



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría en Ciencias de la Salud y la Producción Animal**

---

---

**Papel de la cascada reguladora que controla la  
expresión de la Isla de Patogenicidad 1 (SP1-1) de *S.*  
*Typhimurium*, sobre la SPI-2 en el lumen intestinal de  
pollo**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS DE LA SALUD Y LA PRODUCCION ANIMAL  
PRESENTA:

**José de Jesús Gómez Chávez**

Tutora Principal:

**Dra. Luary Carolina Martínez Chavarría (FMVZ-UNAM)**

Comité Tutor:

**Dr. Juan Rios Miranda (IIBI-UNAM)**

**Dr. Gerardo Salas Garrido (FMVZ-UNAM)**

Ciudad Universitaria, CD, MX., Julio del 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Este trabajo se realizó en el laboratorio de Patología molecular del departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**Comité tutorial**

Dra. Luary C. Martínez Chavarría

Dr. Juan Miranda Ríos

Dr. Carlos Gerardo Salas Garrido

**Jurado de tesis**

Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo

Dra. Luary Carolina Martínez Chavarría

Dra. Mireya Juárez Ramírez

Dra. Cecilia Rosario Cortés

Dr. Rigoberto Hernández Castro

Para el desarrollo de este trabajo recibí una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (CVU:968054).

Este trabajo estuvo financiado por el proyecto IN217218 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) y el proyecto A1-S-17638 de Investigación en Ciencia Básica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

## **Agradecimientos**

Al Departamento de Patología de la FMVZ-UNAM por ser mi segunda casa durante casi tres años y que llevaré por siempre en mi mente.

A mi asesora, la Dra. Luary. Soy un afortunado por ser la mejor guía que he encontrado en mi vida. Gracias por cada palabra, cada enseñanza, cada artículo revisado, por la paciencia y sobre todo por la gran persona que ha sido conmigo desde el momento en que la conocí. Mi agradecimiento y estimación por siempre.

A la Dra. Mireya Juárez por todos esos largos días de trabajo en el laboratorio y ser mi segunda guía en este camino. Por confiar en mí y ser paciente en cada momento en que trabajamos. Gracias por tanto.

A mis compañeros del laboratorio, Hugo y Tatiana. Sin su compañía, amistad y trabajo no hubiera sido posible esto.

Al personal del departamento de Patología que contribuyó con su gran trabajo durante todo el proyecto. A Claudia Cortés (Claus), Jaime Eugenio Córdova, Maribel Nieto, Karen Guitareo y Virgilio Nava.

### **Dedicatoria**

A mi familia. Cuando estamos juntos, se llenan todos los sentidos, todo cobra dimensión correcta y se entiende completamente por qué la vida es valiosa.

## Lista de abreviaturas

°C	Grados Celsius
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
ATP	Adenosín trifosfato
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
dpi	Días posinoculación
hpi	Horas posinoculación
HRP	Peroxidasa de rábano
hrs	Horas
HyE	Hematoxilina y eosina
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolisacárido
min	Minutos
ml	Mililitro
ng	Nanogramo
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
pmol	Picomol
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
SCV	Vacuolas que contienen <i>Salmonella</i>
SIF	Filamentos inducidos por <i>Salmonella</i>
SIT	Túbulos inducidos por <i>Salmonella</i>
SPF	Libres de patógenos específicos
SPI	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i>
SST3	Sistema de secreción tipo 3
TA	Temperatura ambiente
TLR	Receptores tipo Toll
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
UFC	Unidades formadoras de colonias
µg	Microgramos
WT	Cepa silvestre
µl	Microlitro

## Índice

<b>1. Introducción</b>	
1.1 El género <i>Salmonella</i>	1
1.2 Sistemas de secreción tipo 3	3
1.3 Islas de patogenicidad de <i>Salmonella</i>	4
1.4 SPI-1	5
1.5 SPI-2	8
1.6 Patogenia de la infección por <i>Salmonella</i> Typhimurium	11
1.7 Regulación de las islas de patogenicidad 1 y 2 de <i>S. Typhimurium</i>	19
1.8 Regulación de la SPI-1	19
1.9 Regulación de la SPI-2	22
1.10 Regulación ambiental de las Islas de patogenicidad 1 y 2 de <i>S. Typhimurium</i>	25
1.11 Comunicación transcripcional entre la SPI-1 y SPI-2 de <i>S. Typhimurium</i>	26
1.12 Cascada genética que controla la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 de <i>S. Typhimurium</i>	27
<b>2. Justificación</b>	30
<b>3. Hipótesis</b>	30
<b>4. Objetivos</b>	30
4.1 Objetivos específicos	31
<b>5. Material y métodos</b>	32
5.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	32
5.2 Animales de experimentación	32
5.3 Infección en pollos	32
5.4 Estudio <i>post mortem</i> e histopatología	33
5.5 Determinación de las unidades formadoras de colonia (UFCs)	34
5.6 Inmunohistoquímica	34
5.7 Análisis de la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2	35
5.8 Análisis estadístico	36
<b>6. Resultados</b>	38
6.1 <i>Salmonella</i> Typhimurium requiere SirA, CsrB/C y HilD para una completa colonización intestinal y diseminación sistémica en pollos de un día de edad	38
6.2 Pollos de un día de edad inoculados con <i>S. Typhimurium</i> carente de SirA, CsrB/C o HilD muestran una disminución en la producción de lesiones en ciego e hígado	40
6.3 Las cepas de <i>Salmonella</i> Typhimurium carentes de SirA, CsrB/C o HilD, Están afectadas en la colonización intestinal y la diseminación sistémica en pollos de una semana de edad	46
6.4 <i>Salmonella</i> Typhimurium requiere de SirA, CsrB/C y HilD para producir lesiones en ciego e hígado en aves de una	

semana de edad .....	48
6.5 Detección inmunohistoquímica de <i>Salmonella</i> Typhimurium .....	54
6.6 La eliminación de SirA, CsrB/C y HilD afecta la colonización de <i>S. Typhimurium</i> en las primeras horas en el intestino de pollos de una semana de edad .....	57
6.7 SirA, CsrB y HilD actúan en cascada para controlar la expresión <i>in vivo</i> de <i>hilA</i> y <i>ssrB</i> en el lumen intestinal aviar .....	59
6.8 Los genes que controlan la expresión <i>in vivo</i> de la SPI-1 y 2 de <i>S. Typhimurium</i> van incrementando su expresión a través del tiempo y previo a la invasión intestinal .....	63
<b>7. Discusión</b> .....	66
<b>8. Conclusiones</b> .....	82
<b>9. Perspectivas</b> .....	82
<b>10. Referencias</b> .....	83
<b>11. Anexo</b> .....	103



## Figuras

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de un sistema de secreción tipo 3 (SST3) liberando proteínas efectoras a una célula blanco .....	3
<b>Figura 2.</b> Organización genética de la SPI-1 de <i>S. Typhimurium</i> .....	6
<b>Figura 3.</b> Organización genética de la SPI-2 de <i>S. Typhimurium</i> .....	9
<b>Figura 4.</b> Patogenia de la infección por <i>S. Typhimurium</i> .....	12
<b>Figura 5.</b> Cascada reguladora que controla la expresión de la SPI-1 y SPI-2 de <i>Salmonella Typhimurium</i> cuando crece en medio LB .....	28
<b>Figura 6.</b> Recuperación de <i>S. Typhimurium</i> WT SL1344 y las cepas $\Delta sirA$ , $\Delta csrB/C$ y $\Delta hilD$ de las muestras de ciego provenientes de la infección experimental oral de pollitos de un día de edad .....	39
<b>Figura 7.</b> Recuperación de <i>S. Typhimurium</i> WT SL1344 y las cepas $\Delta sirA$ , $\Delta csrB/C$ y $\Delta hilD$ de las muestras de hígado provenientes de la infección experimental oral de pollitos de un día de edad .....	40
<b>Figura 8.</b> Fotomicrografías de cortes de ciego teñidos con HyE de los pollos infectados con la cepa de <i>S. Typhimurium</i> WT SL1344 provenientes de la infección experimental oral de pollitos de un día de edad .....	42
<b>Figura 9.</b> Fotomicrografías de cortes de ciego teñidos con HyE de los pollos infectados con las cepas mutantes ( $\Delta sirA$ , $\Delta csrB/C$ y $\Delta hilD$ ) de <i>S. Typhimurium</i> WT SL1344 provenientes de la infección experimental oral de pollitos de un día de edad .....	43
<b>Figura 10.</b> Hallazgos histopatológicos de las muestras de ciego provenientes de la infección oral en pollitos de un día de edad con la cepa silvestre de <i>S. Typhimurium</i> WT SL1344 y las cepas mutantes $\Delta sirA$ , $\Delta csrB/C$ y $\Delta hilD$ .....	44
<b>Figura 11.</b> Fotomicrografías de cortes de hígados teñidos con HyE de los pollos infectados con la cepa <i>S. Typhimurium</i> WT SL1344 y las cepas mutantes $\Delta sirA$ , $\Delta csrB/C$ y $\Delta hilD$ . provenientes de la infección experimental oral de pollitos de un día de edad .....	45
<b>Figura 12.</b> Hallazgos histopatológicos de las muestras de hígado provenientes de la infección oral en pollitos de un día de edad con la cepa silvestre de <i>S. Typhimurium</i> WT SL1344 y las cepas mutantes $\Delta sirA$ , $\Delta csrB/C$ y $\Delta hilD$ .....	46

<b>Figura 13.</b> Recuperación de <i>S. Typhimurium</i> WT SL1344 y las cepas $\Delta sirA$ , $\Delta csrB/C$ y $\Delta hilD$ de las muestras de ciego provenientes de la infección experimental oral de pollitos de una semana de edad .....	47
<b>Figura 14.</b> Recuperación de <i>S. Typhimurium</i> WT SL1344 y las cepas $\Delta sirA$ , $\Delta csrB/C$ y $\Delta hilD$ de las muestras de hígado provenientes de la infección experimental oral de pollitos de una semana de edad ....	48
<b>Figura 15.</b> Fotomicrografías de cortes de ciego teñidos con HyE de los pollos infectados con la cepa de <i>S. Typhimurium</i> WT SL1344 provenientes de la infección experimental oral de pollitos de una semana de edad .....	50
<b>Figura 16.</b> Fotomicrografías de cortes de ciego teñidos con HyE de los pollos infectados con las cepas mutantes ( $\Delta sirA$ , $\Delta csrB/C$ y $\Delta hilD$ ) de <i>S. Typhimurium</i> WT SL1344 provenientes de la infección experimental oral de pollitos de una semana de edad .....	51
<b>Figura 17.</b> Hallazgos histopatológicos de las muestras de ciego provenientes de la infección oral en pollitos de una semana de edad con la cepa silvestre de <i>S. Typhimurium</i> WT SL1344 y las cepas mutantes $\Delta sirA$ , $\Delta csrB/C$ y $\Delta hilD$ .....	52
<b>Figura 18.</b> Fotomicrografías de cortes de hígados teñidos con HyE de los pollos infectados con la cepa <i>S. Typhimurium</i> WT SL1344 y las cepas mutantes $\Delta sirA$ , $\Delta csrB/C$ y $\Delta hilD$ provenientes de la infección experimental oral de pollitos de una semana de edad .....	53
<b>Figura 19.</b> Hallazgos histopatológicos de las muestras de hígado provenientes de la infección oral en pollitos de una semana de edad con la cepa silvestre de <i>S. Typhimurium</i> WT SL1344 y las cepas mutantes $\Delta sirA$ , $\Delta csrB/C$ y $\Delta hilD$ .....	54
<b>Figura 20.</b> Detección de <i>S. Typhimurium</i> mediante inmunohistoquímica en muestras de ciego provenientes de la inoculación oral en el modelo aviar con la cepa WT de <i>S. Typhimurium</i> SL1344 .....	56
<b>Figura 21.</b> Detección de <i>S. Typhimurium</i> mediante inmunohistoquímica en muestras de ciego provenientes de la inoculación oral en el modelo aviar con las cepas $\Delta sirA$ , $\Delta csrB/C$ y $\Delta hilD$ de <i>S. Typhimurium</i> SL1344 .....	57

