

# Revista Latinoamericana de Microbiología

Volumen 47  
Volume 47

Número 1-2  
Number 1-2

Enero-Junio 2005  
January-June 2005

*Artículo:*

## Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp

Derechos reservados, Copyright © 2005:  
Asociación Mexicana de Microbiología, AC

### Otras secciones de este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

### *Others sections in this web site:*

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



**edigraphic.com**

# Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp

Inda Marcela Figueroa Ochoa,\* Antonio Verdugo Rodríguez\*

**RESUMEN.** *Salmonella* es un bacilo Gram negativo que se comporta como patógeno intracelular facultativo. Su hábitat es el aparato gastrointestinal de los animales y el hombre, nunca como microbiota normal. Se encuentra asociada a problemas gastrointestinales, septicémicos y aborto gracias a su capacidad de invasión celular y sobrevivencia intrafagocítica. Actualmente se sabe que *Salmonella* cuenta con cinco islas de patogenicidad. Varios genes involucrados en la invasión, apoptosis de macrófagos y activación de cascadas de fosforilación dependientes de MAP cinasas se encuentran en el centisoma 63, formando la isla de patogenicidad 1 (SPI-1). Los genes localizados en las islas SPI-2 y SPI-3 regulan la supervivencia y replicación bacteriana en los compartimientos intracelulares de fagocitos y células epiteliales. La isla SPI-4 codifica un supuesto sistema de secreción tipo I y se cree que participa en la adaptación en ambientes intracelulares. Finalmente la isla SPI-5 codifica para factores involucrados en la secreción fluida y reacción inflamatoria en la mucosa intestinal. Debido a una regulación coordinada y precisa de los genes de virulencia *Salmonella* logra adaptarse a cambios ambientales que se le presentan durante el proceso infeccioso.

**Palabras clave:** *Salmonella*, enteritis, invasión, islas de patogenicidad, sistema de secreción tipo III, supervivencia intrafagocítica.

## INTRODUCCIÓN

Para el desarrollo de una enfermedad bacteriana es necesaria la localización de la bacteria en un ambiente adecuado para su establecimiento, replicación y expresión de sus factores de virulencia. Durante el proceso infeccioso se presenta una interacción entre hospedero-microorganismo, la cual cada día se comprende mejor, debido a los avances en el estudio sobre patogénesis molecular, al desarrollar técnicas como la PCR y la secuenciación del ADN entre muchas otras. Dentro de los pasos que se presentan en el proceso infeccioso se pueden mencionar: adhesión, invasión, replicación, resistencia a los mecanismos de defensa y daño al hospedero. La bacteria experimenta severos cambios ambientales cuando entra al hospedero por vía oral

**ABSTRACT.** *Salmonella* is a Gram negative bacillus that behaves like a facultative intracellular pathogen. Its environment is the human and animal gastrointestinal tracts, it is never found like a normal microbiota. It is associated with gastrointestinal problems, septicemic disease and abortion, due to its cellular invasion capacity and its intraphagocytic survival. Nowadays, it is known that *Salmonella* contains five pathogenicity islands. Several genes involved in the cellular invasion of nonphagocytic cells such as epithelial cells, apoptosis of macrophages, activation of routes of MAP kinases and transcription factors are located in centisome 63, constituting the pathogenicity island 1 (SPI-1). The SPI-2 and SPI-3 islands control the intracellular survival and replication. The SPI-4 island encodes a putative type I secretion system and it is believed that it participates in the intracellular survival. Finally, the SPI-5 island encodes for factors involved in the fluid secretion and inflammatory reaction in the intestinal mucosa. Due to a coordinated and precise regulation of the *Salmonella* genes, it allows for adaptation to environmental changes that occur during an inflammatory process.

**Key words:** *Salmonella*, enteritis, invasion, pathogenicity islands, type III secretion system, intracellular survival.

como por ejemplo: pH ácido, aumento de temperatura, baja tensión de oxígeno y alta osmolaridad y responde a estos cambios modulando la expresión de sus genes.

*Salmonella* es un bacilo Gram negativo que se comporta como patógeno intracelular facultativo, se divide en dos especies *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, tomando en cuenta sus características bioquímicas generales. Esta última se subdivide en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizoneae*, *indica* y *houtenae*; las salmonelas de mayor importancia médica pertenecen a las subespecies *enterica* y *arizonae* y son consideradas serovars. Por lo que la nomenclatura que se está manejando actualmente es *Salmonella enterica* serovar Typhi, *S. enterica* serovar Paratyphi, *S. enterica* serovar Typhimurium.<sup>17,94,97,98</sup>

Según el esquema clásico de Kauffmann-White basado en antígenos somáticos, flagelares y ocasionalmente capsular (Vi), las salmonelas se clasifican en más de 2,500 serotipos, que pueden ser móviles o inmóviles. Hay situaciones epidemiológicas en las que es preciso afinar aún más la diferenciación dentro del serotipo correspondiente, para tal fin se utiliza la fagotipificación, sobre todo para las cepas causantes de epidemias en el hombre.<sup>17,113</sup>

Uno de los patógenos entéricos más frecuentes tanto en países desarrollados como subdesarrollados es *Salmonella*

\* Departamento de Microbiología e Inmunología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.

spp, la cual dependiendo de su especie, tamaño del inóculo, factores de virulencia expresados por la cepa, hospedero involucrado, estado inmunológico del paciente e intervención médica puede ocasionar desde una infección gastrointestinal media a severa hasta una infección sistémica que compromete la vida del paciente. La salmonelosis es una infección de importancia tanto en salud pública como en salud animal debido al impacto económico que ocasiona; es una enfermedad aguda, de distribución mundial, transmitida por los alimentos. Se estima que se presentan más de 16 millones de casos de fiebre tifoidea por año con aproximadamente 6,000,000 casos fatales y 1,300 millones de casos de gastroenteritis con una mortalidad que alcanza los 3 millones.<sup>64,77,98</sup> En México en 1998 se notificaron 215,155 casos de salmonelosis siendo los estados más afectados Tabasco, Coahuila, Chiapas y Quintana Roo.<sup>23,61</sup> *Salmonella* es el género bacteriano que ocasiona mayores pérdidas a la industria avícola, así como problemas de salud pública para el consumidor.<sup>56,116,134</sup>

### MECANISMOS DE ADHERENCIA

La supervivencia de un microorganismo en un nicho determinado depende de su habilidad para adherirse, las adhesinas de la bacteria tienen una estructura que les permite reconocer moléculas presentes en las células del hospedero llamadas receptores, con una estereoquímica específica. Esta unión determina los hospederos y el or-

ganotropismo de las bacterias; además, las adhesinas tienen la capacidad de activar a los linfocitos B y neutrófilos, lo que resulta en una variedad de respuestas biológicas incluyendo proliferación celular y secreción de citocinas.<sup>27,74</sup>

En las bacterias, se puede encontrar una amplia variedad de adhesinas, las cuales se dividen en dos grandes grupos: adhesinas fimbriales y adhesinas afimbriales, como la hemaglutinina filamentosa de *Bordetella pertussis* y el antígeno pH6 de *Yersinia pestis*, AfaD, AfaE en *E. coli* y proteína M de *Streptococcus*. En general, las adhesinas de bacterias Gram negativas son: fimbria, fibrilla, flagelo, lipopolisacárido (LPS) y cápsula.

La presencia de cápsula y flagelo en *Salmonella* depende de la especie en cuestión, solamente *S. enterica* serovar Typhi, *S. enterica* serovar Paratyphi C y *S. enterica* serovar Dublin presentan cápsula y todas las salmonelas se consideran móviles a excepción de *S. enterica* serovar Gallinarum. Estudios recientes muestran que *S. enterica* serovar Pullorum tiene motilidad en agar semisólido o en agar Hektoen incluso en estudios de microscopía electrónica se ha observado un flagelo pequeño y deformado.<sup>73</sup>

Es común el aislamiento de una bacteria que expresa múltiples tipos de fimbria, *Salmonella* expresa una amplia variedad de fimbrias con diferente especificidad de unión (*Tabla 1*).<sup>92,124,129</sup>

Después de la entrada al hospedero, un patógeno bacteriano puede adherirse tanto directamente a la superficie de la

**Tabla 1.** Fimbrias que se han reportado en *Salmonella*.

Fimbria	Serovares	Dimensión	Adhesina	Subunidad mayor	Masa molecular (kDa)	Receptor
Tipo 1 (Sef21)	Varios	8 nm	FimH	Fim	21	Manosa, fibronectina, laminina
Tipo 2	<i>S. gallinarum</i> <sup>d</sup> <i>S. pullorum</i> <sup>e</sup>	8 nm	Ausente			
Tipo 3	<i>S. typhimurium</i> y otras?			MrkD-like	?	Colágeno tipo V
SEF17	Varios	4 nm	AgfA <sup>a</sup>		17	fibronectina
SEF14	Grupo D y otras?	Delgado	SefA	SEF	14	?
SEF18	Todos	2 nm	SefD	SEF	18	?
Pef <sup>b</sup> adherencia a enterocitos	<i>S. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>		PefA		15	?
LPF <sup>c</sup> Adherencia a células M	<i>S. typhimurium</i> <i>S. gallinarum</i> <sup>d</sup>		LpfE			Manosa

BFP (bundle-forming pilus) no ha podido ser confirmado *in vivo*

<sup>a</sup>AgfA (thin aggregative fimbria)

<sup>b</sup>Pef (fimbria encoded plasmid) adherencia a enterocitos

<sup>c</sup>LPF (long polar fimbria)

<sup>d</sup>*Salmonella enterica* serovar Gallinarum

<sup>e</sup>*Salmonella enterica* serovar Pullorum

célula hospedera o a la matriz extracelular, cuando el tejido está dañado la matriz extracelular subyacente es expuesta, SEF17 se encarga de mediar la adherencia a una gran variedad de matrices extracelulares y proteínas séricas, incluyendo fibronectina, laminina y plasminógeno.<sup>123</sup>

Se han descrito diferentes operones en cada una de las variedades de *S. enterica*, cada uno de ellos participa en la adhesión a diferentes tipos celulares. Los genes de cada operón se expresan cuando en el hospedero las condiciones físico-químicas son las adecuadas, como la temperatura, pH, osmolaridad y disponibilidad de nutrientes.<sup>26,89,129</sup> El operón *lpfAB-CDE* se encuentra localizado en el centisoma 80 de *S. enterica* serovar Typhimurium y está flanqueado por secuencias similares a las descritas en *E. coli* K12 y O157:H7, sugiriendo que dicho operón puede haber sido adquirido por transferencia horizontal durante la evolución.<sup>7</sup>

La interacción de un patógeno con una célula hospedera usualmente provoca la activación de caminos de señalización de la célula hospedera, ya sea de manera directa por componentes bacterianos o por estimulación de factores activadores del hospedero, como las citocinas inflamatorias. Tales activaciones pueden alterar la superficie de la célula hospedera, proveyendo así al patógeno con receptores de adhesinas alternos.

Esta idea fundamental ha llevado a una gran cantidad de investigaciones para comprender cómo los patógenos bacterianos se adhieren a las células hospederas. Consecuentemente hemos aprendido en gran parte sobre la biogénesis de las adhesinas, su regulación y en una menor proporción la identidad de los receptores. El receptor del hospedero que una adhesina reconoce, determina la especificidad del tejido por esa adhesina y la colonización o persistencia bacteriana.

## MECANISMOS DE INVASIÓN

Después de la ingestión de agua y alimento contaminado, *Salmonella* inicia su ciclo de infección invadiendo al hospedero a través de tejido linfoide, incluyendo las placas de Peyer y tonsillas cecales en las aves. Se adhiere apicalmente a las células epiteliales del íleon y a las células M que debido a la ausencia del borde de cepillo así como de glicocalix, representan una puerta de entrada ideal para las enterobacterias.<sup>46,75,76,83,121,146</sup>

Muchos microorganismos patógenos son capaces de entrar y sobrevivir dentro de las células eucarióticas. *Salmonella* dirige su arribo a células hospederas que no son normalmente fagocíticas como la superficie de la capa mucosa de células epiteliales. Presumiblemente, esta técnica de invasión asegura un nicho celular protegido para que el microbio se replique o persista.

