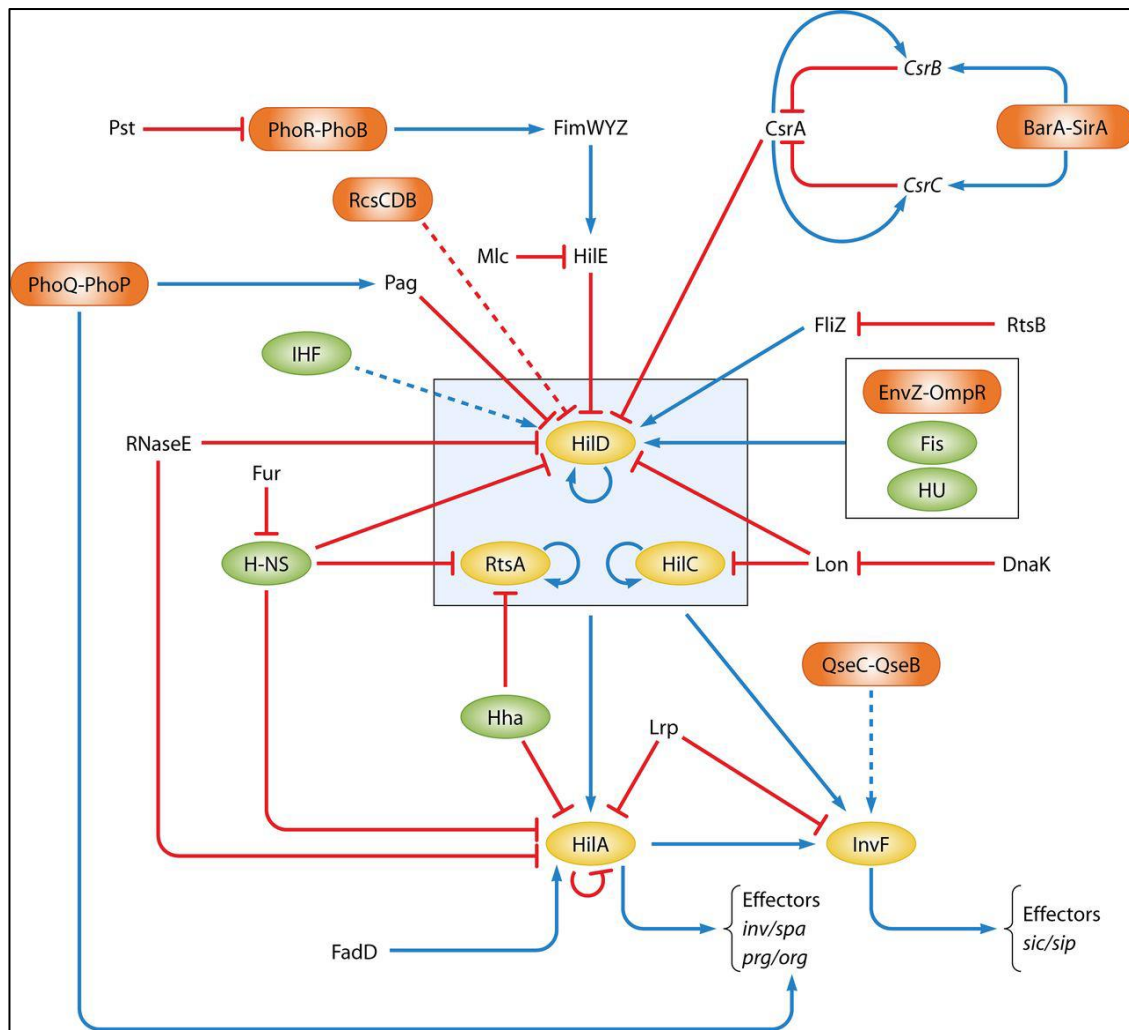


Fig. 16.. Red de regulación de SPI-1. Las flechas azules indican activación o autoactivación, mientras que las rojas representan represión o autorepresión. Las líneas discontinuas sugieren una diana regulatoria putativa propuesta en este modelo. Los reguladores (en amarillo) son aquellos codificados en SPI-1 (salvo RtsA) que juegan un papel importante en la regulación del fenotipo invasor. La activación de IHF parece estar mediada por HiiD, Fis y HU según la información que aparece en el texto. EL efecto represor de PhoQ-PhoP en los genes prg parece que ocurre con la represión de HiiA gracias a la represión transcripcional de HiiD, ya que no se ha observado ningún efecto en estos genes de la SPI-1. De acuerdo con este modelo, todos los 2CRSs ejercen su efecto mediante HiiD a excepción de QseC-QseB (que hasta la fecha solo se ha visto que afecte a InvF). Por esta razón se ha empleado una línea discontinua a pesar de que existe la posibilidad de que también actúe a nivel de HiiD. Más aún, la mayoría de las señales reguladoras están integradas en el nivel de HiiD (en su mayoría por regulación postranscripcional), que gobierna la jerarquía de los reguladores codificados en SPI-1. Fuente: Fabrega y Vila (2013)

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, y el regulador de respuesta PhoP, que es citosólico. 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.

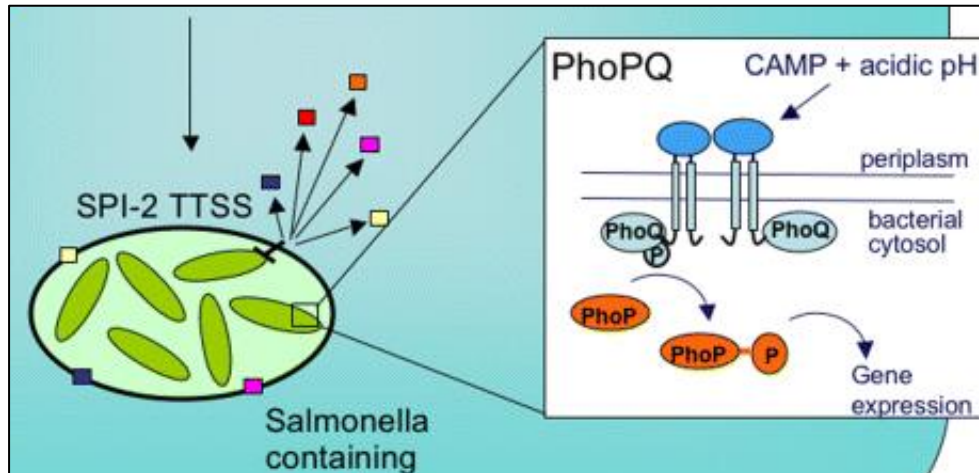