<b>Figura 22.</b> Recuperación de <i>S. Typhimurium</i> WT SL1344 y las cepas $\Delta sirA$ , $\Delta csrB/C$ y $\Delta hilD$ de las muestras de hígado provenientes de la infección experimental oral de pollitos de una semana de edad .....	59
<b>Figura 23.</b> Expresión relativa del mRNA de <i>sirA</i> , <i>csrB</i> , <i>hilD</i> , <i>hilA</i> y <i>ssrB</i> usando RNA bacteriano extraído del contenido cecal de pollos infectados a la semana de edad con una cepa WT y una mutante $\Delta sirA$ de <i>S. Typhimurium</i> .....	61
<b>Figura 24.</b> Expresión relativa del mRNA de <i>sirA</i> , <i>csrB</i> , <i>hilD</i> <i>hilA</i> y <i>ssrB</i> usando RNA bacteriano extraído del contenido cecal de pollos infectados a la semana de edad con una cepa WT y una mutante $\Delta csrB/C$ de <i>S. Typhimurium</i> .....	62
<b>Figura 25.</b> Expresión relativa del mRNA de <i>sirA</i> , <i>csrB</i> , <i>hilD</i> <i>hilA</i> y <i>ssrB</i> usando RNA bacteriano extraído del contenido cecal de pollos infectados a la semana de edad con una cepa WT SL1344 y una mutante $\Delta hilD$ de <i>S. Typhimurium</i> .....	63
<b>Figura 26.</b> Cinética de la expresión de los genes <i>sirA</i> , <i>csrB</i> , <i>hilD</i> , <i>ssrB</i> y <i>hilA</i> usando RNA bacteriano extraído del contenido cecal de pollos infectados a la semana de edad con la cepa WT SL1344 .....	65
<b>Figura 27.</b> Cascada conformada por SirA, CsrB/C y HilD de <i>S. Typhimurium</i> que controla <i>in vivo</i> la expresión de <i>hilA</i> y <i>ssrB</i> y previo a la invasión intestinal .....	80

## Tablas

<b>Tabla 1.</b> Cepas utilizadas en este trabajo .....	36
<b>Tabla 2.</b> Oligonucleótidos empleados para los ensayos de PCR tiempo real .....	37

## Resumen

*Salmonella* Typhimurium es un patógeno transmitido por alimentos que infecta a una amplia gama de hospedadores, incluido el ser humano. Para invadir a las células intestinales, la bacteria requiere las proteínas codificadas en la isla de patogenicidad 1 (SPI-1) (SPI de *Salmonella* Pathogenicity Islands), y para sobrevivir y proliferar intracelularmente requiere las proteínas codificadas en la SPI-2. Cuando *Salmonella* crece en medio LB, el sistema de dos componentes BarA/SirA induce la expresión de dos pequeños ARN, CsrB y CsrC, que, a su vez, regulan positivamente la expresión del regulador HilD, codificado en la SPI-1. HilD activa, induce la expresión de HilA y SsrB, reguladores centrales de SPI-1 y SPI-2, respectivamente y, en consecuencia, del resto de los genes de ambas islas.

Para evaluar el papel *in vivo* de los genes que conforman esta cascada, inoculamos pollos de un día y una semana de edad con mutantes  $\Delta sirA$ ,  $\Delta csrB/C$  y  $\Delta hilD$ . En los pollos de un día de edad, la determinación de UFCs mostró atenuación significativa en la colonización intestinal a las 24, 48 y 72 horas después de la inoculación oral con las tres mutantes en comparación con la cepa silvestre (WT). En aves de una semana de edad, la colonización intestinal fue atenuada a partir de los 3 días posinoculación con las cepas mutantes. Al evaluar la diseminación hepática en aves de un día de edad, las cepas mutantes sólo se encontraron a las 24 hrs posinoculación, mientras que, en aves de una semana de edad, no se hallaron bacterias en hígado, a diferencia de la cepa WT.

La evaluación histopatológica de pollos infectados al día y a la semana de edad con la cepa WT mostró lesiones en hígado y en ciego. En contraste, los hallazgos patológicos en ciego e hígado disminuyeron o estuvieron ausentes, en pollos infectados con cepas mutantes.

Para determinar si estos genes funcionan en cascada *in vivo* y antes de la invasión intestinal, analizamos la expresión de *hilA*, *ssrAB*, *hilD*, *csrB* y *sirA*, en el contenido cecal de pollos infectados a la semana de edad con las cepas WT,  $\Delta sirA$ ,  $\Delta csrB/C$  y  $\Delta hilD$  a los 120 min posinoculación. La expresión de *hilA* y *ssrB*, pero no de *csrB* y *sirA*, disminuyó en ausencia de *hilD*. La expresión de *hilD*, *hilA* y *ssrB*, pero no de *sirA*, disminuyó en ausencia de *csrB/csrC*. Finalmente, en ausencia de SirA, se redujo la expresión de todos los genes. Estos hallazgos demostraron que SirA, CsrB/CsrC y HilD se encuentran formando una cascada *in vivo*, para controlar la expresión de *hilA* y *ssrB*.

Nuestros hallazgos demuestran que esta cascada reguladora compuesta por SirA, CsrB/C y HilD se activa *in vivo* cuando *S. Typhimurium* está en el lumen intestinal y controla la expresión de HilA y SsrB antes de la invasión intestinal. Entonces, es posible que la inducción intraluminal del regulador SsrB permita a *Salmonella* iniciar una transición al ambiente intracelular hostil y coordinar de manera óptima los mecanismos de supervivencia y proliferación.

## 1. Introducción

### 1.1 El género *Salmonella*

El género bacteriano *Salmonella* comprende importantes patógenos transmitidos por alimentos que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Está constituido por bacilos Gram negativos ampliamente difundidos en el mundo, cuyo hábitat predominante es el tracto intestinal de una amplia variedad de animales (1). Este género está compuesto por dos especies, *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica* (2). *S. bongori* comprende 22 serotipos asociados principalmente con animales de sangre fría y no ha sido profundamente estudiada debido a que no es un patógeno frecuente en infecciones en humanos. Por su parte, *Salmonella enterica* se divide en 6 subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI). La subespecie *enterica* es de especial interés ya que comprende serovares que infectan a una amplia gama de hospedadores mamíferos, incluidos los humanos, causando así enfermedades gastrointestinales y sistémicas (2, 3).

Respecto al rango de hospedadores, las cepas de *Salmonella enterica* pueden dividirse en dos clases: específicas y generales. Las primeras son aquellas que afectan solo a una especie, como *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) y *Salmonella enterica* serovar Paratyphi (*S. Paratyphi*) en el humano (4, 5), *Salmonella enterica* serovar Gallinarum (*S. Gallinarum*) y *Salmonella enterica* serovar Pullorum (*S. Pullorum*) en aves o *Salmonella enterica* serovar Dublin (*S. Dublin*) en bovinos. Por su parte, las cepas generales afectan a un rango amplio de hospedadores, incluidos los humanos, y provocan las llamadas

salmonelosis no tifoideas. Las más frecuentes son *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) y *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) (6). Estas causan enfermedades gastrointestinales caracterizadas por inflamación intestinal localizada, generalmente autolimitante. Para la salmonelosis no tifoidea se estiman alrededor de 93.8 millones de casos y 155,000 muertes cada año (7).

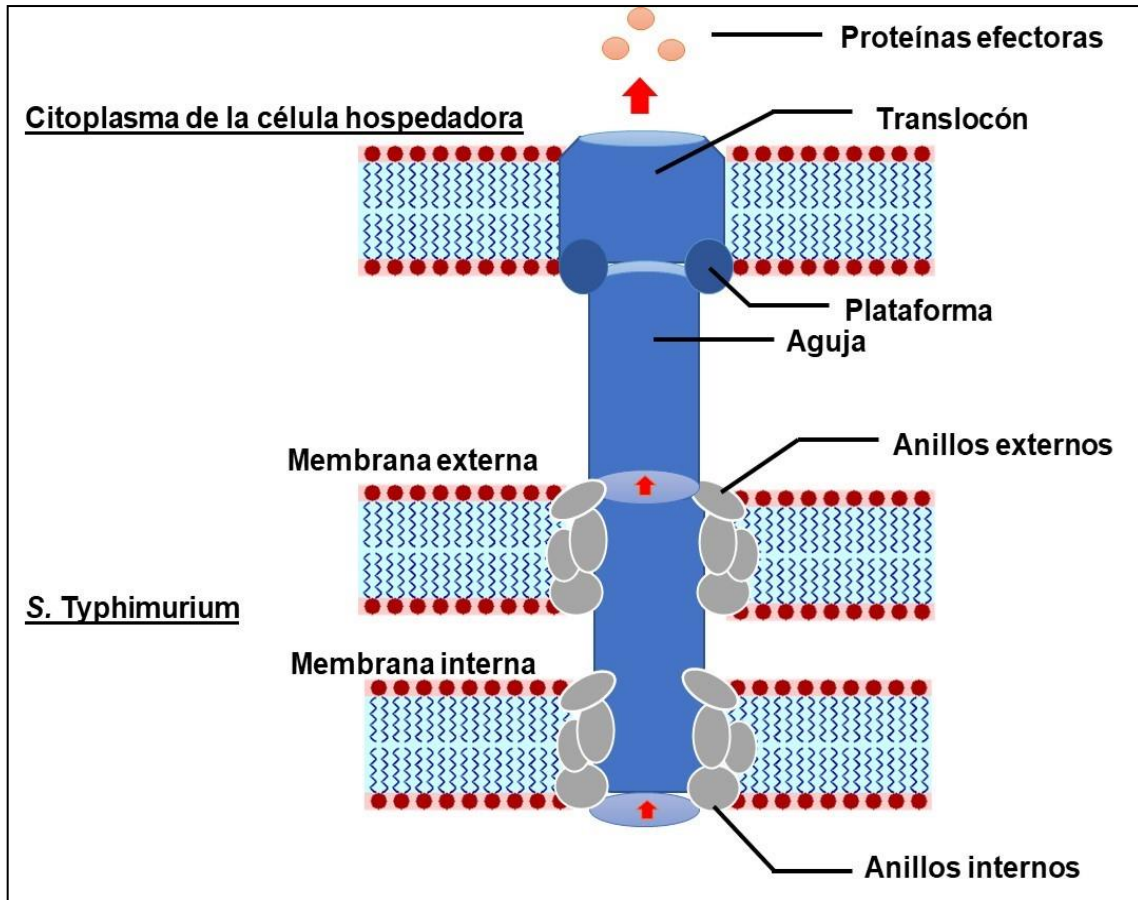
Uno de los serovares de mayor interés para los investigadores es *S. Typhimurium*. En seres humanos generalmente es transmitido por consumo de alimentos de origen animal y agua contaminados, por lo que es una causa importante de gastroenteritis y enfermedades con síntomas sistémicos (8). El consumo de carne de aves de corral contaminada se ha identificado como un factor importante para su transmisión a los seres humanos (9, 10). En México, tan solo en el año 2021 reportaron 42, 111 casos de salmonelosis no tifoidea (11).

La gravedad de una infección por *Salmonella* depende de ciertos factores como el serotipo, el estado inmunológico del hospedador, así como la virulencia de la bacteria, que es determinada por los llamados factores de virulencia. Entre ellos, se encuentran las fimbrias que juegan un papel importante en la adhesión a las células epiteliales, además que han demostrado desempeñar un papel importante en la formación de biopelículas, y colonización en las células del hospedador (12). Otro factor importante es el lipopolisacárido (LPS), un componente estructural de la membrana externa que tiene un rol importante en las interacciones hospedador-patógeno al ser un fuerte inductor de la respuesta

inmune innata ya que es reconocido por los receptores tipo Toll (TLR) de las células del hospedador (13, 14). Además, *Salmonella* sintetiza un sistema de secreción tipo 3 (SST3), un complejo proteico que transloca proteínas efectoras a las células y que le ayuda a infectar a las células (15).

### **1.2 Sistemas de secreción tipo 3**

Muchos serotipos patógenos de *Salmonella* han desarrollado nanomáquinas complejas que les confieren la capacidad de translocar proteínas efectoras específicas en el citoplasma de las células eucariotas. El SST3 es un sistema multiproteico altamente coordinado que consiste en proteínas estructurales que se ensamblan para formar el inyectisoma (16), el cual está formado por una base cilíndrica de anillos múltiples que se ancla a la membrana bacteriana, una aguja que se proyecta extracelularmente, y un translocón que funciona como conducto de paso para las proteínas efectoras (Fig. 1). La translocación de éstas al citoplasma de las células hospedadoras está impulsada por ATP (17, 18). Una vez traslocadas, son capaces de modificar diversas rutas de transducción de señales e inducir rearrreglos del citoesqueleto en las células hospedadoras (19).



**Figura 1.** Representación esquemática de un sistema de secreción tipo 3 (SST3) liberando proteínas efectoras a una célula blanco.

El SST3 es exclusivo de las bacterias Gram negativas; en *Salmonella* está codificado en regiones particulares del genoma conocidas como islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI, por sus siglas en inglés) (20, 21, 22). Esta bacteria posee dos SST3, cada uno codificado en una isla de patogenicidad diferente.

### 1.3 Islas de Patogenicidad de *Salmonella*

Las islas genómicas son regiones del genoma bacteriano adquiridas por transferencia horizontal involucradas en funciones como absorción de nutrientes,



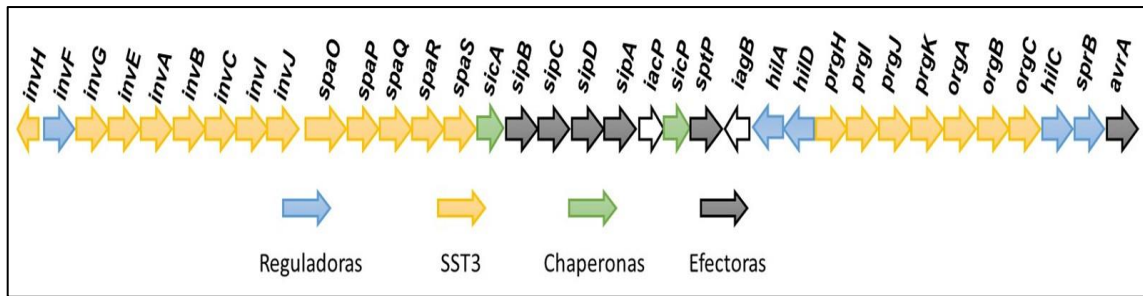
resistencia a antibióticos, adherencia a superficies y producción de factores de virulencia (23, 24). Tienen características generales que las pueden diferenciar del resto de los genes ancestrales, como son capacidad de recombinarse debido a la presencia de una enzima integrasa, asociación con genes de tRNA, la presencia de secuencias repetidas en ambos extremos (flanqueantes) (23) y un contenido de G-C que es menor al de la secuencia de ADN circundante.