*Salmonella* invade las células del hospedero por un mecanismo conocido como disparo (*trigger*). La bacteria en-

vía señales a las células epiteliales que inducen rearreglos del citoesqueleto dando lugar a la formación de ondulado (*ruffling*) en su superficie, como respuesta al contacto. Se reconocen varias proteínas efectoras de la SPI-1, involucradas en los rearreglos del citoesqueleto: SipA, SopE, SopE2 y SopB.<sup>34,40,55</sup>

SipA es una proteína de unión a actina, que inhibe la despolimerización de F-actina y activa T-plasmina, su chaperona es SicA (SipE en *S. enterica* serovar Typhi).<sup>42,147</sup>

SopE se comporta como GEF (guanine exchange factor) en las proteínas RhoGTPasas: CDC42 y Rac induciendo *ruffling* de la membrana, que permite la internación de *Salmonella* además estimula MAP cinasas (Mitogen-activated protein), Erk (quinasa reguladora por señales extracelulares), JNK (quinasa terminal) y p38.<sup>38,65</sup> Es codificada por un fago temperado defectuoso de la familia P2, localizado en el centisoma 60 del cromosoma de *Salmonella*; análisis de la secuencia del ADN aledañas a *sopE*, revelaron marcos abiertos de lectura (ORF) con secuencias significativamente similares a la cola de fagos y recombinasas sitio específico.<sup>66,102</sup>

La proteína SopE2 muestra un 69% de homología con la secuencia de SopE, activa a CDC42, la cual actúa con la familia de proteínas del síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) para activar al complejo Arp2/3, compuesto de 7 subunidades, incluyendo dos proteínas relacionadas con actina y la proteína p41-Arc. Este complejo inicia la polimerización de actina y ramifica filamentos de actina.<sup>4,102,126</sup> El gen responsable de codificar dicha proteína se encuentra localizado en el centisoma 40-42. SopB (*Salmonella outer protein*), como se conoce para *S. enterica* serovar Dublin, o SigD (*Salmonella* invasión genes) para *S. enterica* serovar Typhimurium, por su actividad de inositol fosfato fosfatasa, también reorganiza el citoesqueleto de actina.

La proteína SptP (*Salmonella* protein tyrosin phosphatase) es una tirosin fosfatasa, que independientemente de esta actividad, se comporta como GAP (GTPasa activating protein), es decir, cambia Rac-GTP a Rac-GDP, con lo que evita el *ruffling* estimulado por SopE además antagoniza la activación de JNK; su porción amino-terminal comparte secuencias similares con YopE, en su porción carboxi-terminal es semejante a YopH así como al dominio catalítico de algunas tirosin fosfatases de células eucarióticas.<sup>28,37,38,82</sup>

*Salmonella* puede invadir varias líneas celulares y se considera que puede estimular más de un camino de transducción de señales para promover su entrada a las células del hospedero. En células HeLa y en fibroblastos de ratón B82 la bacteria estimula a la fosfolipasa C, que cataliza la escisión del fosfatidilinositol 4-5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>) de membrana, generando inositol 1,4-5 trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). IP<sub>3</sub> induce la liberación del Ca<sup>2+</sup> almacenado

en el retículo endoplásmico (RE). El calcio y el fosfoinositol afectan proteínas de unión a actina, muchas de las cuales (alfa-actinina, talina, tubulina, tropomiosina y e兹rina) son recluidas en el sitio de entrada de la bacteria. El DAG junto con el  $\text{Ca}^{2+}$  activan a la proteína quinasa C (PKC), el  $\text{Ca}^{2+}$  junto con la PKC sirven para activar a otras enzimas y finalmente a factores de transcripción. El evento involucra CDC42 y Rac1 pero no Rho<sup>12,39,46,65,122</sup> Las citocalasinas B y D, que evitan la polimerización de los microfilamentos de actina previenen la entrada de *Salmonella*, mientras que los inhibidores de la tirosin cinasas no bloquean la entrada.<sup>24,30,34</sup>

Por el contrario, la fosfolipasa C no juega un papel importante en la entrada de *Salmonella* a las células Henle-407, en donde la infección desencadena MAP cinasas, que a su vez activan a la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) que da como resultado la producción de ácido araquidónico (AA), que es convertido en leucotrienos D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>) por

varias enzimas, incluyendo 5-lipooxygenasas (5-LO). LTD<sub>4</sub>, directa o indirectamente activa los canales de calcio, lo que causa la entrada del catión, que trae como consecuencia rearreglos del citoesqueleto. El aumento de calcio estimula la secreción de cloro y por lo tanto se produce diarrea, ya que el agua lo acompaña.<sup>39,54</sup> La internación es rápida, *Salmonella* se observa dentro de vacuolas en las células fagocíticas y no fagocíticas (SCV), posteriormente la superficie celular vuelve a la normalidad gracias al efecto de SptP. (Fig. 1).

Claramente *Salmonella* dispara un flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  en cultivos de células epiteliales, las cepas que contienen mutaciones en genes de invasión bacteriana ya no causan flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ni reacomodo de actina. Adicionalmente los agentes quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular bloquean la entrada de salmonela en cultivos de células epiteliales.<sup>117</sup> Las proteínas efectoras SipB, SipC y SipD comparten dominio hidrofóbico presente en la familia RTX (toxina formadora



**Figura 1.** Cascada de señalización de *Salmonella*.

de poro) se comportan como translocasas y son las responsables de formar poros en la membrana de las células eucarióticas. SipC se transloca junto con SipB de manera *inv*-dependiente. SipD además regula el sistema de secreción tipo III (SSTIII) de manera similar a YopN /LcrE de *Yersinia*, ya que su mutación produce un aumento en la secreción de proteínas efectoras.<sup>18,29,91</sup>

Las proteínas efectoras pueden ser consideradas como toxinas debido a que de alguna manera afectan a la célula eucariótica, sin embargo a diferencia de éstas, carecen de receptores de unión por lo que son incapaces de tener acceso directo a su sitio de acción si no es por la contribución del SSTIII. Todo parece indicar que la penetración de *Salmonella* a la mucosa intestinal es esencial para causar infección letal, el hecho de bloquear la penetración a la mucosa intestinal al mutar genes involucrados en invasión, permite obtener cepas atenuadas que pudieran ser utilizados como posibles inmunógenos.

*Salmonella* produce efectos citotóxicos que resultan en la destrucción de las células M y la invasión de enterocitos adyacentes tanto por la cara apical como por la basolateral, induce apoptosis de macrófagos activados mediante la proteína efectora SipB (*Salmonella* invasion protein) y fagocitosis inducida en macrófagos no activados, para poder ser transportada a hígado y bazo.<sup>13,20,70,103</sup> SipB se asocia con la proteasa proapoptótica caspase I (ICE) que activa a las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-18. El fenotipo citotóxico es dependiente de la fase de crecimiento bacteriano. Lundberg, demostró que cultivos bacterianos en la fase logarítmica de crecimiento son citotóxicos, mientras que en la fase estacionaria no lo son. Recientemente, Santos reporta que los cultivos en fase estacionaria también son citotóxicos de manera SipB-independiente, después de 12-18 horas postinfección, dicho evento es dependiente de OmpR y SPI-2 y permite la diseminación de *Salmonella* por endocitosis de cuerpos apoptóticos.<sup>95,119,139</sup>

*Salmonella enterica* serovar Typhimurium puede llegar a hígado y a bazo por una ruta alterna, que no requiere colonización intestinal o invasión de células epiteliales intestinales, la bacteria es llevada directamente del lumen intestinal a circulación, bazo e hígado por fagocitos que expresan CD18.<sup>20,137</sup>

Los modelos de cultivos celulares *in vitro* han sido de gran utilidad para comprender la interacción entre *Salmonella* y las células eucarióticas, la identificación de los genes involucrados en el proceso infeccioso así como los factores que regulan estos genes. Se tienen reportes del empleo de células HeLa, Henle-407, CHO, Hep-2, VERO, BAT, MDCK; líneas celulares de adenocarcinoma humano: Caco-2, HT29 y T84<sup>36,52</sup> también se han utilizado líneas de macrófagos J774, RAW 264.7.<sup>13,105</sup> Para conocer el porcentaje de invasión de la cepa silvestre FVA1 de *S.*

*enterica* serovar Gallinarum utilizamos células BAT y HeLa y macrófagos J774 para conocer el porcentaje de fagocitosis, muerte celular y detección de la condensación de la cromatina postinfección.<sup>33</sup>

Debido a la ausencia de una barrera mucosa, factores inmunes del hospedero como anticuerpos y citocinas, células inflamatorias así como mediadores de la inflamación en el modelo de líneas celulares, se recomiendan modelos *in vivo*. El uso de embrión de pollo en investigación biológica representa un instrumento valioso, con la finalidad de recuperar la patogenicidad de las cepas de *S. enterica* serovar Gallinarum, inoculamos embriones de pollo libres de patógenos específicos de 8 días de edad, vía saco vitelino. Los embriones inoculados presentaron congestión, hemorragias, líquido amniótico turbio, licuefacción de la yema, enanismo y olor putrefacto lo que se traduce como daño ocasionado por la infección de *Salmonella*. En los embriones inoculados con las cepas de *S. enterica* serovar Gallinarum FVA1 y U2, reportadas en trabajos anteriores como las más patógenas el daño visible fue mayor.<sup>33,132,134</sup> Se sugiere el uso de embriones de pollo para recuperar la patogenicidad de las cepas de *Salmonella* que han estado liofilizadas o congeladas por períodos mayores de dos años, inclusive se sugiere el uso del embrión de pollo, en trabajos futuros, para evaluar cepas de *Salmonella* mutadas en genes involucrados en patogenicidad.

Utilizando asas ligadas de ratón Clark, demuestran que las células M juegan un papel importante en la patogénesis de la salmonellosis murina, ya que en etapas tempranas de la infección estas células son los sitios primarios de invasión bacteriana, sin embargo al utilizar mutantes en *inv* se continúa observando rearrreglos de la membrana celular en la célula M, indistinguibles de los producidos por la cepa silvestre, por lo que sugieren un mecanismo de invasión *inv*-independiente.<sup>15,16</sup> También se han utilizado asas ligadas de intestino de pollo y de bovino para conocer la invasión intestinal y comprobar funciones de las proteínas efectoras de *Salmonella* involucradas en el proceso infeccioso.<sup>1,119,141,145,146</sup>

## ENTERITIS Y DIARREA

Los mecanismos de patogenicidad con que *Salmonella* induce diarrea y septicemia no han sido descritos detalladamente, pero parece ser un fenómeno complejo que involucra diversos factores de virulencia. Se ha demostrado la presencia de enterotoxina en *S. enterica* serovar Typhimurium y *S. enterica* serovar Typhi similar a las enterotoxina de *Vibrio cholerae* (CT) y toxina termolábil (LT) de *E. coli*.

Balcázar amplificó un fragmento del gen que hemos denominado *eltA-like*, en *S. enterica* serovar Gallinarum, que presenta secuencia nucleotídica homóloga con un fragmen-

to del gen *eltA* de ETEC en un 95% y con el gen *ctxA* de *V. cholerae* en un 83%.<sup>5,140</sup> Posteriormente, Vázquez amplificó 1276 pb, fragmento que corresponde al tamaño de ambos genes (*eltAB*), la secuencia nucleotídica de estos genes tiene una similitud del 98% con respecto a los genes *eltAB* de ETEC y del 79% con el gen *ctxAB*, dichos genes fueron clonados y capaces de expresar una toxina, la cual fue reconocida con anticuerpos anti-CT.<sup>134,135</sup> Urquiza encontró que las proteínas obtenidas del sobrenadante del cultivo y las proteínas de espacio periplasmático de *S. enterica* serovar Gallinarum FVA-1, tienen actividad enterotóxica, la cual fue observada mediante elongación de células CHO.<sup>132</sup> La participación de la enterotoxina en la producción de enteritis ha sido propuesta sin ser comprobada, la disrupción del gen *stn*, responsable de codificar la toxina, no afecta la enteropatogenicidad de *S. enterica* serovar Typhimurium y *S. enterica* serovar Dublin en el ganado.<sup>142</sup> Se sugiere realizar nuevos ensayos en diferentes modelos animales, donde se prueben mutantes en *stn* para corroborar la importancia de la enterotoxina.