Fig.. 17. Activación de la maquinaria de expresión génica dependiente de señales ambientales, una vez se ha producido la invasión celular. El sistema de regulación basado en PhoPQ permite regular (activar o reprimir) la expresión alrededor de 200 genes, entre los que pueden destacarse genes de virulencia como el sistema de secreción tipo III de la isla de patogenicidad 2 (SPI-2) o los genes que codifican el flagelo o el sistema de secreción tipo III de la isla de patogenicidad 1 (SPI-1). En el primer caso, se produce la activación de la transcripción de los genes que codifican el sistema de secreción tipo III de la SPI-2 para generar un nicho adecuado para la supervivencia de la bacteria en el interior de la vacuola. Por el contrario, los genes que codifican flagelina o el sistema de secreción tipo III de la SPI-1 son reprimidos, puesto que solo son necesarios en la invasión de las células.

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 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 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.

Sin embargo, aunque las DCs infectadas con *Salmonella* son capaces de llegar a los nódulos linfoides, 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 piensa que *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; proteína ácida codificada en la SPI-2 que es introducida en el citoplasma de la célula hospedadora a través del sistema de secreción tipo III también codificado en al SPI-2. De esta manera se interfiere con la presentación de antígenos por las DCs y no hay activación de respuestas de células T específicas, lo que va a favorecer la expansión sistémica de esta bacteria.