Las islas de patogenicidad de *Salmonella* son un ejemplo de estas regiones que contienen genes que codifican una variedad de factores de virulencia (23). En el caso específico de *Salmonella*, estas islas tienen un contenido de G-C menor (entre 37% y 47%) al del resto del genoma (52%) (25).

Se han descubierto al menos 21 islas de patogenicidad en las distintas cepas de *Salmonella*, principalmente *S. Typhi* y *S. Typhimurium*. Las dos islas más estudiadas son la SPI-1 y SPI2; ambas codifican un SST3, proteínas efectoras, chaperonas y sus propias proteínas reguladoras (26).

#### **1.4 SPI-1**

La adquisición horizontal de esta isla fue un suceso clave en la evolución de *Salmonella*, que ocurrió después de la divergencia con el género *Escherichia* (27). Localizada en el centisoma 63 de *S. Typhimurium* y compuesta por 39 genes, la isla de patogenicidad 1 (SPI-1) contribuye crucialmente en la infección, ya que es necesaria para la invasión de células epiteliales del hospedador, por lo que promueve la colonización intestinal y la enteritis (27, 28). En la SPI-1 están codificadas las proteínas estructurales del SST3, proteínas efectoras, reguladoras y chaperonas (Fig. 2).



**Figura 2.** Organización genética de la SPI-1 de *S. Typhimurium*.

El sistema de secreción (Fig. 1) comprende diversas proteínas tales como SpaP, SpaQ, SpaR y SpaS que forman la base del complejo, clave en el ensamblaje de la aguja a la membrana bacteriana (29, 30). PrgH y PrgK están localizadas en la membrana interna de *Salmonella*; sus dominios periplásmicos forman anillos anidados, e InvG comprende los anillos externos que forman la base del sistema (31). PrgI es el componente principal de la aguja e InvJ controla la longitud de ésta. PrgJ forma una barra interna dentro del cuerpo basal que ancla la aguja al complejo SpaP/Q/R/S. Dos proteínas, SipB y SipC forman un translocón que se introduce en la célula hospedadora y sirve como canal de paso para las efectoras; SipD ancla el translocón a la membrana hospedadora (17, 32,33).

La mayoría de las distintas proteínas efectoras translocadas a través del SST3 de la SPI-1, son codificadas en la SPI-1, salvo algunas que son codificadas en otras islas de patogenicidad o en ciertas regiones del genoma fuera de las islas. Las proteínas efectoras contribuyen de forma importante durante las distintas

etapas (invasión y colonización) de la infección. Las principales se enlistan a continuación.

- *AvrA (Avirulence factor A)*. Involucrada en proceso de enteritis, disminuye la inflamación intestinal, ya que inhibe la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Además, inhibe la apoptosis a través de la vía JNK (34).
- *SipA (Salmonella invasion protein)*. Promueve la polimerización de la actina de las células del hospedador, y con ello media la internalización bacteriana a las células. El dominio N-terminal de SipA induce el reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares (35).
- *SptP (Salmonella protein tyrosin phosphatase)*. Proteína activadora de la GTPasa, que revierte los cambios del citoesqueleto provocado por las efectoras Sip. Promueve que la membrana del hospedador retorne a un estado estable (36).
- *SopA (Salmonella outer protein)*. Codificada en una región genómica afuera de la SPI-1, SopA es una ligasa E3 que induce enteritis. Se une a dos ubiquitinas ligasas E3 del hospedador (TRIM56 y TRIM65) promoviendo así su ubiquitinación y degradación proteosómica, y con ello modula la respuesta inmune (37).
- *SopB (Salmonella outer protein)*. Proteína con actividad inositol fosfato fosfatasa codificada en la SPI-5. Induce secreción de fluidos y cloruros. Activa la vía Akt y promueve la supervivencia de la célula hospedadora (38, 39).

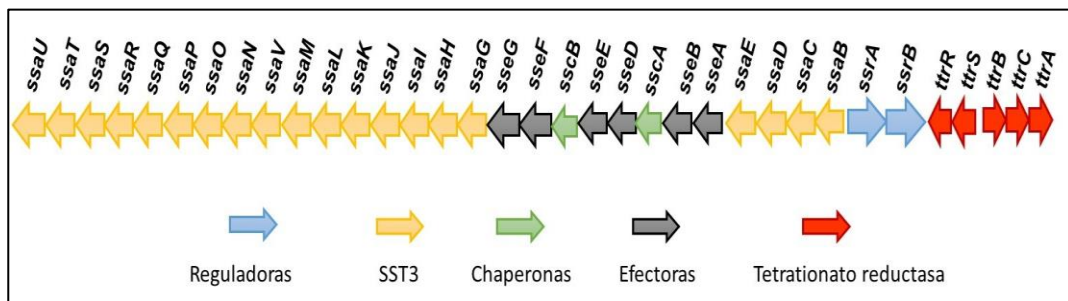
- SopD (*Salmonella outer protein*). Codificada en el centisoma 64, esta proteína contribuye a la formación de filamentos inducidos por *Salmonella* SIFs (*Salmonella-induced filaments*). Además, junto a SopB, participa en la formación de macropinosomas durante la invasión bacteriana (39, 40).
- SopE (*Salmonella outer protein*). Proteína codificada en el fago SopEo; induce reordenamientos rápidos del citoesqueleto de actina al activar GTPasas de la familia Rho (39, 41).
- SopE2 (*Salmonella outer protein*). Proteína tipo GEF codificada en el centisoma 40-42 que induce reordenamientos rápidos del citoesqueleto de actina al activar GTPasas de la familia Rho (42).

## 1.5 SPI-2

Después de la adquisición de la SPI-1, que le proporcionó facultades a *Salmonella* para invadir células epiteliales y fagocíticas, fue adquirida la SPI-2 por transferencia horizontal de genes (43). Esta isla está compuesta de 44 genes divididos en dos segmentos, que fueron adquiridos en eventos por separado, de acuerdo con el análisis del contenido de G-C de esta isla (44). Uno de estos segmentos solo está presente en las cepas de *Salmonella enterica* y le da la capacidad de metabolizar el tetracionato intestinal en condiciones de anaerobiosis, lo que le confiere una ventaja para su crecimiento sobre otras bacterias (45).

El otro segmento de genes de la SPI-2 es requerido para la replicación y sobrevivencia intracelular en macrófagos, y por lo tanto para el desarrollo de enfermedad sistémica (43).

Al igual que la SPI-1, esta isla codifica proteínas estructurales que ensamblan un SST3, proteínas efectoras que son translocadas por el sistema de secreción y proteínas reguladoras (10, 20) (Fig. 3).



**Figura 3.** Organización genética de la SPI-2 de *S. Typhimurium*.

Las proteínas Ssa ensamblan el SSTT. SsaPRSTUV forman el ensamblaje del SST3 a la membrana interna y se conectan con SsaJ y SsaD, dos proteínas que forman un conducto entre el citoplasma bacteriano y la membrana externa; SsaC forma un anillo en la membrana externa bacteriana; SsaH forma la aguja hueca; SsaI forma una varilla interna que junto con SctP, regula la longitud de la aguja (46, 47). Por su parte, SsaOQN forman un sistema de clasificación de sustrato en el citoplasma bacteriano; y SsaLMC comprenden un sistema para prevenir la secreción prematura de proteínas (47).

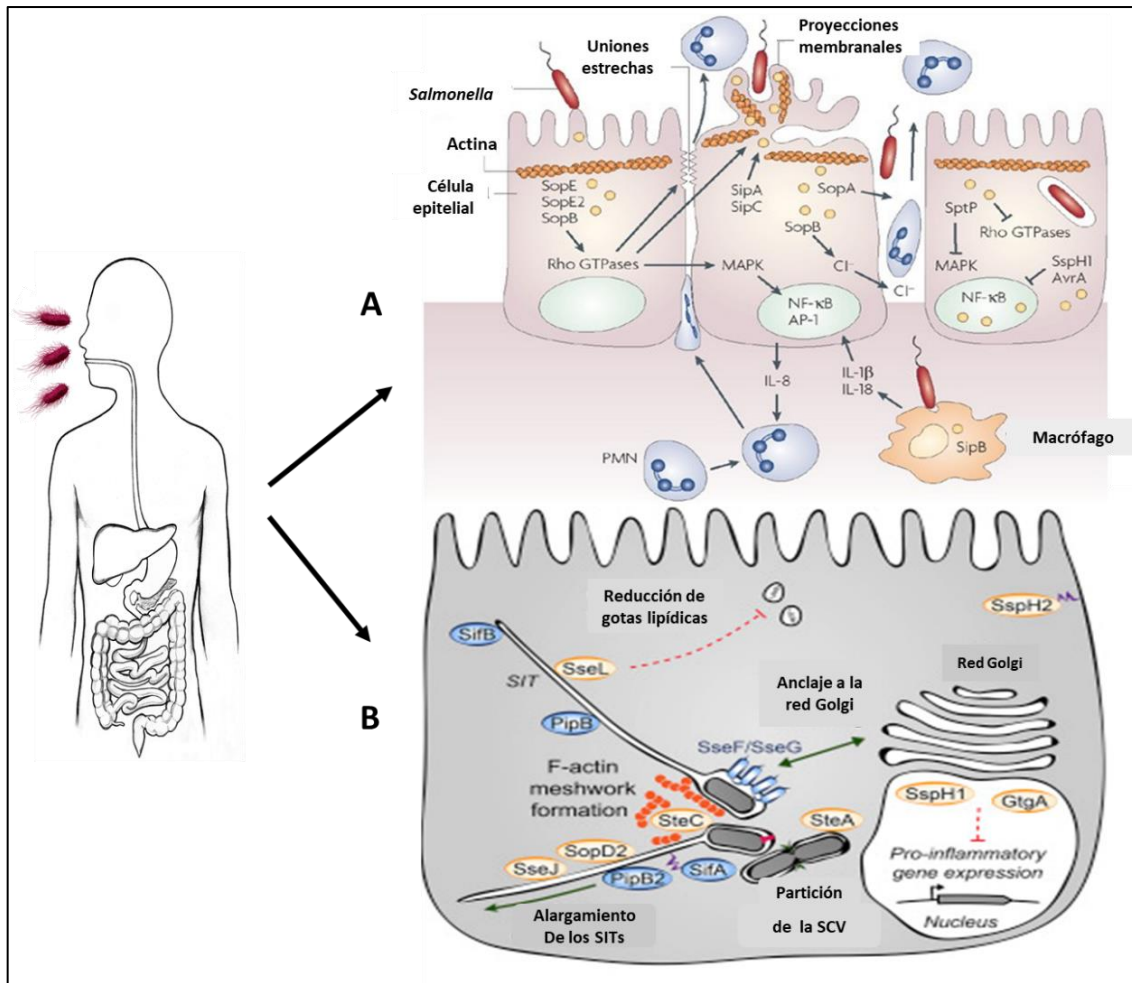
Las principales proteínas efectoras translocadas en la SPI-2 y sus principales funciones se enlistan a continuación.

- SseF/G (*secretion system effector*). Vinculan la vacuola en donde ingresa *Salmonella* al citoplasma de la célula hospedadora a la red de Golgi. También, están involucradas en la formación de SIFs, también llamados SITs (*Salmonella-induced tubules*) (48).
- SseB/D (*Secretion system effector*). Proteínas que sirven como translocón del sistema de secreción que permite el paso de efectoras (49).
- SifA (*Salmonella induced filaments*). Codificada afuera de la SPI-2 en el operón *potABCD*, está relacionada con la producción de SITs (50). Le da estabilidad a las SCV para interactuar con la proteína SKIP (*kinesin-interacting protein*) del hospedador. Le confiere capacidad a la bacteria de evitar la fusión con el lisosoma y con ello resistir la degradación por completo (51).
- PipB y PipB2. Codificadas en la SPI-5; unen la kinesina-1 autoinhibida a la membrana de la vacuola, dando como resultado que los túbulos (SITs) se extiendan (20).
- SopD2 (*Salmonella outer protein*). Codificada en un islote que se inserta dentro del operon *pflAB*, esta proteína está relacionada con la formación de SIFs (52). Junto al efector GgtE, puede degradar a Rab32, neutralizando así su función (maduración de los fagosomas que engloban patógenos) (53, 54, 55).
- GtgA, SseK1/2/3. Inhiben la señalización NF- $\kappa$ B y con ello, la inducción de citocinas proinflamatorias (56, 57).