Actualmente se sabe que la proteína efectora SopB/SigD (PipC/SigE funciona como su chaperona) tiene actividad de inositol fosfato fosfatasa, por lo que genera una gran cantidad de fosfolípidos de inositol e inositol fosfato con capacidad de señalación, que además de participar en los rearranglos del citoesqueleto, se encuentra involucrada en la secreción de fase fluida al estimular la secreción de cloro.<sup>47,72,145</sup> La proteína efectora SopD, codificada en el centisoma 64 y secretada por el SITIII de la SPI-1, trabaja en conjunto con SopB.<sup>79,102</sup>

La proteína PipA (pathogenicity island encoded protein) contribuye a la secreción fluida y reacción inflamatoria en la mucosa intestinal, su mutación muestra marcada disminución de la respuesta inflamatoria en el modelo de asa ligada de bovino. Los genes responsables de codificar dichas proteínas, se localizan en el centisoma 23, segmento del cromosoma de *Salmonella* identificado como la SPI-5.<sup>20</sup>

*Salmonella* induce la migración de neutrófilos y macrófagos (PMN) así la liberación de citocinas proinflamatorias como IL8, GM-CSF, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , GCP-2 (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos) GRO- $\alpha$  (gen  $\alpha$  relacionado a crecimiento), GRO- $\beta$  y GRO- $\gamma$  que reclutan células fagocíticas y están involucradas en el proceso diarreico, también se habla de un quimioatractante, aún no caracterizado, conocido como PEEC (pathogen-elicted epithelial chemoattractant). En la cara apical y lateral de los enterocitos sobreexpresa ICAM-1, que colabora en el movimiento fagocítico de los neutrófilos. Zhang reporta que las proteínas efectoras involucradas son SipA, SopA, SopB, SopD y SopE2.<sup>25,51,80,99,143</sup> Las cepas de *Salmonella* con mutaciones que afectan el sistema *inv/spa*, *phoP/PhoQ* y *hilA* son incapaces de provocar la migración de PMN al foco de la

infección.<sup>47,107</sup> La producción de citocinas proinflamatorias inducida por *Salmonella* es debida a la activación de factores de transcripción NF-kB y AP-1, como consecuencia de la estimulación de las MAP cinasas por parte de la proteína efectora SopE; SopB activa Akt, quinasa serina-treonina que puede regular la actividad transcripcional de NF-kB.<sup>65,71,125</sup> El incremento de la permeabilidad vascular que acompaña la inflamación en combinación con la perdida de la integridad epitelial de la mucosa intestinal provoca la diarrea, al verse incrementada la salida de líquidos y electrolitos al lumen intestinal. (Fig. 2).

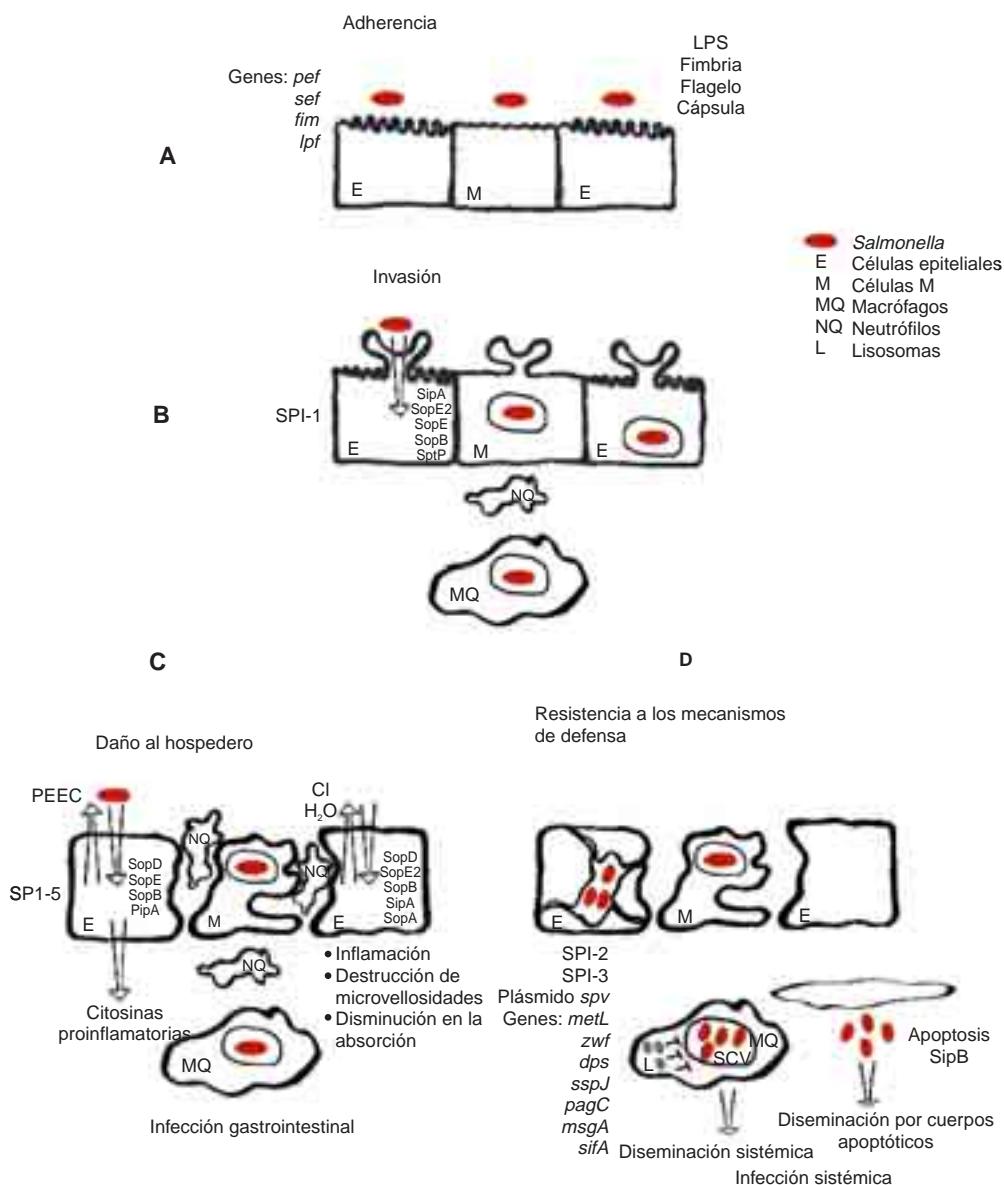
## ISLAS DE PATOGENICIDAD

Se han secuenciado los genomas completos de *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18 (4 809 037 bp), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 (4 857 000 bp) y *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A cepa ATCC 9150 (4 585 229 bp) lo que ha sido de gran utilidad en estudios de epidemiología, especificidad de hospedero y patogénesis al detectar la presencia de pseudogenes, profagos funcionales, islotes de patogenicidad, islas de patogenicidad y sistemas de secreción<sup>97,98,111</sup> sin embargo algunos genes requieren futuras investigaciones debido a que aun se desconoce su función precisa.

Las islas de patogenicidad se constituyen por un grupo de genes involucrados en codificar factores específicos de virulencia, su porcentaje de G-C difiere del promedio del genoma bacteriano, se presentan repeticiones directas en sus extremos, portan genes que codifican factores de movilidad como integrasas, transposasas o secuencias de inserción y se encuentran frecuentemente insertadas en loci de tARN.<sup>9,96,97</sup>

*Salmonella* presenta múltiples genes involucrados en la invasión, localizados en el centisoma 63 que forman la SPI-1; se trata de un segmento de 35-40 kb que contiene 31 genes que pueden ser divididos en categorías que incluyen: genes que codifican el SSTIII, denominados *inv/spa*,<sup>43,54</sup> genes que codifican proteínas involucradas en la translocación de las moléculas efectoras dentro del citoplasma de la célula hospedero y genes que codifican las proteínas efectoras y sus chaperonas, algunas de las cuales se mencionaron anteriormente. A diferencia de otras islas de patogenicidad de *S. enterica*, SPI-1 no está localizada inmediatamente adyacente a genes tARN.<sup>59</sup>

La SPI-1 se encuentra presente en *S. bongori* y todas las serovariedades de *S. enterica*, probablemente fue adquirida en la evolución temprana de *S. enterica* por transferencia de genes, de manera horizontal; lo que se propone al determinar su % de G-C que es del 42-47% mientras que el del cromosoma de *Salmonella* es del 52-54%; además el tamaño, ordenamiento y orientación de los genes *inv/spa* en



**Figura 2.** Modelo de los eventos en la patogénesis de la infección de *Salmonella* y genes de virulencia asociados.

SPI-1 es similar a los genes de invasión del plásmido de virulencia de *Shigella*.<sup>40,102</sup>

La SPI-1 codifica determinantes que median: la invasión de células del hospedero no fagocíticas, apoptosis de macrófagos *in vitro* y activación de caminos MAP cinasas y factores de transcripción.<sup>58,66</sup> Las mutantes en la SPI-1 disminuyen virulencia en el ratón, cuando la bacteria es inoculada por vía oral y no se ve disminuida su virulencia cuando se inocula por vía parenteral, lo que sugiere que la SPI-1 funciona en los primeros estadios de la infección.

Actualmente se sabe que *Salmonella* cuenta con cinco islas de patogenicidad: SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4 y SPI-5. La SPI-

2 también codifica para un SSTIII que se activa cuando la bacteria se encuentra intracelularmente dentro de una vacuola. Se localiza en el centisoma 31, situada inmediatamente adyacente al gen tARN *valV*, su tamaño es de 40 kb y tiene un porcentaje de G-C del 44.6%. Consta de 32 genes que regulan la supervivencia y replicación bacteriana en los compartimentos intracelulares de fagocitos y células epiteliales.<sup>68,133</sup>

Las funciones moleculares de la SPI-2 no han sido caracterizadas con tanto detalle como las de la SPI-1. Las mutantes en dicha isla son severamente atenuadas en la infección sistémica al ser inoculadas oral o intraperitonealmente.<sup>10,68,120</sup>

La SPI-2 está dividida en dos segmentos, los cuales se obtuvieron en diferentes eventos de transferencia horizontal: la porción más pequeña es de 14.5 kb, contiene un grupo de cinco genes *ttr* involucrados en la reducción del tetrahidrofotótonato y 7 ORFs con función desconocida, está presente en *S. bongori* y parece que no interviene significativamente en la infección sistémica; la porción mayor de 25.3 kb, está presente únicamente en *S. enterica* alberga genes importantes de virulencia,<sup>96,108,109</sup> se sugiere que en *S. enterica* serovar Gallinarum y *S. enterica* serovar Typhi las regiones de SPI-2 están duplicadas.<sup>120</sup>

Los genes que conforman la SPI-2 se pueden dividir de la siguiente manera:

*ssa* (secretion system apparatus): representados por *ssaB-E* y *ssaG-V*, cuyos productos conforman el SSTIII.<sup>67,68</sup>

*ssr/spiR* (secretion system regulator): constituidos por *ssrA* y *ssrB*, que codifica para un sistema regulador de dos componentes, requerido para la expresión de los genes *sse*, *ssa* y *ssc*. El gen *ssrA* está a su vez regulado por OmpR/EnvZ, que es responsable de la activación y represión de genes en respuesta a cambios de osmolaridad y pH.<sup>8,68,90</sup>

*ssc* (secretion system chaperone): codifican las proteínas *SscA* y *SscB*. La proteína *SscA* es similar a *SycD*, producto de *icrH* de *Yersinia pseudotuberculosis*, chaperona de *YopB* y *YopD*; *SscB* es semejante a la proteína *IpaI* de *Shigella flexneri*.<sup>85</sup>

*sse* (secretion system effector), representados por los genes *sseA-sseG*. *SseB*, semejante a *EspA*, es secretada a la superficie bacteriana y necesaria para prevenir la localización de NADPH oxidasa, así como la formación de radicales reactivos del oxígeno en la membrana del fagosoma de macrófagos murinos, en la actualidad no se sabe si este efecto es debido a la actividad directa de *SseB* dentro del macrófago o si *SseB* se requiere para translocar otras proteínas dentro de los macrófagos.<sup>85,96,138</sup> La proteína *SseD* es semejante a *EspB* de *E. coli*; *SseC* se comportan como *EspD* y *YopB*, proteínas formadoras de poro requeridas para la translocación. Las condiciones que se han utilizado *in vitro*, como el medio mínimo con concentraciones limitadas de Mg<sup>2+</sup> y pH 5, no han sido las óptimas para la expresión de estas proteínas en el medio, por lo que se recomiendan ensayos futuros.<sup>85,115</sup> La proteína efectora *SpiC* también conocida como *SsaB* interfiere con el tráfico intracelular de membranas, inhibiendo la fusión de SCV con los lisosomas.<sup>109,130</sup>

Dos proteínas, *SspH2* y *SspH1* similares a *IpaH* y *YopM*, codificadas por los profagos *Gifsy-2* y *Gifsy-3* son secretadas a través del SSTIII de la SPI-2 y contribuyen a la patogénesis de la salmonelosis en becerros. *SspH2* es dependiente del regulador *SsrA/SsrB*, secuencias *sspH2-like* se han detectado en la mayoría de los serotipos examinados

de *Salmonella*. *SspH1* es independiente del regulador *SsrA/SsrB* y puede ser translocada por los SSTIII de la SPI-1 o de la SPI-2 al igual que la proteína *SlrP* y sólo se han detectado en *S. enterica* serovar Typhimurium.<sup>64,101</sup>