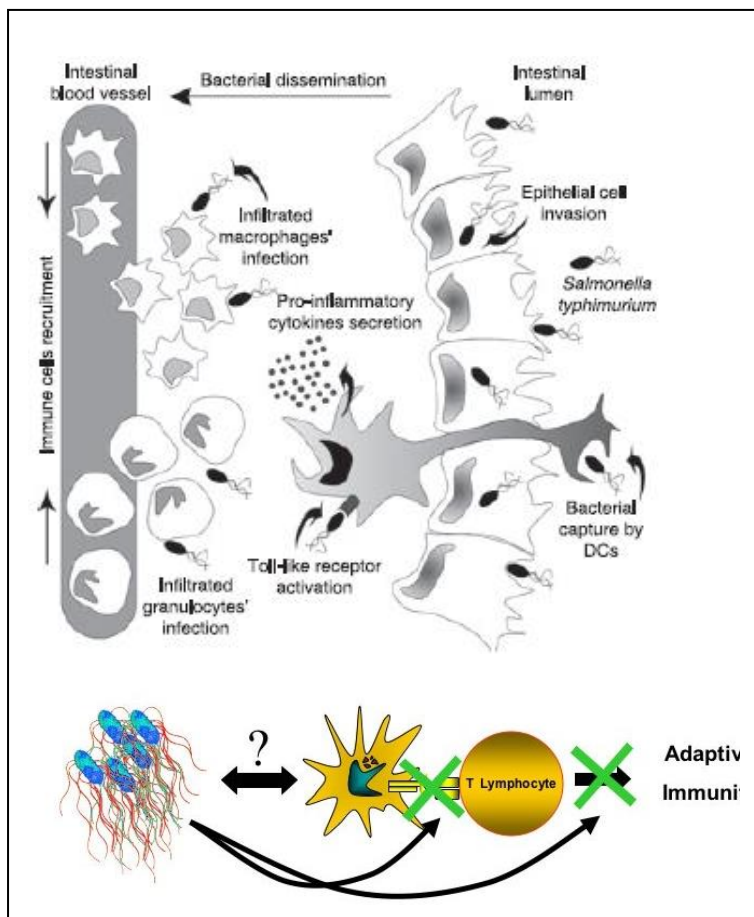


Fig. 18. Posible mecanismo de diseminación sistémica de *Salmonella* mediante la invasión de células dendríticas. Tras el contacto con *Salmonella*, las DCs experimentan procesos de maduración (facilitados a su vez por componentes bacterianos) y migran desde tejidos periféricos hasta tejidos linfoides más profundos, lo que permite la diseminación de la bacteria por el organismo y permite escapar de las zonas de inflamación. Sin embargo, una vez en los nódulos linfoides, las células DCs no son capaces de generar una respuesta inmunitaria eficaz frente a la bacteria, probablemente porque la bacteria interfiere en la interacción célula dendrítica-linfocito T (evitando la presentación de antígenos por las DCs a linfocitos) y así consigue evitar la respuesta adaptativa. Fuente: Mechanisms used by virulent *Salmonella* to impair dendritic cell function and evade adaptive immunity, Bueno et al. (2012)

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, es decir, el mismo gen en dos especies distintas, 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 (Figura 19). La primera fase consistió en la adquisición de la isla de patogenicidad I 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.

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* (Figura 19). 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.