- SpvC. Codificado afuera de la SPI-2; inactiva irreversiblemente las MAP quinasas del hospedador, inhibiendo la transcripción de citocinas proinflamatorias (58).
- SpiC. Bloquea el tráfico celular e interrumpe la fusión de vesículas que contienen *Salmonella* con lisosomas. Puede controlar el ensamblaje de la F-actina con las SCV y con ello formar túbulos más firmes (59).
- SteA (*Salmonella translocated effector*). Codificado afuera de la SPI-2, esta efectora controla la dinámica de la membrana del SCV, induciendo la partición de la membrana vacuolar a medida que *Salmonella* se divide, quedando cada bacteria en una sola vacuola (20).
- SteC (*Salmonella translocated effector*). Codificado afuera de la SPI-2, activa el ensamblaje de F-actina en las SCV (60).

## 1.6 Patogenia de la infección por *Salmonella* Typhimurium

*S. Typhimurium* es un patógeno entérico invasivo asociado con diarrea, inflamación intestinal aguda e infección sistémica, esto último dependiendo de la virulencia de la bacteria y del estado inmunológico del hospedador. Esta infección es transmitida por alimentos, principalmente carne de ave, huevos, pescado, verduras, frutas y agua contaminada (4, 6). En la figura 4 se esquematizan los principales procesos involucrados en la patogenia.



**Figura 4. Patogenia de la infección por *S. Typhimurium*.** (A) Después de la ingestión oral, *S. Typhimurium* invade las células intestinales en un proceso regulado por un SST3 codificado en la SPI-1 que transloca una serie de proteínas efectoras hacia el enterocito del hospedador. Algunas de estas efectoras inducen reordenamientos del citoesqueleto de actina de la célula hospedadora, que internalizan a la bacteria dentro de una vacuola (SCV). (B) Ya internalizada, un segundo SST3 codificado en la SPI-2, eyecta proteínas efectoras que permiten la supervivencia de *Salmonella* al mantener la estabilidad de la membrana, interferir con la función de los lisosomas y el tráfico vesicular y manipular vías de señalización de las respuestas inmunes (Ver detalles en el texto) (Modificada de Haraga, 2008).

Después de que *Salmonella* ingresa al organismo por la vía oral, el primer desafío para su supervivencia es resistir el pH ácido del estómago. Las pocas bacterias que logran sobrevivir a este desafío pueden llegar al intestino delgado.



Al llegar al intestino, este patógeno comienza a crecer en mayor cantidad si ciertos factores del hospedador, conocidos como resistencia a la colonización, lo permiten. En estos mecanismos participa la microbiota intestinal al producir ácidos grasos de cadena corta y bacteriocinas que inhiben la expresión de ciertos factores de virulencia de *Salmonella*. Además, las bacterias compiten con la microbiota por sitios de unión al epitelio intestinal y nutrientes, y estimulan al sistema inmune del hospedador. Todos estos factores pueden limitar o retardar el curso de la infección (61, 62, 63).

Un paso elemental para una infección exitosa es la adhesión de *Salmonella* a sus células blanco, como células epiteliales y células M. Esto se logra mediante la expresión de fimbrias, apéndices proteicos superficiales de los que la bacteria tiene varias copias. Se han identificado cerca de una docena de fimbrias que se expresan en los distintos serotipos de *Salmonella* durante una infección (64).

En el genoma de *S. Typhimurium* se han identificado al menos 13 operones fimbriales los cuales son *agf (csg)*, *fim*, *pef*, *lpf*, *bcf*, *saf*, *stb*, *stc*, *std*, *stf*, *sth*, *sti* y *stj* (64, 65). Las fimbrias *lpf (long polar fimbriae)* han sido las más estudiadas en este serotipo debido a que mejoran la colonización en las placas de Peyer intestinales a través de interacciones con células M, enterocitos especializados en la captación de antígenos lumbinales, que carecen de glicocálix y tienen pliegues en su superficie, en lugar de los *microvilli* característicos de los enterocitos (64, 65). Además, se ha demostrado que la expresión de *lpf* está regulada por un mecanismo de encendido y apagado (variación de fase) para evitar la respuesta inmune innata (66). Se han observado efectos aditivos de

distintas adhesinas como Lpf, Fim, Pef y Agf en la colonización de células M y enterocitos, así como en la virulencia sistémica de *S. Typhimurium* (67).

Una vez que *S. Typhimurium* ha logrado la adhesión a estas células, el proceso de invasión se da como consecuencia de la expresión y translocación de proteínas efectoras al citosol de la célula hospedadora mediante el SST3 de la SPI-1 (10). Distintas efectoras se unen a la actina y redirigen su dinámica para reorganizar el citoesqueleto con el fin de desencadenar la formación de proyecciones celulares en la membrana de la célula hospedadora que internalizan a la bacteria (19). En las primeras etapas de este proceso intervienen las efectoras SipA uniéndose a la actina y promoviendo su nucleación y polimerización, y SipC en forma de trímero que es responsable de la nucleación de actina (68).

SopE2 y SopE también participan en el reordenamiento del citoesqueleto. Actúan como proteínas tipo GEF (*Guanine Exchange Factor*), activando a las Rho-GTPasas del hospedador (principalmente Cdc42 y Rac1), que son moduladoras del citoesqueleto de actina. Estas GTPasas se unen a la proteína del síndrome de Wiskott Aldrich neural (N-WASP), lo que lleva a la activación del complejo Arp2 / 3 que promueve la nucleación y formación de una red de actina ramificada que ayuda a internalizar a la bacteria en la célula hospedadora (54, 69). En adición a este mecanismo, la efectora SopB, con actividad fosfatasa de inositol, media el reclutamiento de GTPasas Rho (RhoB, RhoD, RhoH y RhoJ), que participan en la regulación de la dinámica de actina y promueven la invasión bacteriana (70). Además, SopB promueve el reclutamiento de R-Ras1, una

GTPasa de la superfamilia Ras, para inducir la acumulación de PI (3,4) P<sub>2</sub> y/o PI (3,4,5) P<sub>3</sub> en los sitios de invasión y la activación de la proquinasa de supervivencia Akt para proteger a la célula hospedadora de la apoptosis (39, 70). Estudios recientes han demostrado que SopB puede promover el reclutamiento de balsas lipídicas a los sitios de invasión de *S. Typhimurium* (70).

Después de la internalización, una efectora denominada SptP imita funcionalmente a las proteínas tipo GAP (*GTPase-accelerating proteins*) y desactiva a las Rho GTPasas Rac y Cdc42, y con ello revierte los rearrreglos del citoesqueleto inducidos por SopE y SopE2. SptP en adición, se degrada más lentamente que SopE, lo que hace más prolongada su función (36, 37, 71).

Después de que *S. Typhimurium* logra invadir a las células, una serie de procesos pueden ocurrir en paralelo. La bacteria puede llegar a la lámina propia del tejido intestinal mediante transcitosis (bacterias incorporadas en vesículas) y viajar hacia el lado basolateral (61). La flagelina y la efectora SipB activan la vía del inflammasoma NAIP/NLRC4, promoviendo así la apoptosis y el desprendimiento de enterocitos infectados hacia la luz intestinal, lo que debilita la integridad del epitelio (72, 73). Por otra parte, la vía NAIP/NLRC4 induce la expresión de IL-18 e IL-1 en las células del epitelio intestinal; en consecuencia, ocurre la inflamación del tejido caracterizada por daño epitelial, regeneración epitelial acelerada, afluencia masiva de células del sistema inmune innato, como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y células NK, edema submucoso y liberación de moco por las células caliciformes de la mucosa del ciego (74). SopB induce la secreción de fluidos al aumentar la secreción de cloro al hidrolizar el

fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PI3), un inhibidor de la secreción de cloro (39, 45). Por su parte la ligasa SopA modula la respuesta inmune del hospedador al ubiquitinar y promover la degradación de las proteínas Trim65 y Trim56 implicadas en el reconocimiento de patógenos (75).

En el citosol, la patogénesis de *S. Typhimurium* se ve facilitada por un segundo SST3 codificado en la SPI-2. Después de la invasión o captación fagocítica, *Salmonella* queda encerrada en una vacuola (SCV, de *Salmonella containing vacuole*) que va madurando a través de la vía endocítica sin llegar a ser un endosoma tardío, pero con características de éste (20, 51).

Horas después de la entrada, esta vacuola se convierte en un nicho de replicación de *Salmonella*. Para su supervivencia es necesario mantener la integridad de la SCV, su localización cerca del aparato de Golgi de las células hospedadoras, así como modular el citoesqueleto e interferir con la señalización de la respuesta inmune, y para ello, es necesaria la translocación de distintas proteínas efectoras a través del SST3 de la SPI-2 (20). La maduración de la vacuola necesita de su movimiento centrípeto a la región yuxtannuclear, en donde estas se acumulan en la red de Golgi (76). Las efectoras SseF y SseG, dos proteínas integrales de la membrana vacuolar actúan en conjunto uniéndose a la proteína ACBD3 asociada a la red. Además, se ha propuesto que estas dos efectoras controlan el movimiento de la proteína motora dineína, y con ello el movimiento de la vacuola a lo largo de los microtúbulos (48, 77).

Para mantener la integridad de la SCV y evitar que comience a degradarse, la efectora SifA se transloca alrededor de las 4 horas post invasión y participa en

la formación de SITs, unas estructuras membranales que se extienden a lo largo de los microtúbulos (51). SifA se une a la proteína PLEKHM2 para formar un complejo que une la cadena ligera de la proteína motora kinesina-1 a los SITs y con ello forma una tubulación en gemación (50, 77). Las efectoras PipB/2 también participan en este proceso al unir la vacuola a la kinesina-1 (20). Este mecanismo permite a *Salmonella* la adquisición de nutrientes en el entorno intracelular del sistema endosómico de la célula hospedadora, que es vital para el mantenimiento de la integridad y estabilidad de la SCV (20). Estas se someten a un proceso de maduración que implica la adquisición secuencial de Rab5 y Rab7 y el desplazamiento hacia el centro organizador de microtúbulos (76). Sin embargo, las SCV no se fusionan con los lisosomas, debido a que SifA puede desacoplar la unión de Rab5 con las proteínas motoras dineínas y con ello las quinesinas provocan el alargamiento de SITs hacia la periferia celular (76, 75, 78). Esta unión entre las quinesinas y las SCV, hace que estas proteínas motoras empujen a la SCV hacia los extremos positivos de los microtúbulos, lo que provoca que se inhiba su unión con los lisosomas (79, 80, 81).

Aunado a esto, las efectoras SopD y GtgE bloquean la unión de las SCV con los lisosomas, ya que escinden y con ello inhiben, la función de Rab 32 y Rab 38, proteínas involucradas en la maduración de los fagosomas que engloban patógenos (53, 55).

A medida que *Salmonella* se adapta al entorno intracelular y va proliferando, la efectora SteA contribuye con el crecimiento bacteriano, al inducir la partición de la vacuola; como consecuencia aparecen vacuolas que contienen una sola

bacteria en su interior, lo que beneficia no competir por nutrientes con otras salmonelas (82). Otro factor que beneficia la integridad bacteriana es la formación de una malla de F-actina alrededor de las vacuolas. Para esto, una efectora con actividad quinasa denominada SteC, activa a la vía de las MAP cinasas para promover los rearrreglos en la F-actina (60). Por su parte, SpvB inhibe la polimerización de la malla de F-actina y restablece la normalidad del citoesqueleto (54, 83).

Por otro lado, *Salmonella* produce enzimas que inactivan radicales tóxicos de oxígeno y nitrógeno, como la homocisteína que actúa como antagonista del óxido nítrico (84). Además, produce superóxido dismutasas (SODs) como SodA, SodB y SodC que la protegen de los efectos oxidativos del estallido respiratorio (85, 86, 87).

Una ventaja evolutiva de las bacterias patógenas ha sido modular las respuestas inmunes de sus hospedadores. Diversas efectoras tales como GtgA, SseK1/2/3 y SpvC inhiben estas respuestas al interferir en las cascadas de señalización de la síntesis de interleucinas (20). GtgA y SeeK1/2/3 se dirigen selectivamente a la vía de señalización de NF- $\kappa$ B mientras que SpvC provoca la desfosforilación de las quinasas de la vía MAPK (56, 88, 89). Si la bacteria logra sobrevivir exitosamente, ciertos factores como la virulencia de ésta y el estado inmunitario del hospedador, pueden ocasionar que la bacteria escape hacia la circulación sanguínea causando una enfermedad de tipo sistémica, colonizando así órganos como el hígado y el bazo (10).