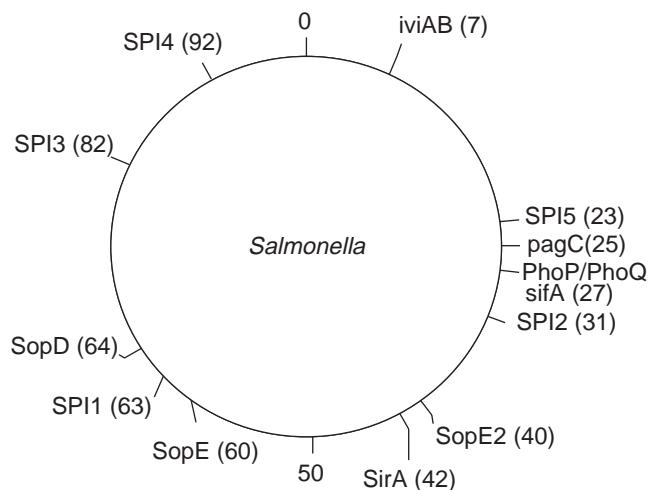
Sorprendentemente, mutantes en SPI-2 de *S. enterica* serovar Typhimurium, muestran dificultad para invadir cultivos de células epiteliales o macrófagos y la cantidad de *SipC*, proteína secretada por la SPI-1, disminuye; además se observa resistencia alterada a varios agentes antibacterianos.<sup>21</sup> Recientemente Uchiya comprueba la sobreexpresión de IL-10 en macrófagos infectados, al verse incrementada, de manera SPI-2 dependiente, la actividad de la PKA.<sup>131</sup>

La SPI-3 también es requerida para la supervivencia intracelular en macrófagos, provee productos esenciales para el crecimiento en condiciones limitadas de Mg<sup>2+</sup>. Su tamaño es 17 kb y tiene un porcentaje de G-C del 39.8-49.3%, está localizada en el centisoma 82 inmediatamente adyacente al gen tARN *selC*. Está transcripcionalmente controlada por *PhoP/PhoQ*. Alberga 10 ORFs organizados en 6 unidades transcripcionales, incluye al operón *mgtCB* que codifica la proteína *MgtC* (intramacrophage survival protein) y el transportador de Mg<sup>2+</sup> de alta afinidad *MgtB*.<sup>9,59,96</sup>

La SPI-4 codifica un supuesto sistema de secreción tipo I (SSTI) que media la secreción de toxinas y se cree que participa en la adaptación de *Salmonella* al ambiente intracelular en los macrófagos, es de 27 kb y está compuesta por 18 genes localizados en el centisoma 92.

Finalmente, la SPI-5 es de 7.5 kb se encuentra localizada en el gen tARN *serT*, centisoma 20; su porcentaje de G-C es de 43.6%. Codifica proteínas efectoras involucradas en la secreción fluida y reacción inflamatoria en la mucosa intestinal, como *SopB* (*SigD*) que además de estimular la secreción de cloro, se encuentra involucrada en el flujo de macrófagos, para su secreción utiliza el SSTIII de la SPI-1.<sup>22</sup> Otras proteínas codificadas en esta isla son: *MarT* con secuencia similar a *ToxR*, proteína reguladora de *V. cholerae*, las mutantes se ven afectadas en su capacidad para producir salmonelosis entérica pero no salmonelosis sistémica<sup>144</sup> y *PipA* que es secretada y translocada vía el SSTIII de SPI-2. *sopB*, *pipC*, *pipB* y *pipA*, están contenidos dentro de la misma unidad transcripcional cuya expresión es regulada por *SsrAB*.<sup>20,86</sup> (Fig. 3).

Ninguna de las mutantes en la SPI-5 se alteró en su crecimiento *in vitro* o en su capacidad de invadir células HeLa comparada con la cepa silvestre. Sin embargo, la magnitud de la respuesta secretora e inflamatoria evocados por las mutantes en *S. enterica* serovar Dublin se redujo significativamente en asas ligadas de bovino. Esto se relaciona con el decremento en la severidad de la diarrea en becerros infectados con cepas mutadas, sin verse afectada la capaci-



**Figura 3.** Localización de los genes de virulencia en el cromosoma de *Salmonella*. Los números entre paréntesis indican el centisoma.

dad de dichas mutantes para producir salmonelosis sistémica.<sup>144</sup>

Para *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18, se reportan diez islas de patogenicidad. Las primeras cinco ya fueron mencionadas, la SPI-6 (59kb) contiene al operón de la fimbria tipo chaperona-usher *safA-D* y *tcsA-R*, la SPI-7 (143 kb) codifica la síntesis de cápsula (Ag Vi), el profago SopE y el operón del pili tipo IVB. SPI-8 (6.8 kb) contiene dos pseudogenes que codifican bacteriocinas y una integrasa, SPI-9 (16 kb) porta genes para la secreción de un SSTI y una proteína RTX-like, finalmente la SPI-10 (33 kb) contiene al fago 46 y el operón *sefA-R*.<sup>111</sup>

Las islas de patogenicidad contribuyen a la macroevolución, al desarrollar variantes patogénicas, mientras que el proceso de rearreglo, delección y transferencia de islas de patogenicidad tiene fuerte impacto en la microevolución y adaptación de los microorganismos patógenos durante el proceso de infección.<sup>62</sup> Los plásmidos, bacteriófagos y otros elementos genéticos móviles juegan un papel importante en la especialidad y diversidad, por lo que no será sorprendente encontrar nuevas recombinaciones.

#### SUPERVIVENCIA INTRACELULAR

Después de un periodo de adaptación de 3-4 horas, *Salmonella* tiene la capacidad de replicarse dentro de las SCV, que se caracterizan por tener concentraciones limitadas de Mg<sup>2+</sup> y Fe<sup>2+</sup> y un pH ácido, la acidificación dentro del fagosoma es necesaria para la supervivencia y replicación intracelular. Las SCV son espaciosas, lo cual permite que los productos antibacterianos se diluyan, se expresen genes que aumentan la supervivencia intracelular y sus productos

neutralicen péptidos catiónicos. Una proporción significativa de macrófagos sufre apoptosis después de la invasión, situación contraria se observa en células epiteliales.<sup>35,122</sup>

La biogénesis de las SCV se caracteriza por una pérdida rápida de marcadores endocíticos tempranos EEA1 y receptor de transferrina (TfR), enriquecimiento progresivo de ATPasa vacuolar (involucrada en la acidificación del fagosoma) y de algunas glicoproteínas lisosomales (Lgps) de manera Rab7 dependiente, sin interactuar directamente con lisosomas. Las SCV adquieren marcadores lisosomales LAMP1 y LAMP2 (proteínas membranales asociadas a lisosomas) y fosfatasa ácida lisosomal (LAP), aunque carecen de marcadores lisosomales cuyo blanco depende de señales de manosa 6-fosfato (la mayoría de las enzimas lisosomales), así como del propio receptor M6PR, lo cual sugiere que no existe relación entre las SCV y los compartimentos endosomales tardíos.<sup>11,31,57,100</sup>

Además, para excluir enzimas lisosomales solubles, las SCV muestran una accesibilidad limitada a endocitosis de fase fluida.<sup>49,50</sup> Las SCV tienen la capacidad de fusionarse selectivamente con vesículas que acarrean diferentes marcadores, con la finalidad de establecer un microambiente fagosomal que permita su supervivencia. La fusión del fagosoma con endosomas tempranos es estimulada por Rab5 al unirse a SopE. Rab5 activa SNARE el cual recluta a SNAP (soluble NSF attachment protein) y NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) que se une e hidroliza ATP y por lo tanto promueve la fusión con compartimientos endosomales tempranos.<sup>106</sup>

Los marcadores lisosomales se localizan en extensiones filamentosas, microtúbulo-dependiente, que se conectan a las SCV; una función potencial de estas estructuras es proveer de nutrientos a las bacterias intracelulares. En el centisoma 27 del cromosoma de *S. enterica* serovar Typhimurium, entre los genes *potB* y *potC*, se localiza un segmento de 1.6 kb que alberga al gen *sifA* (*Salmonella* induced filaments), dependiente de la SPI-2,<sup>8,57,100</sup> que es requerido para la formación de dichos filamentos; *sifA* tiene un porcentaje de G-C del 41% y fragmentos flanqueados de 14 pb en repetición directa, lo cual sugiere que su incorporación ocurrió por un mecanismo de recombinación sitio-específico.<sup>58,59</sup> Recientemente, Hernández demostró que *sopB* es esencial en el establecimiento y replicación intracelular de *Salmonella*, al estar involucrado en la formación de las SCV; mantiene altos niveles de fosfatidilinositol trifosfato en la membrana de las mismas, lo que evade la unión con los lisosomas y permite la unión con otras SCV.<sup>24,69</sup>

Un plásmido de 85 kDa contribuye a la supervivencia de *S. enterica* serovar Gallinarum dentro de los macrófagos.<sup>6</sup> El locus *spv* (*Salmonella* plasmid virulence), de dicho plásmido contiene cinco genes: *spvRABCD*; de los cuales

*spvR* codifica para un activador transcripcional, de la familia LysR-MetR, que regula su propia síntesis y es requerido para la expresión del operón *spvABCD*. El factor  $\sigma^s$  (*RpoS*) induce a *spvR* y ambos actúan en el promotor *spvA*, induciendo la expresión de los genes *spvABCD*, lo cual permite la síntesis de las proteínas Spv.<sup>48,60,118</sup> Al no ser degradada *Salmonella* en los macrófagos se inhibe el procesamiento y presentación de sus抗ígenos.

*Salmonella* expresa enzimas que inactivan directamente radicales reactivos de oxígeno y nitrógeno; como la homocisteína (gen *metL*), que antagoniza al óxido nítrico y superóxido dismutasa (sadCII). Su producción está inducida por el factor  $\sigma^s$ , el cual también es necesario para la transcripción de genes involucrados en la adaptación a ambientes estresantes, como choque ácido, limitación de nutrientes, estrés oxidativo, así como producción de Agf. La disruptión del gen *rpoS* atenúa significativamente la virulencia de *Salmonella*.<sup>110</sup>

*Salmonella* produce además superoxidodismutases (SODs) como Fe-SOD (*sodB*), Mn-SOD (*sodA*), Cu, Zn-SOD (*sodC*). SodCI está codificada por un bacteriófago *Gifsy-2* localizado en el centisoma 24.<sup>32,136</sup> Otras proteínas que son necesarias para sobrevivir bajo estrés oxidativo son la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, codificada por *zwf*. Dps, agente quelante del Fe, evitando su participación en la formación de los radicales reactivos del oxígeno.<sup>63</sup> SspJ (superoxide susceptibility protein) cuyo gen está localizado entre el centisoma 54.4 y 64.<sup>127</sup> Finalmente proteínas efectoras codificadas en la SPI-2 se consideran involucradas en la protección al estallido respiratorio al prevenir la unión de las vesículas que contienen NADPH-oxidasa con las SCV.<sup>136</sup>

#### ISLOTES DE PATOGENICIDAD

*Salmonella* requiere de otros genes para su virulencia como *pagC* y *msgA*, los cuales se localizan en el centisoma 25 del cromosoma de *S. enterica* serovar Typhimurium; el gen *pagC*, PhoP dependiente, codifica para la síntesis de una proteína de membrana externa, las mutantes son invasivas pero no logran multiplicarse dentro de los macrófagos ni causan infección letal en el ratón cuando se administran intraperitonealmente, sugiriendo que la proteína PagC participa en la enfermedad sistémica. El gen *msgA*, PhoP independiente, es necesario para la sobrevivencia dentro del macrófago y virulencia en el ratón. El operón *iviVI-AB* (*in vivo* induced) que se localiza en el centisoma 7, es otra región del cromosoma de *Salmonella* que se caracteriza por contenidos bajos de G-C, está regulada por PhoP y se considera que está involucrada en la adhesión e invasión a las células del hospedero. A estas secuencias, de menor tamaño que las islas de patogenicidad, algunos autores las han llamado islotes de patogenicidad.<sup>58</sup> El

gen *sifA*, *sopD*, *sspH2* y el operón *lpf* mencionados anteriormente también se encuentran dentro de esta categoría.<sup>111</sup>

#### REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES CONTENIDOS EN LAS ISLAS DE PATOGENICIDAD

Las bacterias se tienen que adaptar a cambios ambientales drásticos cuando entran al hospedero, viajan a lo largo del aparato digestivo y al pasar de un medio extracelular a uno intracelular, esto lo logran debido a una regulación coordinada y precisa de sus genes. Para lograr este control, *Salmonella* utiliza sistemas reguladores de dos componentes que incluyen un sensor histidina cinasa (proteína transmembranal) y un regulador de respuesta que se activa por fosforilación y activa o reprime, a nivel transcripcional, la expresión de un grupo de genes. Así, PhoQ/PhoP, PmrB/PmrA, SsrA/SsrB, EnvZ/OmpR y BarA/SirA regulan la invasión bacteriana y la supervivencia intracelular. (Fig. 4).