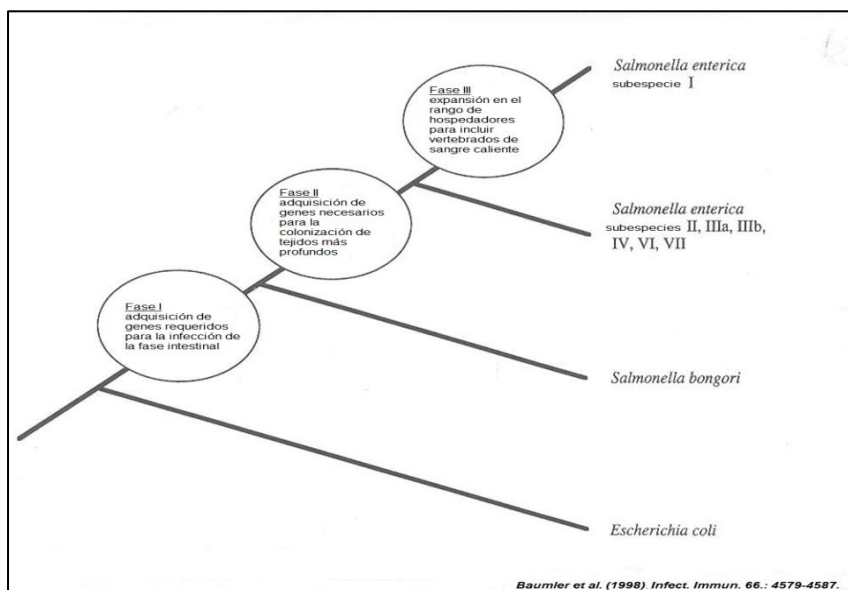


Fig 19. Modelo para la evolución de la virulencia en el género *Salmonella*. Las tres fases en las cuales la virulencia evolucionó en el género *Salmonella* desde su divergencia desde el linaje de *E. coli*. El árbol filogenético no está a escala. Fuente: Bäumlér et al (1998).

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.

Experimentos realizados en ratones revelaron que las mutaciones en SPI1 atenuan 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 atenuan 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 SPI2 tiene un tamaño de 40-kb y por análisis de secuencia se ha estimado que existen 42 fases de lectura abierta (Figura 19). 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.

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.

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* (Figura 20). Así, SPI2 representa un ejemplo de un sistema de secreción tipo III empleado para modificar el destino de un patógeno intracelular.

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* (Figura 20).

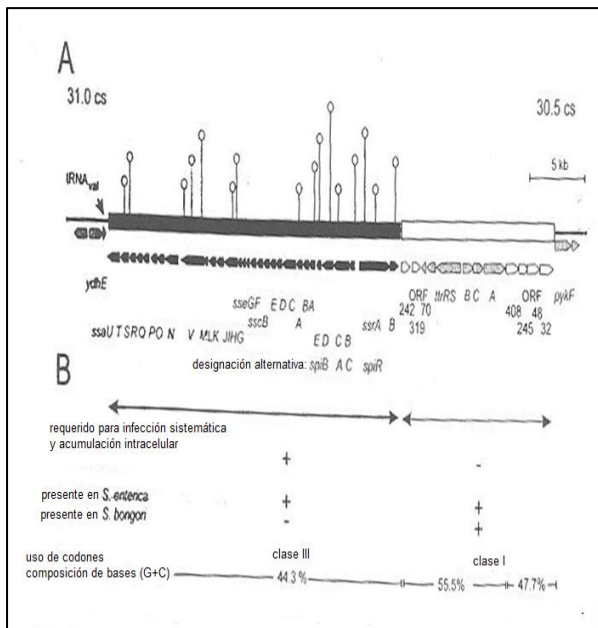


Fig 20. Organización genética de SPI2. A. El orden y nomenclatura de los genes de SPI2 están indicados en la imagen. Los genes que codifican los elementos estructurales y regulatorios de TTSS están representados con flechas oscuras, mientras que los genes relacionados con la tetrionato reductasa y con funciones desconocidas se encuentran indicados mediante flechas sobreadas y flechas abiertas, respectivamente. B. La disección molecular y funcional de SPI2 indicaba que el segmento de 25 kb es requerido para infecciones sistémicas y puede representar una adquisición independiente. Los dos segmentos de SPI2 tienen distintas características (uso de codones y composición de bases). Inserciones de mTn5 en los genes de SPI2 han sido identificados por STM (Signature Tagged Mutagenesis), y están marcados por "alfileres". Fuente: Bäumlér et al (1998).

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

1. Los nódulos linfoides asociados al tubo digestivo de mamíferos y pájaros 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 pájaros 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 isotópico 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 lagartos, 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. 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. 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* va a contribuir a la especificidad de hospedador y a la

severidad de la enfermedad que son característicos de los diferentes serotipos (Figura 20).

Otras diferencias entre los diferentes serotipos de *Salmonella* parecen radicar en los llamados plásmidos de virulencia. Sin embargo, hasta el momento no se conocen 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 patógenesis en *Salmonella*.

La emergencia de nuevos patógenos y la explotación de nuevos nichos patogénicos viene dada por la adquisición de factores de virulencia, que en bacterias frecuentemente resulta de procesos de transferencia horizontal de material genético. Pero, a veces, la función de estos factores de virulencia recién adquiridos puede ser impedida por la expresión de otros genes presentes en la bacteria. En estos casos, ciertos genes deben ser inactivados o delecionados para que el fenotipo patogénico se manifieste. A estos genes se les conoce como genes antivirulencia (AVGs, “antivirulence genes”). Así, un AVG se puede definir como un gen cuya expresión en un patógeno es incompatible con la virulencia del patógeno.