## 1.7 Regulación de las Islas de Patogenicidad 1 y 2 de *S. Typhimurium*

La regulación de la expresión génica es fundamental para el manejo óptimo de la energía y la generación de una respuesta metabólica rápida y adaptada a las condiciones ambientales y tensiones fluctuantes. Para lograr adherirse, invadir y sobrevivir en las células de un hospedador, *S. Typhimurium* debe detectar y responder a las señales ambientales para garantizar la expresión adecuada de los genes necesarios para la patogénesis. *Salmonella* ha desarrollado mecanismos moleculares que le permiten regular sus genes de virulencia en las distintas etapas de una infección. La expresión de los genes que codifican el SST3, las proteínas chaperonas y las efectoras codificadas en ambas islas de patogenicidad de *Salmonella*, está controlada por varios reguladores transcripcionales codificados fuera (globales) y dentro (específicos) de dichas islas (20, 22).

## 1.8 Regulación de la SPI-1

En el caso de la SPI-1, su inducción depende de la expresión de varios genes reguladores de efecto positivo (activadores de la transcripción) codificados en ella, como HilA, HilC, HilD e InvF (90). El regulador central de la SPI-1 es HilA, una proteína de la familia de activadores transcripcionales OmpR-ToxR con un motivo de unión al ADN de tipo hélice-giro-hélice (HTH) (91). El regulador HilA activa de forma directa la transcripción de los operones *prg/org* e *inv/spa*, y de esta forma se sintetizan los componentes del SST3 (92).

Además, HilA también activa directamente la transcripción de InvF, otro regulador transcripcional positivo codificado en la SPI-1 (93). InvF es una proteína

de la familia AraC que activa la expresión de los efectores del SST3 codificados tanto dentro como fuera de SPI-1 (93). Este regulador activa directamente la expresión del operón *sic/sip* el cual controla la expresión de distintas efectoras de la isla (94). Se ha demostrado que SicA, una chaperona codificada en la SPI-1, puede actuar en sinergia con InvF para inducir la expresión de efectoras translocadas tanto fuera como dentro de la SPI-1 (38, 94, 95).

De igual forma, la expresión de HilA está controlada por la cooperación sincrónica de tres proteínas de la familia AraC: HilD y HilC codificadas dentro de la isla; y RtsA, un regulador transcripcional codificado en un operón ubicado en una isla integrada en el tRNA (PheU) (96). HilD y HilC regulan positivamente la expresión de los genes SPI-1 al inducir la expresión de HilA uniéndose directamente a su región promotora (97). Además, hay evidencia de que estos tres activadores también pueden actuar mediante un bucle (HilD-HilC-RtsA) para controlar la expresión del regulador central (97, 98). Aunque tienen un alto porcentaje de homología en su dominio de unión al promotor, HilD es dominante sobre HilC y RtsA (96).

Aunque diversos estudios han demostrado que HilD o el bucle que forma con los otros activadores, pueden activar la expresión de los genes de la SPI-1 por una vía diferente a la de HilA, este último es el mejor inductor de los genes de la isla. HilC y HilD pueden controlar su propia expresión y regular positivamente al otro (98). HilA regula negativamente su propia expresión de manera significativa al unirse a su propio promotor (99).



La inducción de los genes de la SPI-1 requiere de otros reguladores presentes afuera de la isla tales como FliZ, CsrB, CsrC, BarA, SirA y GrhD1. FliZ, un regulador de los genes flagelares, controla postraduccionalmente la actividad de HilD, favoreciendo su actividad (30). Dos RNAs pequeños no codificantes, *csrB* y *csrC*, tienen múltiples sitios de unión a CsrA, con lo que la secuestran de sus RNAs blancos y contrarrestan así la función de esta proteína. En consecuencia, el sistema CsrB/C elimina el efecto represor de CsrA sobre el transcrito de HilD, lo que permite la traducción de ésta (100). Un componente clave de la regulación de los genes de la SPI-1 es una proteína llamada SirA, que forma parte de un sistema de componentes BarA/SirA. BarA es una proteína transmembranal de la familia de sensores histidinas cinasas que se autofosforila en un residuo conservado de histidina al ser estimulado por la presencia de ácidos grasos de cadena corta, baja osmolaridad y pH que oscila entre 6 y 8 (101, 102, 103). BarA activa, fosforila a su regulador de respuesta citoplasmático, SirA (101). SirA es un regulador transcripcional de 234 aminoácidos de la familia FixJ que tiene un dominio hélice-giro-hélice (HTH) de unión al ADN, que regula positivamente la expresión del sistema CsrB/C, y con ello, de la SPI-1 (104, 97).

Recientemente se identificó un gen codificado en una isla genómica adquirida horizontalmente por *S. Typhimurium* denominado *grhD1* que es regulado positivamente por HilD y es necesario para la invasión a células epiteliales, macrófagos y participa en el proceso de inflamación intestinal en ratones (105).

Existen reguladores que controlan negativamente la expresión de la SPI-1, muchos de ellos codificados afuera de esta isla. Los principales reguladores son HilE, FimZ, H-NS, CsrA y Lon. HilE es una proteína codificada en una región genética similar a una isla de patogenicidad; regula negativamente la actividad de HilD al unírsele directamente y con ello evitar la formación de homodímeros (necesarios para interactuar con su ADN objetivo) (106), y después favorecer que sea degradada por Lon. FimZ controla la expresión de las Fimbrias Tipo 1 (T1F) y regula positivamente la expresión de HilE (107). La proteasa Lon degrada a HilD y HilC al unirse a estas directamente y con ello regula negativamente su actividad (108). H-NS es una proteína abundante en *Salmonella* y otras enterobacterias, que silencia preferentemente genes transferidos horizontalmente ricos en secuencias A + T al unirse directamente al ADN; se ha demostrado que inhibe la transcripción del regulador HilA, además de genes fimbriales (97, 109, 110). La proteína CsrA (*Carbon storage regulator A*) es un homodímero que se superpone en la secuencia Shine-Dalgarno del RNAm de HilD evitando así su traducción (111, 112).

### **1.9 Regulación de la SPI-2**

Los genes de SPI-2 están controlados por el operón *ssrA/B* que codifica un sistema de dos componentes. La cinasa sensora SsrA se activa al autofosforilarse un residuo cinasa en su dominio periplásmico, en presencia de concentraciones bajas de calcio, pH bajo, baja concentración de  $Mg^{2+}$  y baja osmolaridad (113, 114). Esta cinasa fosforila y activa a SsrB, su regulador de respuesta, que a su vez induce la expresión de los operones *ssa*, *sse* y *ssc* y con

ello los genes que codifican el SST3, proteínas efectoras y chaperonas de SPI-2, respectivamente (115).

Entre los principales reguladores positivos de la SPI-2 codificados fuera de esta isla se encuentran los sistemas de dos componentes PhoP/PhoQ y EnvZ/OmpR, así como los reguladores SlyA e IHF. El sistema PhoP/PhoQ y sus ortólogos controlan genes relacionados con la homeostasis de  $Mg^{2+}$ , la resistencia a los péptidos antimicrobianos y virulencia en diversas especies bacterianas Gram negativas (105, 107). El sistema comprende a la cinasa sensora PhoQ que se activa en pH ácido, baja concentración de  $Mg^{2+}$  y péptidos antimicrobianos, que a su vez fosforila a su regulador de respuesta PhoP, activándolo para que este se una a sus genes blanco (107). Este sistema controla la expresión de aproximadamente el 9% de los genes de *Salmonella* Typhimurium, y cuando la bacteria crece en medios mínimos controla la expresión del regulador *ssrA/B* de forma directa, uniéndose al promotor de *ssrB* (107, 116). Por otra parte, algunos trabajos han puesto en duda que PhoP/PhoQ sea indispensable para la activación de los genes de la SPI-2 a nivel intracelular, ya que en mutantes de *phoP* se ha visto actividad en el promotor de *ssrB* y de genes estructurales del SST3 (114). Otro sistema de dos componentes integrado a la red reguladora de la SPI-2 es EnvZ/OmpR, en el que la cinasa transmembranal EnvZ se autofosforila en condiciones de baja osmolaridad y pH ácido, y posteriormente fosforila a OmpR que se une a *ssrA* y a *ssrB* (117, 118). El factor de transcripción SlyA de la familia de reguladores MarR, participa en la regulación de la SPI-2 al contrarrestar el efecto represor que tiene H-NS sobre

*ssrA* al unirse directamente a su región promotora (119). Se ha planteado que bajo distintas condiciones inductoras (medio mínimo N y medio LB), SlyA desplaza a H-NS permitiendo que PhoP se una al promotor de *ssrA* (120). Además, SlyA induce la expresión de *phoP* al contrarrestar el silenciamiento de H-NS sobre su promotor, lo que demuestra una coregulación de estos genes (109, 121).

PhoP también activa la expresión de *grhD1* de *S. Typhimurium* independientemente de HilD bajo distintas condiciones de crecimiento (medio LB o N-mínimo), aunque queda por definir el papel en la supervivencia y proliferación intracelular de GrhD1 (105).

Entre los reguladores negativos codificados fuera de la SPI-2, además de H-NS, se encuentran dos proteínas homologas llamadas Hha y YdgT. Estas proteínas modulan la expresión de genes adquiridos horizontalmente de *S. Typhimurium*, como genes fimbriales y los de la SPI-2. Se tiene evidencia de que HhA se expresa en las primeras etapas de la infección y silencia a los genes de esta isla cuando la bacteria está detectando un ambiente extracelular (122). Por el contrario, YdgT se expresa en una etapa avanzada de la infección cuando *Salmonella* está en un ambiente intracelular y los genes de la SPI-2 se están induciendo (122). Además, se ha sugerido que YdgT, HhA y H-NS forman complejos heterodímeros que se unen a SsrB para reprimir de una forma más eficiente la expresión de los genes de la SPI-2 (105, 122, 123).

## 1.10 Regulación ambiental de las Islas de patogenicidad 1 y 2 de *S. Typhimurium*

La interacción entre el hospedador, el agente y el medio ambiente ha propiciado que los genes reguladores de las SPIs de *Salmonella* respondan a una amplia variedad de señales fisicoquímicas.

La expresión de los genes reguladores de la SPI-1 está influenciada por las condiciones que se encuentran en el lumen intestinal tales como alta osmolaridad, pH neutro y baja tensión de oxígeno (23, 92). En condiciones *in vitro* se ha visto que el medio rico en nutrientes Luria-Bertani (LB) favorece la inducción de la expresión de los genes de esta isla (124).

La concentración de  $Mg^{2+}$ , bilis y ácidos grasos de cadena corta también participan en la regulación de genes de la SPI-1. Se ha visto que, a una baja concentración de  $Mg^{2+}$ , se incrementa la expresión de FimZ, proteína que induce la expresión de HilE; esta a su vez, reprime la actividad de HilD y en consecuencia de HilA (97). La bilis liberada al intestino delgado tiene un efecto negativo sobre la expresión de los genes de la SPI-1 a través de un mecanismo de desestabilización postraducciona del regulador HilD (125). Se ha planteado que la gran cantidad de porinas presentes en *S. Typhimurium* permite la entrada de bilis y con ello su interacción con HilD (126).

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) son productos metabólicos generados por la microbiota intestinal del hospedador mediante fermentación de carbohidratos, que pueden tener un efecto tanto benéfico como perjudicial sobre el crecimiento de *S. Typhimurium* y otras bacterias entéricas (102). Los

principales AGCC son acetato, propionato y butirato, que constituyen el 90% de los AGCC producidos por la microbiota (102, 127). Se ha visto que el butirato y el propionato inhiben la expresión de los genes de la SPI-1 (97, 102). El propionato protonado puede difundirse a través de las membranas de bacterias Gram negativas, lo que acidifica el medio intracelular y tiene un efecto perjudicial sobre el crecimiento bacteriano (127). Aunado a esto, se ha demostrado que las especies de *Bacteroides* spp. que producen propionato pueden mediar la resistencia a la colonización en ratones infectados con *S. Typhimurium* (128). En contraste, el acetato tiene un efecto positivo sobre la expresión de los genes reguladores de la SPI-1. Se propone que el acetato a pH neutro (6-7) puede difundirse al citoplasma de las bacterias y convertirse en acetilfosfato mediante reacciones enzimáticas (100, 102). Este acetilfosfato puede entonces fosforilar BarA y SirA, induciendo así la expresión de los genes de SPI-1 (102).