La regulación específica de los genes de la SPI-1 está mediada por HilA, regulador transcripcional de la familia de activadores transcripcionales OmpR/ToxR, el gen responsable de su síntesis está codificado dentro de la SPI-1. A su vez, la expresión de *hilA* está controlada transcripcionalmente por los sistemas reguladores de dos componentes, PhoP/PhoQ y SirA (*Salmonella* invasion regulator). PhoP reprime a *hilA*, mientras que SirA activa su transcripción. Las señales que activan a SirA son, bajas concentraciones de oxígeno, alta osmolaridad (300 mM) y pH ligeramente alcalino, por otra parte PhoP se activa con condiciones limitadas de Mg<sup>2+</sup>, condiciones que se ven reflejadas en el lumen intestinal y en el medio intracelular, respectivamente. Así, el crecimiento bajo condiciones de alta osmolaridad, pH alcalino y disminución en las concentraciones de oxígeno estimulan la secreción de proteínas asociadas al SSTIII de la SPI-1, resultando en el aumento de los niveles de internalización de la bacteria.

HilA controla la expresión de los genes que codifican las proteínas del SSTIII, es activador transcripcional del promotor de *invF*, *sipC*, *sipA*, y *prgH*, el promotor de *prgH* controla la expresión de *orgA-B* (oxigen regulated genes) y *prgK*.<sup>84</sup> InvF proteínas de la familia de reguladores transcripcionales AraC controla la expresión de las proteínas efectoras.<sup>20,84</sup> Cabe señalar que *sipC* tiene dos promotores, uno HilA dependiente, corriente arriba de *spaS* y otro InvF dependiente corriente abajo de *spaS*, SptP también está controlado por HilA e InvF.<sup>28,81,93</sup> SirA también regula la expresión de SopB, codificada por al SPI-5, InvF es el activador transcripcional del promotor *sigDE*.<sup>2,3,28</sup>

La proteína efectora, hipervariable AvrA (a virulence factor R) de *Salmonella*, semejante a AvrRv1 de *Xanthomonas caepstris* pv *vesicatoria*, agente etiológico de la enfermedad de la hoja manchada del tomate y de la pimienta

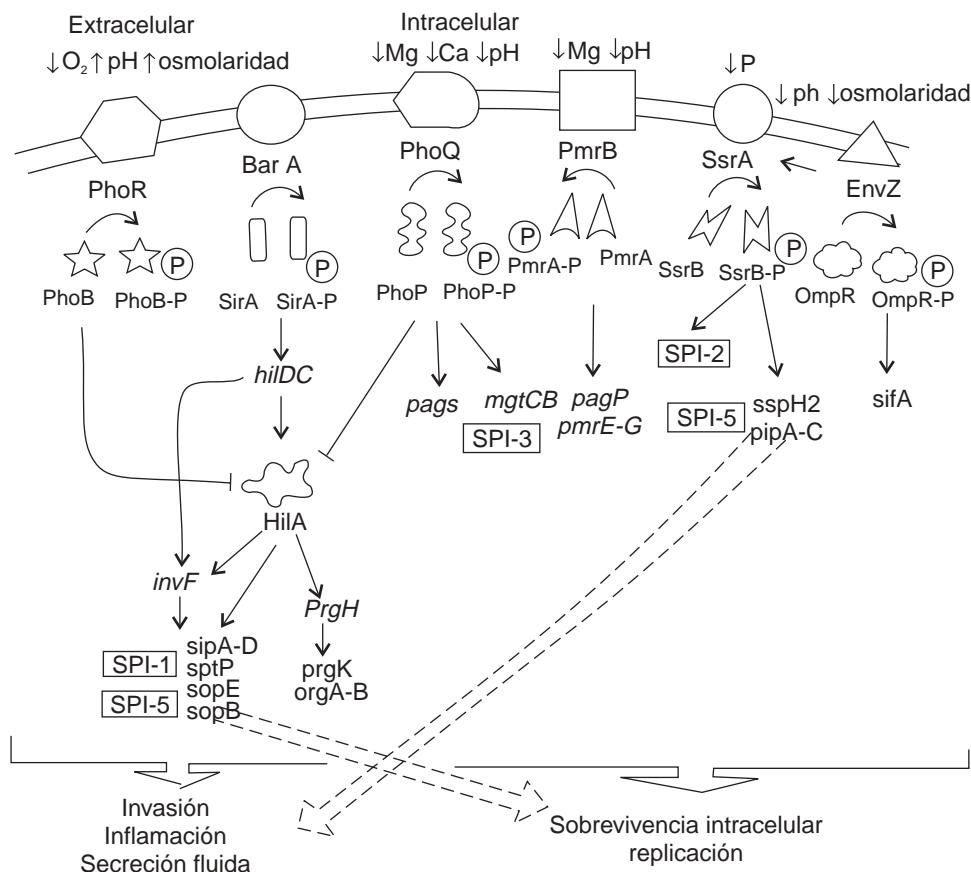


Figura 4. Modelo de regulación de las islas de patogenicidad de *Salmonella*.

no es controlada por HilA ni InvF, probablemente porque fue recientemente adquirida.<sup>28,102</sup>

La expresión de *hilA* está constitutivamente reprimida por una proteína H-NS-like que se une al ADN y modifica el grado de superenrollamiento, lo cual ocasiona que la ARN polimerasa no pueda iniciar eficientemente la transcripción del promotor de *hilA*. La SPI-1 contiene los genes *hilD* (regulador central de los genes de virulencia) y *hilC/sprA/sirC* que codifican las proteínas HilD y HilC, miembros de la familia AraC/XylS y que en respuesta a bajas concentraciones de oxígeno y alta osmolaridad, activan la transcripción de *hilA* al unirse directamente con H-NS o competir con H-NS por secuencias de ADN.<sup>20</sup>

La sobreexpresión de *hilD* y *hilC* puede inducir la transcripción de genes dependientes de *invF* independientemente de *hilA*.<sup>20,28,114</sup>

Lundberg demostró que HilA se requiere solamente para la expresión de *prgH* mientras que *sipB*, *invA* e *invF* pueden ser expresados de manera HilA independiente ya que HilC es capaz de activar directamente la expresión *invF* e *invA* en ausencia de HilA.<sup>94,95</sup>

El sistema PhoP/PhoQ, controla la expresión de más de 40 genes de virulencia; algunos de los cuales están involu-

crados en la supervivencia dentro de los macrófagos, al activar a *pags* (PhoP-activated genes) y reprimir a *prgs* (PhoP-repressed genes), exemplificados por los genes *inv spa*. Los *pags* incluyen el operón *mgtCB* y los genes de SPI-2. PhoP/PhoQ también está involucrado en la regulación de la respuesta a la tolerancia ácida y en la regulación de la capacidad de resistir a los péptidos catiónicos, modulando al regulador de dos componentes, PmrA/PmrB. PmrA activa promotores de ciertos *pags*, incluyendo aquéllos cuyos productos alteran el LPS y median resistencia a péptidos catiónicos, como las polimixinas. Los péptidos catiónicos antibacterianos se unen iónicamente al grupo fosforil (cargado negativamente) del lípido A, desestabilizando las membranas bacterianas y causando muerte celular. Los genes *pmrE-G* y *pagP* modifican al lípido A, lo que trae como consecuencia que no se permite la inserción de péptidos catiónicos; estos cambios en el lípido A, también producen un lipopolisacárido con menor potencial proinflamatorio (menor inducción de TNF $\alpha$ ).<sup>110</sup>

Evidencias recientes indican que el sistema PhoR/PhoB, el cual regula genes en respuesta a niveles de fósforo, puede reprimir genes de invasión de la SPI-1.<sup>93,94</sup> Un sistema de dos componentes que modula la expresión de genes en

respuesta a condiciones osmóticas, EnvZ/OmpR, probablemente también regula genes de virulencia ya que su disrupción disminuye la expresión de genes SPI-1. Mutantes en *phoQ* incrementan la dosis letal (DL) en un 50%.<sup>122</sup> Además la metilación del ADN juega también un papel importante en la regulación de los genes de virulencia de *S. enterica* serovar Typhimurium ya que mutaciones en *dam* tiene efectos pleiotrópicos en la expresión de varios genes de virulencia.

Una situación menos compleja se ha observado para la regulación de la SPI-2, en este caso un sistema regulador de dos componentes SsrA/SsrB, codificado dentro de la isla, es requerido para la expresión de los genes que codifica las proteínas efectoras, las chaperonas y el SSTIII. El gen *ssrA*, está a su vez regulado por OmpR/EnvZ, responsable también de la regulación de *sifA*.<sup>8,90</sup> Una vez que EnvZ detecta pH bajo y disminución en la osmolaridad fosforila a OmpR, el cual se une al promotor de *ssrA*. SsrA es un segundo censor de señales tardías del compartimiento vacuolar, probablemente detecta la disminución de fosfato; SsrA fosforila a *ssrB* el cual permite la transcripción de los genes *sse*, *ssc* y *ssa*. La colaboración entre estos dos sistemas detectan y responden a ambientes intracelulares.<sup>8,20,86,90</sup> Así un pH ligeramente alcalino y elevada osmolaridad inducen la SPI-1 y reprimen a SPI-2 por el contrario un osmolaridad y pH bajos reprimen a la SPI-1 e inducen a la SPI-2.

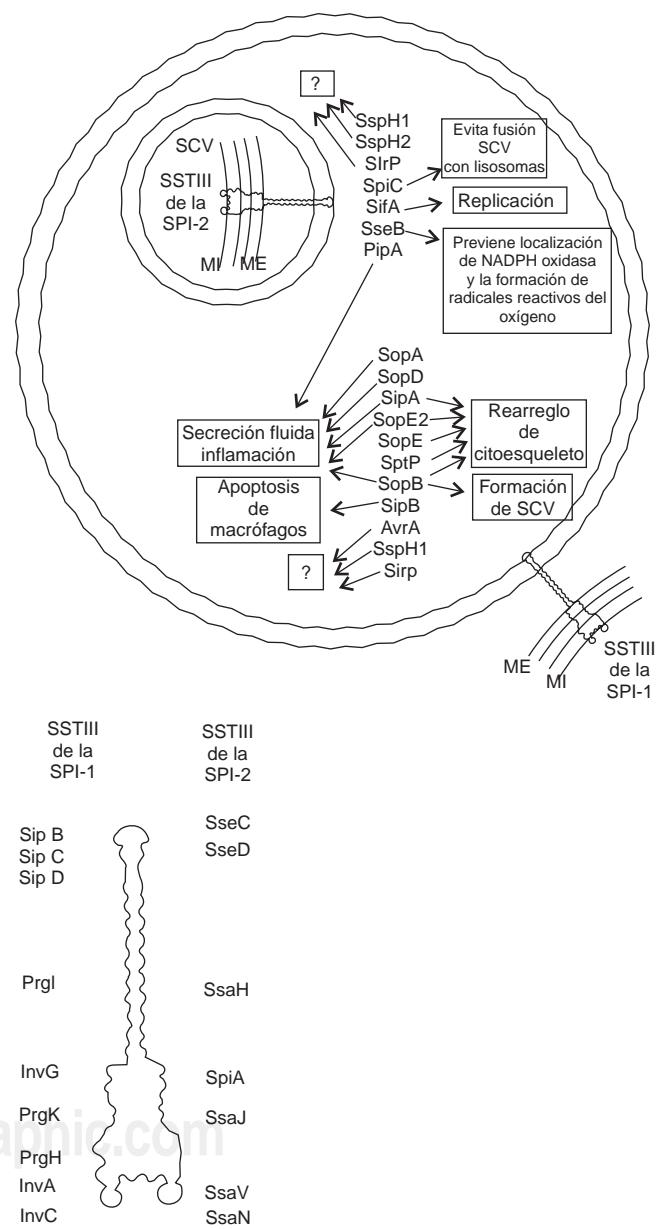
### SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III (SSTIII)

Las proteínas liberadas al medio externo deben de pasar por la membrana interna, el espacio periplásmico y finalmente la membrana externa para lo cual las bacterias Gram negativas han desarrollado diferentes sistemas de secreción (SSTI-V).