Así, 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 permanecen 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 resulte perjudicial para 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 AVGs, van a ser inactivados, delecionados o regulados de forma diferencial.

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 (Figura 21).

Cuando de forma experimental se introduce el gen *lacI* funcional en *Salmonella* (carente del operon 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*.

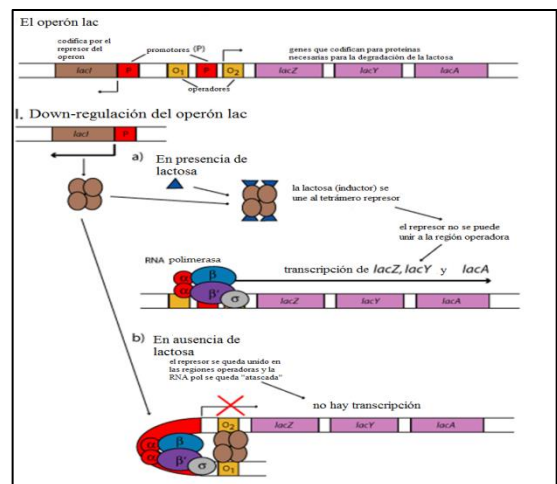


Fig. 21. Explicación general sobre el comportamiento del operón Lac en presencia y ausencia de Lactosa. En el caso de *Salmonella bongori* sólo se encuentran los genes *lacI* y *lacZ*, siendo el primero un pseudogen, mientras que en *Salmonella enterica* no se encuentra ninguno de los cuatro. Esto es debido a que varios de los genes de la SPI2 presentan una expresión muy baja en las bacterias que expresan *lacI*, por lo que las bacterias han evolucionado para eliminar el operón lac, a pesar de las condiciones ricas en lactosa del intestino humano. Fuente: http://xray.bmc.uu.se/Courses/Bke2/Exercises/Exercise_answers/GEA_transcription.html

7. Referencias.

- **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.
- **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.
- **Bueno, S.M, Riquelme S, Riedel, C.A and Kalergis, A.M.** (2012). Mechanisms used by virulent *Salmonella* to impair dendritic cell function and evade adaptive immunity. *Immunology* 137_28-36
- **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.
- **Diacovich L. and Jean-Pierre Gorvel.** (2010) Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. *Nature Reviews Microbiology* 8, 117-128.
- **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.
- **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.
- **Galan, 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.
- **Galanis E, Lo Fo Wong DMA, Patrick M, Binsztejn N, Cieslik A, Chalermchaikit T, Aidara-Kane A, Ellis A, Angulo F.J, Wegener H.C.** (2006) Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000–2002. *Emerg. Infect. Dis.* 12(3): 381-388.
- **Groisman, E.A., Fields, P.I. and Heffron, F.** (1990) Molecular biology of *Salmonella* pathogenesis. En: *Molecular Basis of Bacterial Pathogenesis* (B.H. Iglewski y V.L. Clark, eds). pp. 251-272. Academic Press, Inc., California.
- **Haraga, A., Ohlson, M.B. and Miller, S.I.** (2008) *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 53-66.
- **Heijden, J. and Brett Finlay.** (2012) Type III Effector-Mediated Processes in *Salmonella* Infection.. *Future Microbiol.* 2012;7(6):685-703.
- **Hensel, M.** (2000) *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol. Microbiol.* 36: 1015-1023.
- **Kingsley, R.A. and Baumber, A.J.** (2002) Pathogenicity islands and host adaptation of *Salmonella* serovars. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 264: 67-87.
- **Lucas, R.L. and Lee, C.A.** (2000) Unravelling the mysteries of virulence gene regulation in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 36: 1024-1033.
- **Mariathasan, S. and Monack, D.M.** (2007). Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology* 7, 31-40 .
- **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.
- **Wallis, T.S. and Galyov, E.E.** (2000) Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol. Microbiol.* 36: 997-1005.
- **Página web:** <http://www.bio.puc.cl/labs/kalergis/research/006.html>