### **1.11 Comunicación transcripcional entre la SPI-1 y SPI-2 de *S. Typhimurium***

En un estudio previo, se demostró que HilA y SsrA/B, reguladores centrales de SPI-1 y SPI-2 respectivamente, pueden ser inducidos secuencialmente cuando *S. Typhimurium* crece en medio LB (129). Para este mecanismo se requiere la participación de HilD, el regulador de invasión de la SPI-1, que induce la expresión directa de *hilA* y de *ssrA/B* al inhibir el efecto represor de H-NS sobre las regiones reguladoras de estos dos genes (130). Cuando la expresión de SPI-1 comienza a disminuir y la bacteria entra en una fase estacionaria de crecimiento, HilD activa la expresión de la SPI-2 en LB, pero no en medio N-

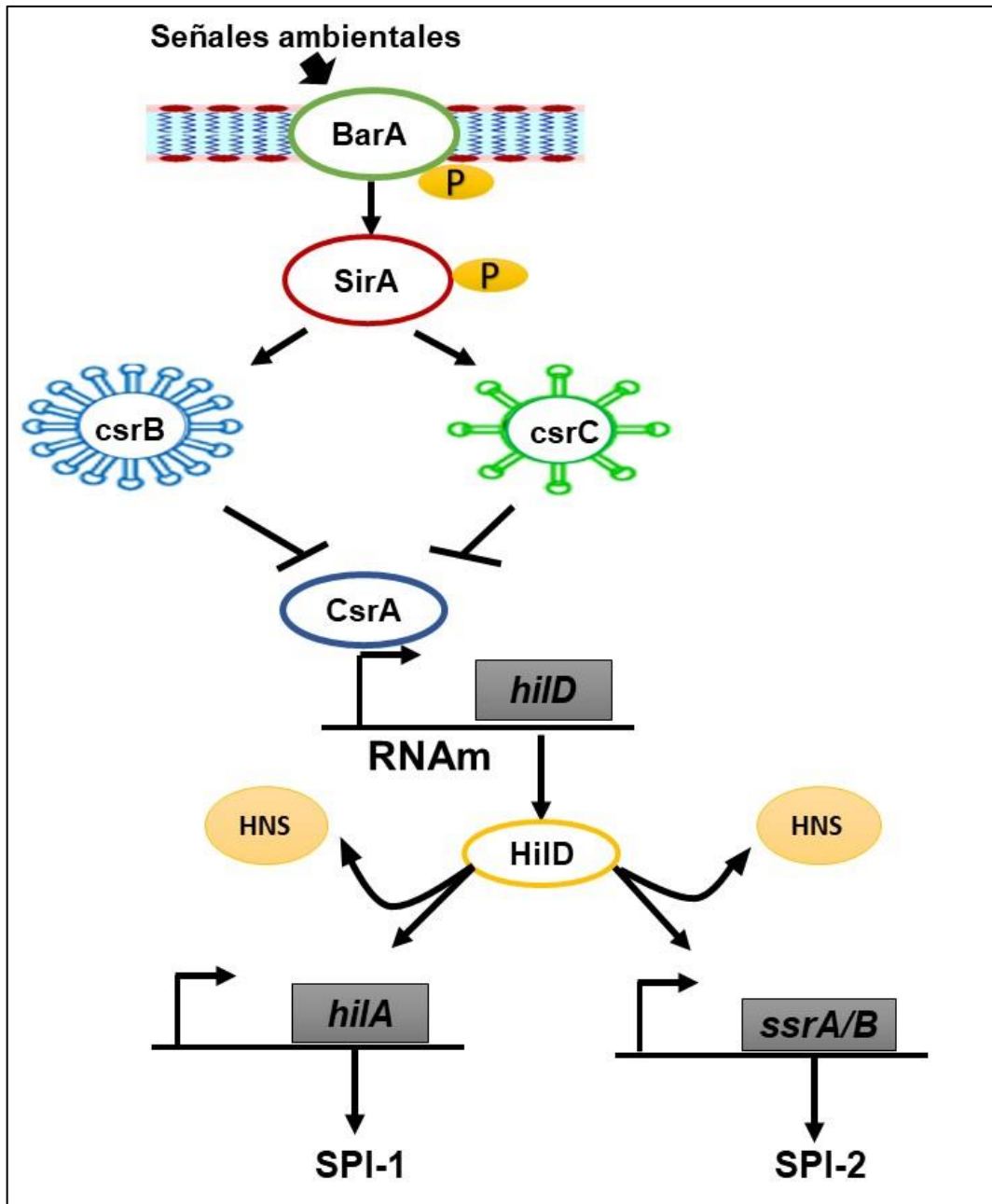
mínimo, que es el medio que se utiliza para estudiar la regulación de los genes de la SPI-2 (129).

### **1.12 Cascada genética que controla la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 de *S. Typhimurium***

Martínez *et al.*, demostraron que cuando *S. Typhimurium* crece en medio LB, SirA induce la expresión de los RNAs CsrB y CsrC al unirse directamente a sus regiones reguladoras (130). Una vez expresados, estos RNAs se unen al regulador global CsrA, que es una proteína que reprime a *hilD* al unirse a su RBS y al codón de inicio de la traducción. Por tanto, cuando CsrB y CsrC se unen a CsrA, la secuestran y eliminan el efecto represor de ésta sobre *HilD*. Posteriormente, *HilD* traducida, se une a los promotores de *hilA* y *ssrB* con lo cual desplaza a HNS, un regulador global que normalmente está unido al promotor de *hilA* y *ssrB* y por tanto impidiendo la expresión de estos. Por tanto, la unión de *hilD* a los promotores de *hilA* y *ssrB* (reguladores de la SPI-1 y SPI-2, respectivamente), contrarresta el efecto negativo de HN-S sobre la expresión de estos dos genes, y en consecuencia, permite finalmente la expresión del resto de los genes de SPI-1 y SPI-2 (Fig. 5) (129, 130).

Debido a que esta cascada de regulación de las SPIs se ha demostrado *in vitro*, cuando *Salmonella* crece en medio LB, creemos que funciona cuando este patógeno se encuentra en el lumen cecal, antes de la invasión a las células de intestino y podría ser importante para coordinar la infección intestinal, así como para explicar la expresión de SPI-2 en el lumen intestinal reportada previamente (131) y por tanto para el inicio de su adaptación al ambiente intracelular. Por lo

tanto, estudiar *in vivo* la relación de los genes que controlan la expresión de ambas islas durante una infección por *S. Typhimurium* es clave para tener una mejor comprensión sobre este mecanismo.



**Figura 5.** Cascada reguladora que controla la expresión de la SPI-1 y SPI-2 de *Salmonella Typhimurium* cuando crece en medio LB. (Ver detalles en el texto).



Los ratones han sido un buen modelo para estudiar una infección por *S. Typhimurium*, ya que desarrollan enfermedad de tipo sistémica similar a la fiebre tifoidea (*S. Typhi*) en humanos. La limitante principal para estudiar la cascada reguladora de las islas de patogenicidad es que estos animales no presentan la enfermedad intestinal, por lo que pueden prescindir de la expresión de los genes de la SPI-1 (132). Por otra parte, los bovinos han sido utilizados como modelo para estudiar la infección intestinal por *S. Typhimurium* (133). Se ha demostrado en diversos estudios que SPI-1 y SPI-2 son esenciales en la enfermedad en estos animales, ya que la inactivación de estas islas reduce la gravedad de una infección por *S. Typhimurium* (129, 133). Pero las instalaciones y el costo que se necesitan son una limitante para su uso como modelo de infección.

El modelo adecuado que nos permite estudiar el papel de los genes que conforman la cascada reguladora de *S. Typhimurium* es el aviar. Esto debido a que, en pollos de un día de edad, la infección da como resultado una infección sistémica que produce inflamación del hígado, aparato gastrointestinal y bazo; mientras que, en pollos de una semana de edad, la infección resulta en enteritis y colonización del tracto gastrointestinal que puede durar semanas (10).

## **2. Justificación**

Si bien se han realizado diversos estudios *in vitro* para esclarecer la compleja regulación de los genes de las SPIs de *S. Typhimurium* y en particular la cascada reguladora conformada por SirA, Csr y HilD, son aún pocos los estudios que han estudiado el papel de estos genes en el entorno hostil de un hospedador, como lo es el lumen intestinal. El pollo como modelo de infección es bastante útil por permitir estudiar tanto la colonización intestinal como la diseminación sistémica, por lo que es posible emplearlo para analizar el papel de los genes implicados en la regulación de la SPI-1 y SPI-2. Un mejor entendimiento sobre los genes que controlan la expresión de la SPI-1 y SPI-2 *in vivo* permitirá identificar elementos que puedan ser empleados como blancos para el futuro control de esta enfermedad en las especies afectadas por *S. Typhimurium*.

## **3. Hipótesis**

La cascada reguladora constituida por SirA, Csr y HilD se activa en el lumen intestinal e induce la expresión de *hilA* y *ssrAB*, reguladores centrales de SPI-1 y SPI-2 respectivamente, antes de que *Salmonella* invada el intestino.

## **4. Objetivo**

Determinar si SsrB se expresa por medio de la cascada SirA, Csr y HilD en el lumen intestinal aviar, antes de la invasión al intestino. Además, analizar el papel de estos genes en la colonización intestinal, diseminación sistémica y producción de lesiones en el modelo aviar,

#### 4.1 Objetivos específicos

- Realizar infecciones en pollos de un día y una semana de edad, con la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y sus derivadas mutantes  $\Delta sirA$ ,  $\Delta csrB/C$  y  $\Delta hilD$ .
- Cuantificar las unidades formadoras de colonias (UFC) a partir de muestras de hígado y contenido cecal de los pollos infectados.
- Examinar los cortes histológicos de muestras de hígado y ciego de los pollos infectados para evaluar la presencia o ausencia de lesiones y compararlas.
- Detectar la presencia de la bacteria y su localización en los distintos tejidos muestreados, mediante inmunohistoquímica.
- Determinar la cinética de expresión de los genes que conforman la cascada reguladora, mediante PCR en tiempo real.

## **5. Material y métodos**

### **5.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento**

Se empleó la cepa silvestre *S. Typhimurium* SL1344 así como sus derivadas mutantes en los genes que conforman la cascada reguladora,  $\Delta sirA$ ,  $\Delta csrBC$  y  $\Delta hilD$ . Las cepas fueron crecidas a 37 °C con agitación a 200 rpm, en el medio de cultivo LB, que contiene 1% de Triptona, 0.5% de extracto de levadura y 1% de NaCl. Cuando fue necesario, los medios se suplementaron con antibióticos estreptomina (100 µg/ml) o kanamicina (20 µg/ml). Estas condiciones de cultivo fueron optimizadas previamente (129).

### **5.2 Animales de experimentación**

Se emplearon pollos libres de patógenos específicos (SPF) (ALPES). Todos los pollos fueron adquiridos de 1 día de edad y se mantuvieron en unidades de aislamiento con temperatura de 30°C que fue reducida progresivamente a 23 °C cuando cumplieron una semana de edad, en el caso de aquellos que se infectaron a esa edad. Los animales tuvieron libre acceso al agua y alimento comercial.

### **5.3 Infección en pollos**

Se realizaron de manera similar a lo reportado previamente (10). Se emplearon grupos de 15 pollos, que fueron inoculados al día de edad por vía oral con  $10^{10}$  UFC de la cepa silvestre o de las derivadas mutantes ( $\Delta sirA$ ,  $\Delta csrB/C$  y  $\Delta hilD$ ). Después de 24, 48 y 72 horas de la inoculación 5 pollos de cada grupo se les realizó la eutanasia para su análisis *post mortem*. De igual forma, grupos de 15

pollos fueron inoculados cuando cumplieron una semana de edad por vía oral con  $10^{10}$  UFC de la cepa silvestre o de las derivadas mutantes. Se realizó la necropsia a 5 pollos de cada grupo a los días 1, 3 y 7 posinoculación.

Además, grupos de 20 pollos fueron infectados al día de edad con  $10^{10}$  UFC de la cepa WT de *Salmonella* Typhimurium y las derivadas mutantes ( $\Delta sirA$ ,  $\Delta csrB/C$  y  $\Delta hild$ ). Después, se realizó la eutanasia a 4 pollos de cada grupo a distintos tiempos (0, 15, 30, 60 90 y 120 min post infección). Se realizó el mismo procedimiento con pollos de una semana de edad. En todos los casos un grupo adicional fue inoculado con PBS como control negativo.

#### **5.4 Estudio *post mortem* e histopatología**

Durante la necropsia se tomaron asépticamente muestras de los ciegos e hígado de las aves, que fueron conservadas y fijadas en formol al 10% durante 24 horas. Posteriormente, fragmentos de estos órganos se cortaron, fueron embebidos en parafina, se cortaron con microtomo, fueron colocados en portaobjetos y teñidos con la tinción de rutina hematoxilina y eosina (HyE), así como con la tinción especial de Gram, para su evaluación microscópica. Para cada órgano se revisó todo el corte y se evaluó la presencia/ausencia de diferentes lesiones tisulares, bacterias y infiltrado inflamatorio. Los criterios y el sistema de puntuación tomados en cuenta para la evaluación de los hallazgos histopatológicos de hígado y ciego son los siguientes. Para el ciego: presencia de bacterias intraluminales e intracriptales (sin bacterias: 0, escasas: 1, moderadas: 2, abundantes: 3); exocitosis (sin hallazgo: 0, escasa: 1, moderada: 2 y severa: 3); cuerpos apoptóticos (ausentes: 0, de 1 a 10: 1, de 11 a 20: 2 y más de 20: 3);

degeneración vacuolar (ausente: 0, de 1 a 5 áreas: 1, de 6 a 10 áreas: 2 y más de 10 áreas: 3). Para el hígado: presencia de focos necróticos (ausentes: 0, de 1 a 2: 1, de 3 a 5: 2 y más de 5: 3); infiltrado linfocítico (ausentes: 0, de 1 a 3 focos: 1, de 3 a 5 focos: 2 y más de 5 focos: 3).