El SSTIII de *Salmonella* presenta las siguientes características: la proteína secretada no presenta secuencia señal amino-terminal que tenga que ser liberada, varias de las proteínas efectoras requieren de chaperonas específicas para su secreción; para la activación completa del sistema, se requiere de una señal inductora, que generalmente es el contacto con la célula del hospedero, lo cual permite la translocación de las proteínas efectoras dentro del citoplasma de la célula huésped. Se han reconocido sistemas homólogos en otras bacterias patógenas: *Yersinia*, *Erwinia*, *Pseudomonas* y EPEC entre otras (Tablas 2 y 3). Cabe mencionar que varios componentes del SSTIII son similares a las proteínas Fli/Flh involucradas en la biosíntesis del flagelo.<sup>91</sup>

Los componentes estructurales del SSTIII de la SPI-1 pueden ser divididos en categorías que incluyen: ATPasa de membrana interna, como InvC, que posee secuencias simila-

res a la subunidad  $\beta$  de  $F_0F_1$ ,<sup>29</sup> proteínas de membrana interna, ejemplificadas por InvA, SpaP/InvL, SpaQ/InvM y SpaR/InvN; proteínas de membrana externa, donde se incluye InvG,<sup>87</sup> proteína con secuencia similar a la familia de secretinas formadoras de poro y lipoproteínas como PrgK y PrgH. InvG, PrgK y PrgH forman la base de una estructura supramolecular llamada complejo aguja, consiste en 4 anillos conectados por un bastón, los anillos inferiores interactúan con la membrana interna, tienen un diámetro de 40 nm



**Figura 5.** Modelo de los sistemas de secreción de *Salmonella* y sus proteínas efectoras.

**Tabla 2.** Homología en las proteínas asociadas al SSTIII y el flagelo.

<i>Salmonella</i> sp SPI-1	<i>Salmonella</i> sp SPI-2	<i>Yersinia</i> sp	<i>Shigella</i> sp	<i>E. coli</i>	Flagelo
InvA	SsaV	LcrD	MxiA	EscV	FlihA
InvB			Spa 15		Flih
InvC	SsaN	YscN	Spa47/MxiB	EscN	Flii
InvE		LcrE/YopN	MxiC		
InvG	SpiA	YscC	MxiD	EscC	
InvH		VirG	MxiM		
SpaN		YscP	Spa32		
SpaO	SsaO	YscQ	Spa33/SpaO		FliN
SpaP/InvL	SsaR	YscR	Spa24/SpaP	EscR	FliP
SpaQ/InvM	SsaS	YscS	Spa9/SpaQ	EscS	FliQ
SpaR/InvN	SsaT	YscT	Spa29/SpaR	EscT	FliR
SpaS	SsaU	YscU	Spa40/SpaS	EscU	FliB
PrgH			MxiG		
PrgI	SsaH	YscF	MxiH	EscF	
PrgJ			MxiI		
PrgK	SsaJ	YscJ	MxiJ	EscJ	FliF
OrgA	SsaD	YscD	MxiK		
				EscD	

**Tabla 3.** Homología en las proteínas efectoras.

<i>Salmonella</i> sp SPI-1	<i>Salmonella</i> sp SPI-2	<i>Yersinia</i> sp	<i>Shigella</i> sp	<i>E. coli</i>
SipA		IpaA		
SipB	SseC	YopB	IpaB	EspD
SipC			IpaC	
SipD		YopN/LcrE	IpaD	
SipE			IpgC	
SptP		YopE y YopH		
AvrA		YopP/YopJ		
SopE			IpgD	
	SseB			EspA
	SseD			EspB
InvJ			VirA	
SpaO			IpgF	

y un ancho de 20 nm; los anillos superiores interactúan con la membrana externa y el peptidoglicano, tienen un diámetro de 20 nm y un ancho de 18 nm; se extiende a la superficie formando una estructura que se asemeja a una aguja de 80 nm de largo y 13 nm de ancho cuyo componente principal es PrgI, PrgJ controla su longitud.<sup>41,88,128</sup> InvE permite el correcto ensamblaje del complejo aguja e interviene en la regulación del proceso de secreción, disparando los eventos intracelulares que permiten la invasión.<sup>53,81</sup> InvH se requiere para la correcta localización de InvG<sup>128</sup> (Fig. 5).

La proteína InvA es considerada como una de las más importantes para el ensamblaje del SSTIII y exportación de

proteínas efectoras, esto lo demuestra un sinnúmero de ensayos utilizando mutantes en el gen *invA*.<sup>16,43-45,78,78,110,112</sup> La porción C-terminal de MxiA, pero no la de LcrD puede complementar los defectos de invasión de mutantes de *invA* indicando que esta porción de MxiA es funcional y estructuralmente homóloga a InvA.<sup>14,53</sup> Mientras que InvJ/SpaN y SpaO/InvK son de las primeras proteínas efectoras en secretarse y se cree que permiten la activación del proceso de secreción.<sup>19,40,148</sup>

InvA es una proteína de membrana interna, involucrada en la formación de un canal, su porción amino-terminal es hidrofóbica, con ocho dominios transmembranales, de por lo menos 20 aminoácidos, mientras que su porción carboxi-terminal hidrofílica, localizada en el citoplasma puede interactuar con otros componentes del sistema. El gen *invA* es el primer gen de un operón que contiene también los genes *invB* e *invC*. Al ser mutado el gen *invB*, no se afecta el proceso de invasión, sugiriendo que no se requiere para la entrada de la bacteria a la célula del huésped.

Lo expuesto anteriormente refleja la complejidad en la patogenia de *Salmonella*, la cual ha podido ser dilucidada gracias al trabajo interminable de cientos de investigadores y al uso de nuevas técnicas de biología molecular e ingeniería genética, que día a día se perfeccionan, lo que permite el diseño de nuevos modelos de investigación. Es importante recalcar la importancia, que comienza a dilucidarse, del papel que desempeñan las células dendríticas en la patogénesis de la salmonelosis, por lo que lo que se sugieren futuras investigaciones enfocadas hacia el conocimiento de la participación e importancia de dichas células en el pro-

ceso infeccioso. Por otra parte, se puede suponer que la combinación específica de los factores de virulencia determina las características de virulencia y la especificidad de huésped de *Salmonella*.

Finalmente, la presencia de Sistemas de Secreción Tipo III exclusivamente en bacterias patógenas proveen un blanco para el desarrollo de agentes terapéuticos que excluyan a la microbiota normal. Proteínas del sistema de secreción tipo III así como cepas mutadas en genes de virulencia son excelentes candidatos para el desarrollo de nuevas vacunas. Además, mutantes atenuadas de *Salmonella* pueden expresar antígenos de otros patógenos y ser liberados a la célula del hospedero haciendo uso del SSTIII o enviar proteínas a tumores.

#### REFERENCIAS

- Aabo S., J.P. Christensen, M.S. Chadfield, B. Carstensen, T.K. Jensen, M. Bisgaard & J.E. Olsen. 2000. Development of an *in vivo* model for study of intestinal invasion by *Salmonella enterica* in chickens. Infect. Immun. 68:7122-7125.
- Ahmer B.M., J. Reeuwijk, P.R. Watson, T.S. Wallis & F. Heffron. 1999. *Salmonella* SirA is a global regulator of genes mediating enteropathogenesis. Mol Microbiol. 31:971-982.
- Bajaj V., C. Hwang & C.A. Lee. 1995. *hilA* is a novel *ompR/toxR* family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. Mol Microbiol. 18:715-727.
- Bakshi C.S., V.P. Singh, M.W. Wood, P.W. Jones, T.S. Wallis & E.E. Galyov. 2000. Identification of SopE2, a *Salmonella* secreted protein which is highly homologous to SopE and involved in bacterial invasion of epithelial cells. J Bacteriol. 182:2341-2344.
- Balcázar Q.J. 1993. Determinación de la existencia de un gen para una enterotoxina LT-like en *Salmonella gallinarum*. Tesis de Licenciatura. México, DF.: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.
- Barrow P.A., J.M. Simpson, M.A. Lovell & M.M. Binns. 1987. Contribution of *Salmonella gallinarum* large plasmid toward virulence in fowl typhoid. Infect. Immun. 55:388-392.
- Bäumler A., A. Gilde, R. Tsolis, A. Velden, B. Ahmer & F. Heffron. 1997. Contribution of horizontal genes transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operons during evolution of *Salmonella* serotypes. J. Bacteriol. 179:317-322.
- Beuzón C.R., K.E. Unsworth & D.W. Holden. 2001. In vivo genetic analysis indicates that PhoP-PhoQ and the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system contribute independently to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence. Infect. Immun. 69:7254-7261.
- Blanc-Potard A.B., F. Solomon, J. Kayser & E.A. Groisman. 1999. The SPI-3 pathogenicity of *Salmonella enterica*. J. Bacteriol. 181:998-1004.
- Buchmeier N.A. & F. Heffron. 1989. Intracellular survival of wild-type *Salmonella typhimurium* and macrophages-sensitive mutants in diverse populations of macrophages. Infect. Immun. 13:1-17.
- Brumell J.H., A.J. Perrin, D.L. Goosney & B.B. Finlay. 2002. Microbial pathogenesis News niches for *Salmonella*. Current Biol. 12:R15-R17.
- Chen L.M., S. Hobbie & J.E. Galán. 1996. Requirement of CDC42 for *Salmonella*-induced cytoskeletal and nuclear responses. Science. 274:2115-2118.
- Chen L.M., K. Kaniga & J.E. Galán. 1996. *Salmonella* spp. are cytotoxic for cultured macrophages. Mol. Microbiol. 21:1101-1115.
- Clark C.G., L.A. MacDonald, C.C. Ginocchio, J.E. Galán & R.P. Johnson. 1996. *S. typhimurium* InvA expression probed with a monoclonal antibody to the C-terminal peptide of InvA. FEMS Microbiol. Letters. 136:263-268.
- Clark M.A., B.H. Hirst & M.A. Jepson. 1998. Inoculum composition and *Salmonella* pathogenicity island 1 regulate M-cell invasion and epithelial destruction by *S. typhimurium*. Infect. Immun. 66:724-731.
- Clark M.A., K.A. Reed, J. Lodge, J. Stephen, B.H. Hirst & M.A. Jepson. 1996. Invasion of murine intestinal M cells by *Salmonella typhimurium* inv mutants severely deficient for invasion cultured cells. Infect. Immun. 64:4363-4368.
- Clarke R.C. & C.L. Gyles. 1993. *Salmonella*. In Gyles C.L. and C.O. Thoen editors. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals 2nd ed. Iowa State University Press. AMES: 133-153.
- Collazo C.M. & J.E. Galán. 1997. The invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium* directs the translocation of Sip proteins into the host cell. Mol. Microbiol. 24:747-756.
- Collazo C.M., M.K. Zierler & J.E. Galán. 1995. Functional analysis of *Salmonella typhimurium* invasion genes *invI* and *invJ* and identification of a target of the protein secretion apparatus encoded in the *inv* locus. Mol. Microbiol. 15:25-38.
- Cotter P.A. & V.J. DiRita. 2000. Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. Annu. Rev. Microbiol. 54:519-65.
- Deiwick J., T. Nikolaus, J.E. Shea, C. Gleeson, D.W. Holden & M. Hensel. 1998. Mutations in *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI2) genes affecting transcription of SPI1 genes and resistance to antimicrobial agents. J. Bacteriol. 180:4775-80.
- DeVinney R., O. Steele-Mortimer & B.B. Finlay. 2000. Phosphatases and kinases delivered to the host cell by bacterial pathogens. Trends Microbiol. 8:29-33.
- Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud. Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica, México D.F.:SSA, 1998:172, 266 y 454.
- Drecktrah D., L.A. Knodler & O. Steele-Mortimer. 2004. Modulation and utilization of host cell phosphoinositides by *Salmonella* spp. Infect. Immun. 72:4331-4335.
- Eckmann L., M.F. Kagnoff & J. Fierer. 1993. Epithelial cells secrete the chemokine IL8 in response to bacterial entry. Infect. Immun. 61:4569-4574.
- Edwards R.A., S. Dieter & M.R. Stanley. 2000. A role for *Salmonella fimbriae* in peritoneal infections. Proc. Natl. Acad. Sci. 97:1258-1262.
- Edwards R.A. & J. L. Puente. 1998. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. Trends. Microbiol. 6:282-287.
- Eichelberg K. & J. Galán. 1999. Differential regulation of *Salmonella typhimurium* type III secreted proteins by SPI-1 encoded transcriptional activators InvF and HilA. Infect Immun. 67:4099-4105.
- Eichelberg K., C.C. Ginocchio & J.E. Galán. 1994. Molecular and functional characterization of the *S. typhimurium* invasion genes *invB* and *invC*: homology of InvC to the FoF<sub>1</sub> ATPase family of proteins. J. Bacteriol. 176:4501-4510.
- Elsinghorst E.A., L.S. Baron & D.J. Kopecko. 1989. Penetration of human intestinal epithelial cells by *Salmonella* molecular cloning and expression of *Salmonella typhi* invasion determinants in *E. coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:5173-5177.
- Ernst R.K., T. Guina & S.I. Miller. 1989. How intracellular bacteria survive: surface modifications that promote resistance to host innate immune responses. JID. 179:S326-30.
- Figueroa Bossi N. & L. Bossi. 1999. Inducible prophages contribute to *Salmonella* virulence in mice. Mol. Microbiol. 33:167-176.