### **5.5 Determinación de las unidades formadoras de colonia (UFCs)**

Durante las necropsias se obtuvieron asépticamente muestras de ciego e hígado en bolsas estériles y se conservaron en refrigeración. Estas fueron maceradas y homogeneizadas en PBS 1x estéril, posteriormente se hicieron diluciones décuples seriadas. El número de bacterias por gramo de órgano fue obtenido al sembrar las diferentes diluciones en agar LB suplementado con los antibióticos adecuados (según cada cepa), que se incubó a 37°C por 24 horas.

### **5.6 Inmunohistoquímica**

Muestras de ciegos en parafina fueron desparafinadas en horno a 55°C durante 30 min y rehidratadas en xilol dos veces y en etanol a diferentes concentraciones (100%, 96% 80% y 70%) y se lavaron en agua destilada. Después se incluyeron en peróxido de hidrógeno y metanol (3ml/100ml) durante 20 min a temperatura ambiente (TA). Posteriormente las laminillas se incluyeron en recuperador de antígenos *Diva Decloaker* 20X (Biocare Medical) a pH bajo en olla de presión durante 3 min, se atemperaron durante 5 min y se lavaron con PBS-TWEEN 0.1%. Se les agregó *Background Sniper* (Biocare Medical), se incubaron por 15 min a TA y se lavaron con PBS-TWEEN 0.1%. Se les aplicó un anticuerpo primario policlonal anti-*Salmonella* Typhimurium 1:300 (BIOSS), se incubaron durante 2 horas a TA y se lavaron en PBS-TWEEN 0.1%. Finalmente, se aplicó

HRP-*Polymer* (Biocare Medical), se incubaron por 30 min y se lavaron con PBS-TWEEN 0.1%. Para los controles negativos se empleó PBS-TWEEN 0.1% en lugar del anticuerpo primario. La positividad se evaluó en el microscopio óptico.

### **5.7 Análisis de la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2**

Empleando el contenido cecal de uno de los sacos ciegos del grupo de pollos a los que se les realizó la eutanasia a los 120 min postinoculación (hpi), se extrajo el ARN total empleando el estuche comercial *RNeasy Plus Mini* (Qiagen).

El ADN cromosomal se removi6 incubando 2 µg de ARN de cada muestra con 2 µl de DNasa I (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se sintetiz6 ADNc en una reacci6n que contiene 0.5 µg de cada ARN tratado con DNasa y 5 pmol de los oligonucle6tidos SirA-RT-R (para *sirA*), CsrB-RT-R (para *csrB*), CsrC-RT-R (para *csrC*), HilD-RT-R (para *hilD*), HilA-RT-R (para *hilA*), SsrB-RT-R (para *ssrB*), y DnaK-RT-R (para *dnaK*), empleando el estuche comercial *Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis* (Thermo Scientific). Posteriormente se realizaron reacciones de qRT-PCR en un volumen final de 20 µl que contenía 5 ng/µl del ADNc, 5 pmol de los pares de oligonucle6tidos para *sirA*, *csrB*, *csrC*, *hilD*, *hilA*, *ssrB* o *dnaK* (SirA-RT-F/SirA-RT-R, CsrB-RT-F/CsrB-RT-R, CsrC-RT-F/CsrC-RT-R, HilD-RT-F/HilD-RT-R, HilA-RT-F/HilA-RT-R, SsrB-RT-F/SsrB-RT-R o DnaK-RT-F/DnaK-RT-R, respectivamente) y 10 µl de la mezcla comercial *SensiFAST SYBR No-ROX* (Bioline). Los niveles del ARNm de *dnaK* fueron usados como control interno para normalizar los resultados obtenidos para el ARNm de los diferentes genes. Se us6 el m6todo el  $2^{-\Delta \Delta CT}$

descrito por Livak y Schmittgen (28). Todas las reacciones de qRT-PCR fueron realizadas 3 veces.

### 5.8 Análisis estadístico

Los puntajes histopatológicos fueron comparados usando la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Los conteos bacterianos se compararon usando el análisis de varianza y las pruebas de comparación múltiple de Tukey. Todos los análisis se realizaron usando el software SPSS Statistics 19.

**Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo**

Cepa	Descripción	Referencia
S. Typhimurium WT	Cepa silvestre SL1344, Str <sup>R</sup>	Hoiseth y Stocker, 1981
S. Typhimurium $\Delta sirA$	Derivada mutante de SL1344, Str <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	Martínez <i>et al.</i> 2011
S. Typhimurium $\Delta csrB/C$	Derivada mutante de SL1344, Str <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	Martínez <i>et al.</i> 2011
S. Typhimurium $\Delta hilD$	Derivada mutante de SL1344, Str <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	Martínez <i>et al.</i> 2011



**Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para los ensayos de PCR tiempo real**

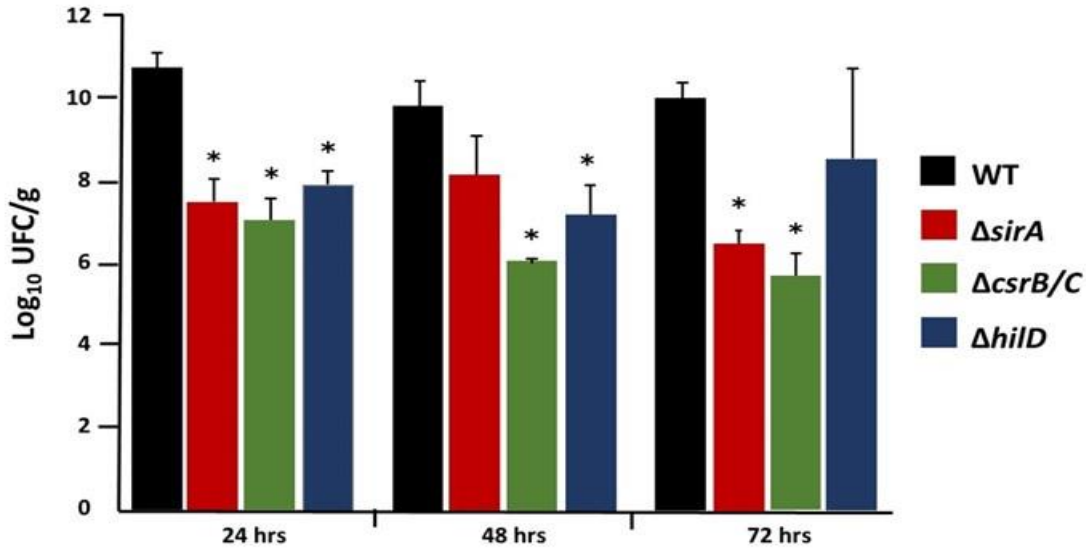
<b>Oligonucleotido</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Referencia</b>
<b>SirA F</b>	(5'→3'): GGA TAC GAC GCA TTC TTG AAG	Martínez <i>et al.</i> 2011
<b>SirA R</b>	(5'→3'): GGA TAC GAC GCA TTC TTG AAG	
		Martínez <i>et al.</i> 2011
<b>CsrB F</b>	(5'→3'): GGA TGA AGC AAA GTG GAA AGC	
<b>CsrB R</b>	(5'→3'): AGC TTC TTC CTG AAG CGT CC	
		Martínez <i>et al.</i> 2011
<b>HiID F</b>	(5'→3'): GCA GGT AGT TAA CGT GAC GC	
<b>HiID R</b>	(5'→3'): TTG CTG CTC GTT TGG GAT AAG	
<b>HiIA F</b>	(5'→3'): TAC GAC GTA TTC TGT CGG AAG	Martínez <i>et al.</i> 2011
<b>HiIA R</b>	(5'→3'): GTA GGT TGC GGC GCT GGC	
<b>SsrB F</b>	(5'→3'): GGG TAT ACC AAT CAT GGG ATC	Este estudio
<b>SsrB R</b>	(5'→3'): CAC AGT TAA GTA ACT CTG TCA C	
<b>DnaK F</b>	(5'→3'): CGT CAG GCA ACC AAA GAT GC	Martínez <i>et al.</i> 2011
<b>DnaK R</b>	(5'→3'): CGC GAT AGT ACG GTT GCC G	

## 6. Resultados

### 6.1 *Salmonella* Typhimurium requiere SirA, CsrB/C y HilD para una completa colonización intestinal y diseminación sistémica en pollos de un día de edad

Se ha demostrado *in vitro*, que el sistema de dos componentes BarA/SirA, los RNAs pequeños no codificantes CsrC y CsrB y el regulador transcripcional HilD, forman una cascada que controla la expresión de la SPI-1 y SPI-2 de *S. Typhimurium* cuando esta es crecida en medio LB (130). Con el fin de evaluar mejor la contribución individual de estos genes en la colonización intestinal y la diseminación sistémica durante una infección *in vivo*, se realizaron infecciones en pollos SPF de un día de edad con una cepa WT de *S. Typhimurium* y con las mutantes que carecen de los genes que conforman la cascada reguladora y posteriormente se cuantificaron las UFC recuperadas de ciego e hígado después de 24, 48 y 72 hpi.

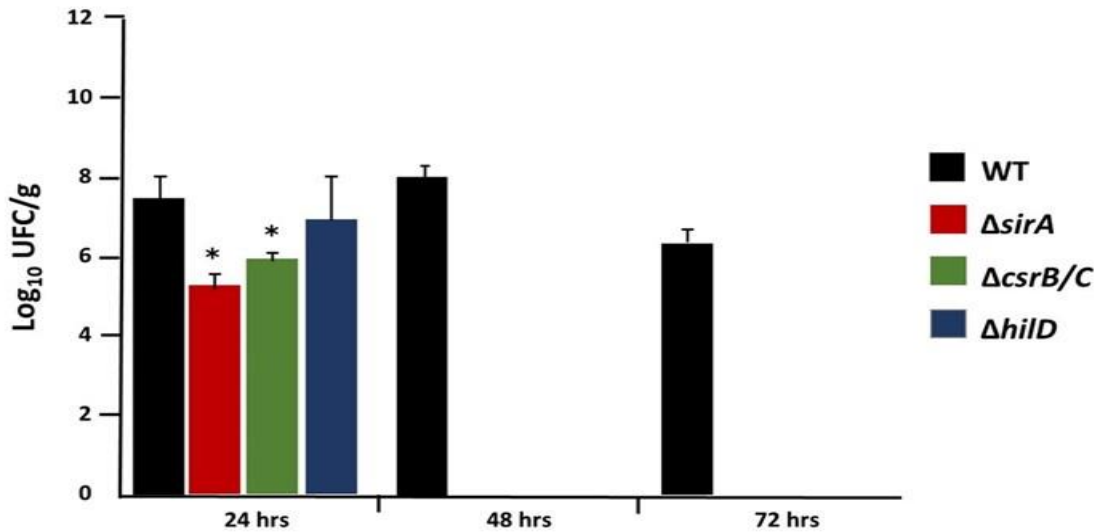
Como se observa en la figura 6, la cepa silvestre fue recuperada del ciego en cantidades constantes ( $10^{10}$ ) a lo largo de la infección, mientras que las cepas mutantes  $\Delta sirA$ ,  $\Delta csrB/C$  y  $\Delta hilD$  se recuperaron en cantidades más bajas ( $10^6$ - $10^8$ ), que la cepa silvestre a las distintas horas analizadas. Estos resultados muestran claramente que los genes que conforman la cascada reguladora de las SPIs contribuyen en el proceso de colonización cecal.



**Figura 6.** Recuperación de *S. Typhimurium* WT SL1344 y las cepas  $\Delta sirA$ ,  $\Delta csrB/C$  y  $\Delta hilD$  de las muestras de ciego provenientes de la infección experimental oral de pollitos de un día de edad. Los cultivos bacterianos se hicieron en agar LB y los resultados se expresan en UFC/g. Los asteriscos indican diferencias significativas con la WT ( $P < 0,05$ ).

En el caso del hígado, la cepa silvestre fue recuperada también en cantidades constantes a lo largo de la infección ( $10^7$ - $10^8$ ), aunque en menor cantidad en comparación con las muestras de ciego (Fig. 7). En cuanto a las cepas mutantes, a las 24 horas, las mutantes  $\Delta sirA$  y  $\Delta csrB/C$  crecieron en cantidades menores a la cepa WT, mientras que a las 48 y 72 horas hpi ninguna mutante fue recuperada (Fig. 7), lo que sugiere que una baja colonización en ciego de estas mutantes repercute significativamente en una capacidad de supervivencia reducida en órganos sistémicos como el hígado. Estos resultados indican que las cepas de *S. Typhimurium* con mutaciones en los genes que conforman la cascada reguladora de las SPIs, además de contribuir en la colonización intestinal, también participan en la diseminación al hígado, lo que demuestra que *sirA*, *csrB/C* y *hilD* son necesarios durante la infección cuando *S. Typhimurium*

necesita invadir las células intestinales, así como lograr sobrevivir y proliferar en órganos sistémicos.