33. Figueroa O.M. 2003. Caracterización de la capacidad de invasión celular y citotoxicidad en macrófagos de *Salmonella gallinarum* cepa FV4-1. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, México.
34. Finlay B.B. & P. Cossart. 1997. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science*. 276:718-725.
35. Finlay B.B. & S. Falkow. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:136-169.
36. Finlay B.B., B. Gumbiner & S. Falkow. 1988. Penetration of *Salmonella* through a polarized Madin-Darby canine kidney epithelial cell monolayer. *J. Cell Biol.* 107:221-230.
37. Fu Y. & J.E. Galán. 1998. The *Salmonella typhimurium* tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cell and disrupts the actin cytoskeleton. *Mol. Microbiol.* 27:359-368.
38. Fu Y. & J.E. Galán. 1999. A *Salmonella* protein antagonizes Rac-1 and CDC42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature*. 401:293-297.
39. Galán, J.E. 1994. *Salmonella* entry into mammalian cells: different yet converging signal transduction pathways. *Trends. Cell. Biol.* 4:196-199.
40. Galán J.E. 1996. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol. Microbiol.* 20:263-271.
41. Galán J.E. 2001. *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17:53-86.
42. Galán J.E. & A. Collmer. 1999. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*. 284:1322-1328.
43. Galán J.E. & R. Curtiss III. 1989. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86:6383-6387.
44. Galán J.E. & R. Curtiss III. 1991. Distribution of the *invA*, -B, -C and -D genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. *Infect. Immun.* 59:2901-2908.
45. Galán J.E., C.C. Ginocchio & P. Costeas. 1992. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of InvA to members of a new protein family. *J. Bacteriol.* 174:4338-4349.
46. Galán J.E. & P.J. Sansonetti. 1996. Molecular and cellular bases of *Salmonella* and *Shigella* interactions with host cells. In Neidhardt F.C. et. al. eds. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. ASM Press. 2757-2799.
47. Galyov E.E., M.W. Wood, R. Rosqvist, P.B. Mullan, P.R. Watson, S. Hedges & T.S. Wallis. 1997. A secreted effector protein of *Salmonella dublin* is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa. *Mol. Microbiol.* 25:903-912.
48. García del Portillo F. 2001. *Salmonella* intracellular proliferation where, when and how? *Microbes and infection*. 3:11305-1311.
49. García del Portillo F & B.B. Finlay. 1995. Targeting of *Salmonella typhimurium* to vesicles containing lysosomal membrane glycoprotein bypasses compartments with mannose 6-phosphate receptors. *J. Cell. Biol.* 129:81-97.
50. García del Portillo F., M.B. Zwick, K.Y. Leung & B.B. Finlay. 1993. *Salmonella* induces the formation of filamentous structure containing lysosomal membrane glycoproteins in epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:10544-10548.
51. Gewirtz A.T., A.M. Siber, J.L. Madara & B.A. McCormick. 1999. Orchestration of neutrophil movement by intestinal epithelial cells in response to *Salmonella typhimurium* can be uncoupled from bacterial internalization. *Infect. Immun.* 67:608-617.
52. Giannella R.A., O. Washington, P. Gemski. & S.B. Formal. 1973. Invasion of HeLa cells by *S. typhimurium*: a model for study of invasiveness of *Salmonella*. *J. Infect Dis.* 128:69-75.
53. Ginocchio C.C. & J.E. Galán. 1995. Functional conservation among members of the *S. typhimurium* InvA family of proteins. *Infect. Immun.* 63:729-732.
54. Ginocchio C.C., S.B. Olmsted, C.L. Wells & J.E. Galan. 1994. Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on *Salmonella typhimurium*. *Cell*. 76:717-724.
55. Goosney D.L., D.G. Knoechel & B.B. Finlay. 1999. Enteropathogenic *E. coli*, *Salmonella* and *Shigella*: Master of host cell cytoskeletal exploitation. *Emerging Infectious Diseases*. 5:216-223.
56. Gordon R.F. Enfermedades de las aves. El Manual Moderno. Méjico, D.F 1980.
57. Gorvel J.E. & S. Méresse. 2001. Maturation steps of the *Salmonella*-containing vacuole. *Microbes and infection*. 3:1299-1303.
58. Groisman E.A. & H. Ochman. 1997. How *Salmonella* became a pathogen. *Trends. Microbiol.* 5:343-348.
59. Groisman E.A. & H. Ochman. 2000. The path to *Salmonella*. *Features*. 66:21-27.
60. Guiney D.G. 1997. Perspectives series: Host/pathogen interactions. Regulation of bacterial virulence genes expression by the host environment. *J. Clin. Invest.* 99:565-568.
61. Gutiérrez-Cogco L., V.E. Montiel, P.P. Aguilera & A.M. González. 2000. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud Pública de México*. 42:490-495.
62. Hacker J. & J.B. Kaper. 2000. Pathogenicity island and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:641-679.
63. Halsey T.A., A. Vazquez-Torres, D.J. Gravdahl, F.C. Fang & S.J. Libby. 2004. The ferritin-like Dps protein is required for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium oxidative stress resistance and virulence. *Infect Immun.* 72:1155-1158.
64. Hansen-Wester I., B. Stecher & M. Hensel. 2002. Analyses of the evolutionary distribution of *Salmonella* translocated effectors. *Infect. Immun.* 70:1619-1622.
65. Hardt W.D., L.M. Chen, K.E. Schuebel, X.E. Bustelo & J.E. Galán. 1998. *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell*. 93:815-826.
66. Hardt W.D., U. Henning & J.E. Galán. 1998. A substrate of the centisoma 63 type III protein secretion system of *Salmonella typhimurium* is encoded by cryptic bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95:2574-79.
67. Hensel M., et. al. 1997. Functional analysis of *ssaJ* and the *ssaK/U* operon, 13 genes encoding components of the type III secretion apparatus of *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol. Microbiol.* 24:155-167.
68. Hensel M. et. al. 1998. Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol. Microbiol.* 30:163-174.
69. Hernández L.D., K. Hueffer, M.R. Wenk & J.E. Galán. 2004. *Salmonella* modulates vesicular traffic by altering phosphoinositide metabolism. *Science*. 304:1805-1807.
70. Hersh D., D.M. Monack, M.R. Smith, N. Ghori, S. Falkow & A. Zychlinsky. 1999. The *Salmonella* invasion SipB induces macrophages apoptosis by binding to caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:2396-2401.
71. Hobbie S., L.M. Chen, R.J. Davis & J.E. Galán. 1997. Involvement of the mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal cells. *J. Immunol.* 159:5550-5559.
72. Hong K.H. & V.L. Miller. 1998. Identification of a novel *Salmonella* invasion locus homologous to *Shigella ipgDE*. *J. Bacteriol.* 180:1793-1802.
73. Humphries A.D., S.M. Townsend, R.A. Kingsley, T.L. Nicholson, R.M. Tsolis & A.J. Bäumler. 2001. Role of fimbriae as antigens and

- intestinal colonization factors of *Salmonella* serovars. FEMS Microbiol. Lett. 201:121-125.
74. Hultgren S.J., C.H. Jones & S. Normark. Bacterial adhesion and their assembly. In Neidhardt F.C. et. al. eds. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. ASM Press 1996:2730-2756.
  75. Jensen V.B., J.T. Harty & B. Jones. 1998. Interactions of the invasive pathogens *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and *Shigella flexneri* with M cells and murine Peyer's patches. Infect. Immun. 66:3758-3766.
  76. Jepson M.A. & M.A. Clark. 1998. Studying M cell and their role in infection. Trend. Microbiol. 6:359-365.
  77. Jones B.D. 1996. Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. Annu. Rev. Immunol. 14:533-561.
  78. Jones B.D. & S. Falkow. 1994. Identification and characterization of a *S. typhimurium* oxygen-regulated gene required for bacterial internalization. Infect. Immun. 62:3745-3752.
  79. Jones M.A., M.W. Wood, P.B. Mullan, P.R. Watson, T.S. Wallis & E.E. Galyov. 1998. Secreted effector proteins *Salmonella dublin* act in concert to induce enteritis. Infect. Immun. 66:5799-5804.
  80. Jung H.C., et. al. 1995. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion J. Clin. Invest. 95:55-65.
  81. Kaniga K., J.C. Bossio & J.E. Galán. 1994. The *S. typhimurium* invasion genes *invF* and *invG* encode homologues of the AraC and PulD family of proteins. Mol. Microbiol. 13:555-68.
  82. Kaniga K., J. Uralil, J.A. Bliska & J.E. Galán. 1996. Secreted protein tyrosine phosphates with modular effectors domains in the bacterial pathogen *Salmonella*. Mol. Microbiol. 21:633-641.
  83. Kernéis S., A. Bogdanova, J.P. Kraehenbuhl & E. Pringault. 1997. Conversion by Peyer's Patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. Science. 277:949-952.
  84. Klein J.R., T.F. Fahlen & B.D. Jones. 2000. Transcriptional organization and function of invasion genes within *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 1, including the *prgH*, *prgI*, *prgJ*, *prgK*, *orgA*, *orgB* and *orgC* genes. Infect. Immun. 68:3368-3376.
  85. Klein J.R. & B.D. Jones. 2001. *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded proteins SseC and SseD are essential for virulence and are substrates of the type III secretion system. Infect. Immun. 69:737-743.
  86. Knodler L.A., J. Celli, W.D. Hard, B.A. Vallance, C. Yip & B.B. Finlay. 2002. *Salmonella* effectors within a single pathogenicity island are differentially expressed and translocated by separate type III secretion systems. Mol. Microbiol. 43:1089-1103.
  87. Kubori T. et. al. 1998. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. Science. 280:602-605.
  88. Kubori T., A. Sukhan, S.I. Aizawa & J.E. Galán. 2000. Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. Microbiol. 97:10225-10230.
  89. Kusters J., G. Mulders-Kremers, C. Doornik & B. Zeijst. 1993. Effects of multiplicity of infection, bacterial protein synthesis, and growth phase on adhesion to and invasion. Infect. Immun. 61:5013-5002.
  90. Lee A.K., C.S. Detweiler & S. Falkow. 2000. Omp regulates the two-component system SsrA-SsrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. J. Bacteriol. 182:771-781.
  91. Lee C.A. 1997. Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eukaryotic cells? Trend. Microbiol. 5:148-155.
  92. Low D., B. Braten & M. Woude. 1996. Fimbriae. In Neidhardt, FC et. al., editores. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. ASM Press. 146-157.
  93. Lucas R.L. & C.A. Lee. 2000. Unravelling the mysteries of virulence gene regulation in *Salmonella typhimurium*. Mol. Microbiol. 36:1024-33.
  94. Lucas R.L., C.P. Lostroh, C.C. Diruso, M.P. Spector, B.L. Waner & C.A. Lee. 2000. Multiple factors independently regulate hilA and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J. Bacteriol. 182:1872-1882.
  95. Lundberg U., U. Vinatzer, D. Berdnik, A. Gabain & M. Baccarini. 1999. Growth phase-regulated induction of *Salmonella*-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes. J Bacteriol. 181:3433-37.
  96. Marcus S.L., J.H. Brumell, C.G. Pfeifer & B.B. Finlay. 2000. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. Microbes and infection. 2:145-156.
  97. McClelland M., K.E. Sanderson, S.W. Clifton, P. Latreille, S. Porwollik, A. Sabo, R. Meyer, T. Bieri, P. Ozersky, M. McLellan, C.R. Harkins, C.H. Wang, C.H. Nguyen, A. Berghoff, G. Elliott, S. Kohlberg, C. Strong, F. Du, J. Carter, C. Kremizki, D. Layman, S. Leonard, H. Sun, L. Fulton, W. Nash, T. Miner, P. Minx, K. Delehaunty, C. Fronick, V. Magrini, M. Nhan, W. Warrer, L. Florea, J. Spieth & R.K. Wilson. 2004. Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid. Nature Genetics. 1-7.
  98. McClelland M., K.E. Sanderson, J. Spieth, S.W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston & R.K. Wilson. 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. Nature 413:852-856.
  99. McCormick B.A., C.A. Parkos, S.P. Colgan, D.K. Carnes & J.L. Madara. 1998. Apical secretion of a pathogen-elicited epithelial chemoattractant activity in response to surface colonization of intestinal epithelial by *Salmonella typhimurium*. J. Immunol. 160:455-466.
  100. Mérésse S., O. Steele-Mortimer, B.B. Finlay & J.P. Gorvel. 1999. The rab7 GTPase controls the maturation of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles in HeLa cells. EMBO J. 18:4394-4403.
  101. Miao E.A., et. al. 1999. *Salmonella typhimurium* leucine-rich repeat proteins are targeted to the SPI1 and SPI2 type III secretion systems. Mol. Microbiol. 34:850-864.
  102. Mirol S., et. al. 2001. *Salmonella* host cell invasion emerged by acquisition of a mosaic of separate genetic elements, including *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1), SPI5 and sopE2. J. Bacteriol. 183: 2348-58.
  103. Monack D.M., D. Hersh, N. Ghori, D. Bouley, A. Zychlinsky & S. Falkow. 2000. *Salmonella* exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid model. J. Exp Med. 192:249-258.
  104. Monack D.M., W.W. Navarre & S. Falkow. 2001. *Salmonella*-induced macrophage death: the role of caspase-1 in death and inflammation. Microb. Infect. 3:1201-1212.
  105. Monack D.M., D. Raupach, A. Hromockyj & S. Falkow. 1996. *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:9833-9838.
  106. Mukherjee K., S.A. Siddiqi, S. Hashim, M. Raje, S.K. Basu & A. Mukhopadhyay. 2000. Live *Salmonella* recruits NSF on phagosomal membrane and promotes fusion with early endosome. J. Cell Biol. 148:741-753.
  107. Murray R.A. & C.A. Lee. 2000. Invasion genes are not required for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to breach the intestinal epithelium: evidence that *Salmonella* pathogenicity island 1 has alternative functions during infection. Infect. Immun. 68:5050-5055.
  108. Ochman H. & E.A. Groisman. 1996. Distribution of Pathogenicity Island in *Salmonella* spp. Infect. Immun. 64:5410-5412.
  109. Ochman H., F.C. Soncini, F. Solomon & E.A. Groisman. 1996. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:7800-7804.

- 110.Ohl M.E. & S.I. Miller. 2001. *Salmonella*: A model for bacterial pathogenesis. Annu. Rev. Med. 52:259-74.
- 111.Parkhill J., G. Dougan, K.D. James, N.R. Thomson, D. Pickard, J. Wain, C. Churcher, K.L. Mungall, S.D. Bentley, M.T.G. Holden, M. Sebaihia, S. Baker, D. Basham, K. Brooks, T. Chillingworth, P. Connerton, A. Cronin, P. Davis, R.M. Davies, L. Dowd, N. White, J. Farrar, T. Feltwell, N. Hamlin, A. Haque, T.T. Hien, S. Holroyd, K. Jagels, A. Krogh, T.S. Larsen, S. Leather, S. Moule, P. O'Gaora, C. Parry, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead & B.G. Barrell. 2001. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. Nature 413:848-852.
- 112.Penheiter K.L., N. Mathur, D. Giles, T. Fahien & B.D. Jones. 1997. Non-invasive *Salmonella typhimurium* mutants are avirulent because of an inability to enter and destroy M cells of ileal Peyer's patches. Mol. Microbiol. 24:697-709.
- 113.Rabsch W., H.L. Andrews, R.A. Kingsley, R. Prager, H. Tschaepé, L.G. Adams & A.J. Bäumler. 2002. *Salmonella enterica* serotype typhimurium and its host-adapted variants. Infect. Immun. 70: 2249-2255.
- 114.Rakeman J.L., H.R. Bonifield & S.I. Miller. 1999. A HilA-independent pathway to *S. typhimurium* invasion gene transcription. J. Bacteriol. 181:3096-3104.
- 115.Rappl C., J. Deiwick & M. Hensel. 2003. Acid pH is required for the functional assembly of the type III secretion system encoded by salmonella pathogenicity island 2. FEMS Microbiol. Lett. 226:363-372.
- 116.Rizo Q.N. 1987. Cómo se integra la avicultura Nacional. Memorias del VII curso sobre el control y erradicación de la Tifoidea Aviar. Monterrey Nuevo León. México. Comisión Permanente para el Control y Erradicación de la Pulorosis y Tifoidea Aviar. México, D.F.2-12.
- 117.Ruschkowski S., I. Rosenshine, & B. B. Finlay. 1992. *Salmonella typhimurium* induces an inositol phosphate flux in infected epithelial cells. FEMS Microbiol. Lett. 74:121-126.
- 118.Salyers A.A. & D.P. Whitt. 1994. Bacterial Pathogenesis. A molecular Approach. American Society for Microbiology Press. Washington, DC.
- 119.Santos R.L., R.M. Tsolis, A.J. Bäumler, R. Smith III & L.G. Adams. 2001. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium induces cell death in bovine monocyte-derived macrophages by early *sip-B* dependent and delayed *sip-B* independent mechanisms. Infect. Immun. 69:2293-2301.
- 120.Shea J.E., M. Hensel, C. Gleeson & D.W. Holden. 1996. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:2593-2597.
- 121.Siebers A. & B.B. Finlay. 1996. M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. Trend. Microbiol. 4: 22-28.
- 122.Sirard J.C., F. Niedergang & J.P. Kraehenbuhl. 1999. Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines. Immunol. Rev. 171:5-26.
- 123.Sjöbring U., G. Pohl & A. Olsen. 1994. Plasminogen, absorbed by *E. coli* expressing curli by *Salmonella enteritidis* expressing thin aggregative fimbriae, can be activated by simultaneously captured tissue-type plasminogen activator (t-PA). Mol. Microbiol. 14: 443-452.
- 124.Soto, G.E. & S.J. Hultgren. 1999. Bacterial Adhesins: Common themes and variations in arquitecture and assembly. J. Bacteriol. 181: 1059-1071.
- 125.Steele-Mortimer O., L.A. Knodler, S.L. Marcus, M.P. Scheid, B. Goth, C.G. Pfeifer, V. Duronio & B.B. Finlay. 2000. Activation of Akt/protein kinase B in epithelial cells by *Salmonella typhimurium* effector sigD. J. Biol. Chem. 275:37718-37724.
- 126.Stender S., A. Friebel, S. Linder, M. Rohde, S. Mirol & W.D. Hard. 2000. Identification of SopE2 from *S. typhimurium*, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell. Mol. Microbiol. 36:1206-21.
- 127.Straaten T., et. al. 2001. Novel *Salmonella enterica* serovar Typhimurium protein that is indispensable for virulence and intracellular replication. Infect. Immun. 69:7413-7418.
- 128.Sukhan A. 2000. The invasion-associated type III secretion system of *Salmonella typhimurium*: common and unique features. CMLS. 57:1033-1049.
- 129.Townsend S.M., N.E. Kramer, R. Edwards, S. Baker, S.M. Hamlin, M. Simmonds, K. Stevens, S. Maloy, J. Parkhill, G. Dougan & A. Bäumler. *Salmonella enterica* serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. 2001. Infect. Immun. 69:2894-2901.
- 130.Uchiya K., M.A Barbieri., K. Funato, A.H. Shah, P.D. Stahl & E.A. Groisman. 1999. A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. EMBO J. 18:3924-3999.
- 131.Uchiya K., E.A. Groisman & T. Nikai. 2004. Involvement of *Salmonella* pathogenicity island 2 in the up-regulation of interleukin-10 expression in macrophages:role of protein kinase A signal pathway. Infect. Immun. 72:1964-1973.
- 132.Urquiza O. 1995. Purificación y caracterización parcial de proteínas con actividad enterotóxica tipo CT de *Salmonella gallinarum*. Tesis de Maestría. México, DF.: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.
- 133.Valvidia R.H. & S. Falkow. 1997. Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. Science. 277:2007-2011.
- 134.Vázquez N.J. 1995. Preparaciones de Proteínas de la Membrana externa de *Salmonella gallinarum* para el diagnóstico de la Tifoidea Aviar. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, México.
- 135.Vázquez N.J., V.Y López., G.F. Suárez y A. Verdugo-Rodríguez. 1999. Clonación y expresión de los genes que codifican para una entetotoxina similar a LT de *Salmonella gallinarum*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología. 19: S63 Congreso Anual de la AMIMC.
- 136.Vazquez-Torres A. & F. Fang. 2001. *Salmonella* evasión of the NADPH phagocyte oxidase. Microb. Infec. 3:1313-1320.
- 137.Vázquez-Torres A., J. Jones-Carson, A.J. Bäumler, S. Falkow, R. Valvidia, W. Brown, M. Le, R. Berggren, W.T. Parks & F.C. Fang. 1999. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. Nature. 401:804-808.
- 138.Vazquez-Torres A., Y. Xu, J. Jones-Carson, D.W. Holden, S.M. Lucia, M.C. Dinauer, P. Mastroeni & F.C. Fang. 2000. *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NAPH oxidase. Science. 287:1655-1658.
- 139.Velden A.W.M., S.W. Lindgren, M.J. Worley & F. Heffron. 2000. *Salmonella* pathogenicity island 1-independent induction of apoptosis in infected macrophages by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. Infect Immun. 68:5702-5709.
- 140.Verdugo-Rodríguez A., J. Balcázar, O. Urquiza, F. Suárez, L.A. Quintana, E. Calva & Y. López -Vidal. 1994. Partial characterization of a *eltA*-like gene. Bangkok, Thailand. 65<sup>th</sup>. Second Asia-Pacific Symposium on Typhoid Fever and other Salmonellosis. Bangkok, Thailand.
- 141.Wallis T.S., M. Wood, P. Watson, S. Paulin, M. Jones & E. Galyov. 1999. Sips, Sops and SPIs but not stn influence *Salmonella* enteropathogenesis. Adv. Exp. Med. Biol. 473:275-280.
- 142.Watson P.R., E.E. Galyov, S.M. Paulin, P.W. Jones & T.S. Wallis. 1998. Mutation of *invH*, but not *str* reduces *Salmonella*-induced enteritis in cattle. Infect. Immun. 66:1432-1438.
- 143.Withanage G.S.K., P. Kaiser, P. Wigley, C. Powers, P. Mastroeni, H. Brooks, P. Barrow, A. Smith, D. Maskell & I. McConnell. 2004. Rapid expression of chemokines and proinflammatory cytokines in newly hatched chickens infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Infect. Immun. 72:2152-2159.
- 144.Wood M.W., M.A Jones., P.R. Watson, S. Hedges, T.S. Wallis & E.E. Galyov. 1998. Identificación de pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. Mol Microbiol. 29:883-891.
- 145.Zhang S., R.A. Kingsley, R.L. Santos, H. Andrews-Polymeris, M. Raffatellu, J. Figueiredo, J. Nunes, R.M. Tsolis, L.G. Adams & A.J.

- Bäumler. 2003. Molecular Pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium-induced diarrhea. Infect. Immun. 71:1-12
- 146.Zhang-Barber L., A.K. Turner & P.A. Barrow. 1999. Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. Vaccine. 17: 2538-2545.
- 147.Zhou D., M.S. Mooseker & J.E. Galán. 1999. Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. Science. 283:2092-2095.
- 148.Zierler M.K. & J.E. Galán. 1995. Contact with cultured epithelial cells stimulates secretion of *Salmonella typhimurium* invasion protein InvJ. Infect. Immun. 63:4024-4028.

Correspondence to:

**Inda Marcela Figueroa Ochoa**

Departamento de Microbiología e Inmunología.  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.  
Universidad Nacional Autónoma de México.  
Coyoacán, 04510, México, D.F.  
Tel: +52-55-56 22 58 96  
Fax: +52-55- 56 22 59 71;  
E-mail dain@prodigy.net.mx