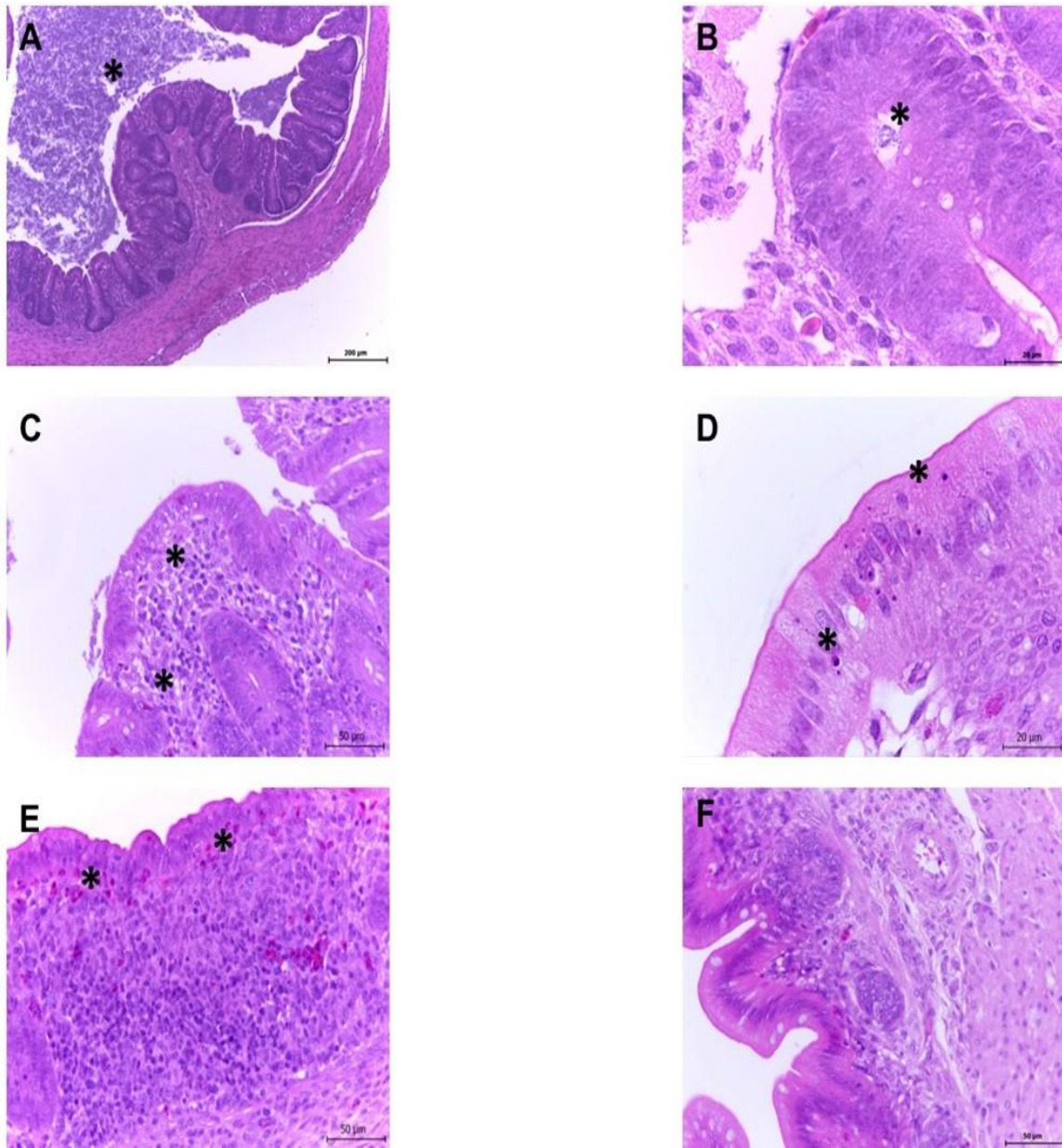
**Figura 7.** Recuperación de *S. Typhimurium* WT SL1344 y las cepas  $\Delta sirA$ ,  $\Delta csrB/C$  y  $\Delta hilD$  de las muestras de hígado provenientes de la infección experimental oral de pollitos de un día de edad. Los cultivos bacterianos se hicieron en agar LB y se expresan en UFC/g. Los asteriscos indican diferencias significativas con la WT ( $P < 0,05$ ).

## 6.2 Pollos de un día de edad inoculados con *S. Typhimurium* carente de SirA, CsrB/C o HilD muestran una disminución en la producción de lesiones en ciego e hígado

Posteriormente, evaluamos distintos cortes de tejido teñidos con HyE de las aves inoculadas con las cepas WT y las mutantes  $\Delta sirA$ ,  $\Delta csrB/C$  y  $\Delta hilD$  con el propósito de correlacionar la cantidad de bacterias presentes en los distintos sitios anatómicos estudiados, con los hallazgos histopatológicos.

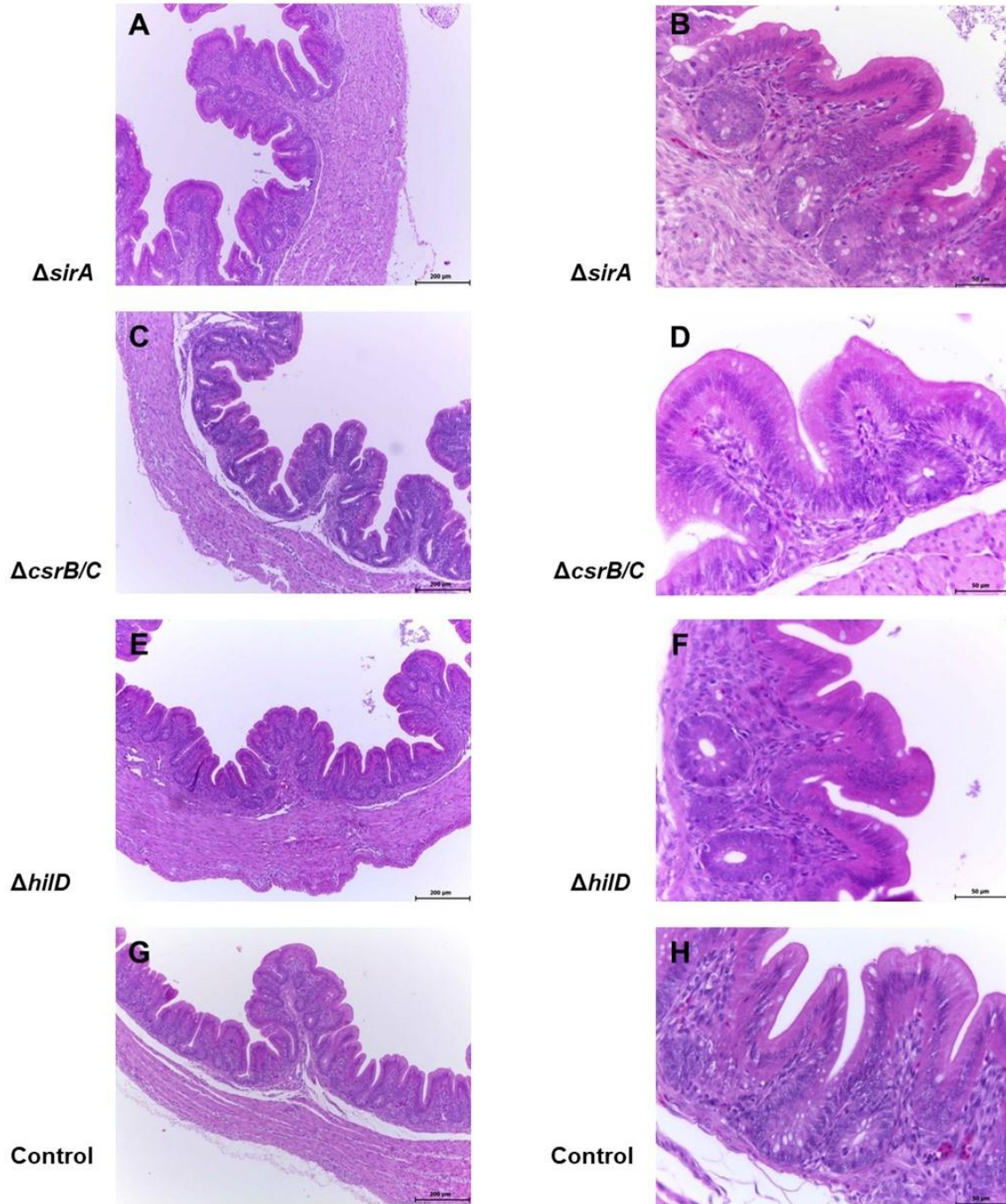
En las muestras de ciego colectadas a partir de las 24 hpi, en los pollos infectados con la cepa silvestre se observaron bacterias intraluminales (Fig. 8A) e

intracriptales (Fig. 8B), degeneración vacuolar (8C) y cuerpos apoptóticos (8D) en el tejido epitelial, así como exocitosis linfocítica (8E). Estos hallazgos aumentaron conforme fue progresando la infección (Fig. 10A, B y C). Los pollos empleados como control negativo no presentaron ninguna lesión a lo largo de la infección (Fig. 8F). En contraste a lo encontrado en la cepa WT, en las muestras de ciegos infectados con las mutantes, se hallaron solo escasas bacterias en el lumen y en las criptas, y se visualizaron en menor cantidad los demás hallazgos (Fig. 9 y 10). Además, las pocas lesiones halladas en las infecciones con las mutantes, fueron menos visibles conforme avanzaba la infección (Fig. 10).

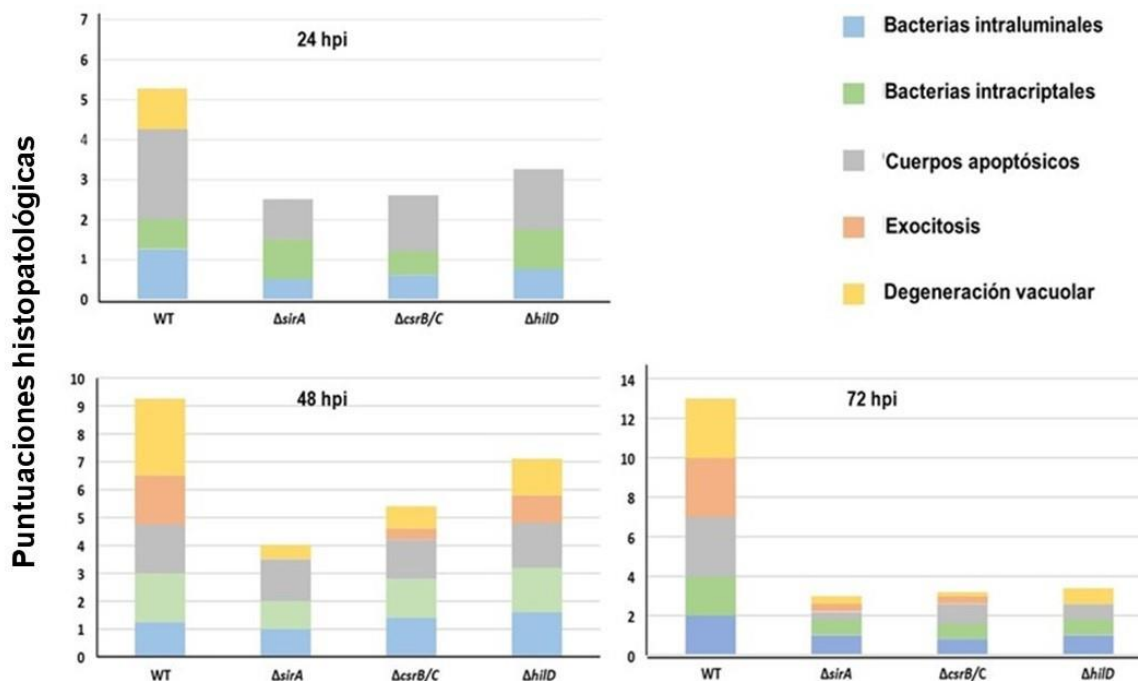


**Figura 8.** Fotomicrografías de cortes de ciego teñidos con HyE de los pollos infectados con la cepa de *S. Typhimurium* WT SL1344 provenientes de la infección experimental oral de pollitos de un día de edad. Bacterias intraluminales (A, 200 µm), bacterias intracriptales (B, 20 µm), degeneración vacuolar (C, 50 µm), cuerpos apoptóticos (D, 20 µm), exocitosis heterofílica intraepitelial (E, 50 µm). Los hallazgos histopatológicos mencionados en cada imagen, se indican con asteriscos. Control negativo (F, 50 µm). Las imágenes son de tejidos distintos y representativos de cada grupo.





**Figura 9.** Fotomicrografías de cortes de ciego teñidos con HyE de los pollos infectados con las cepas mutantes  $\Delta sirA$  (A, 200  $\mu\text{m}$ ) / (B, 50  $\mu\text{m}$ ),  $\Delta csrB/C$  (C, 200  $\mu\text{m}$ ) / (D, 50  $\mu\text{m}$ ) y  $\Delta hilD$  (E, 200  $\mu\text{m}$ ) / (F, 50  $\mu\text{m}$ ) de *S. Typhimurium* provenientes de la infección experimental oral de pollitos de un día de edad. Controles negativos (G, 200  $\mu\text{m}$ ) / (H, 50  $\mu\text{m}$ ). Las fotografías son de tejidos distintos y representativos de cada grupo.

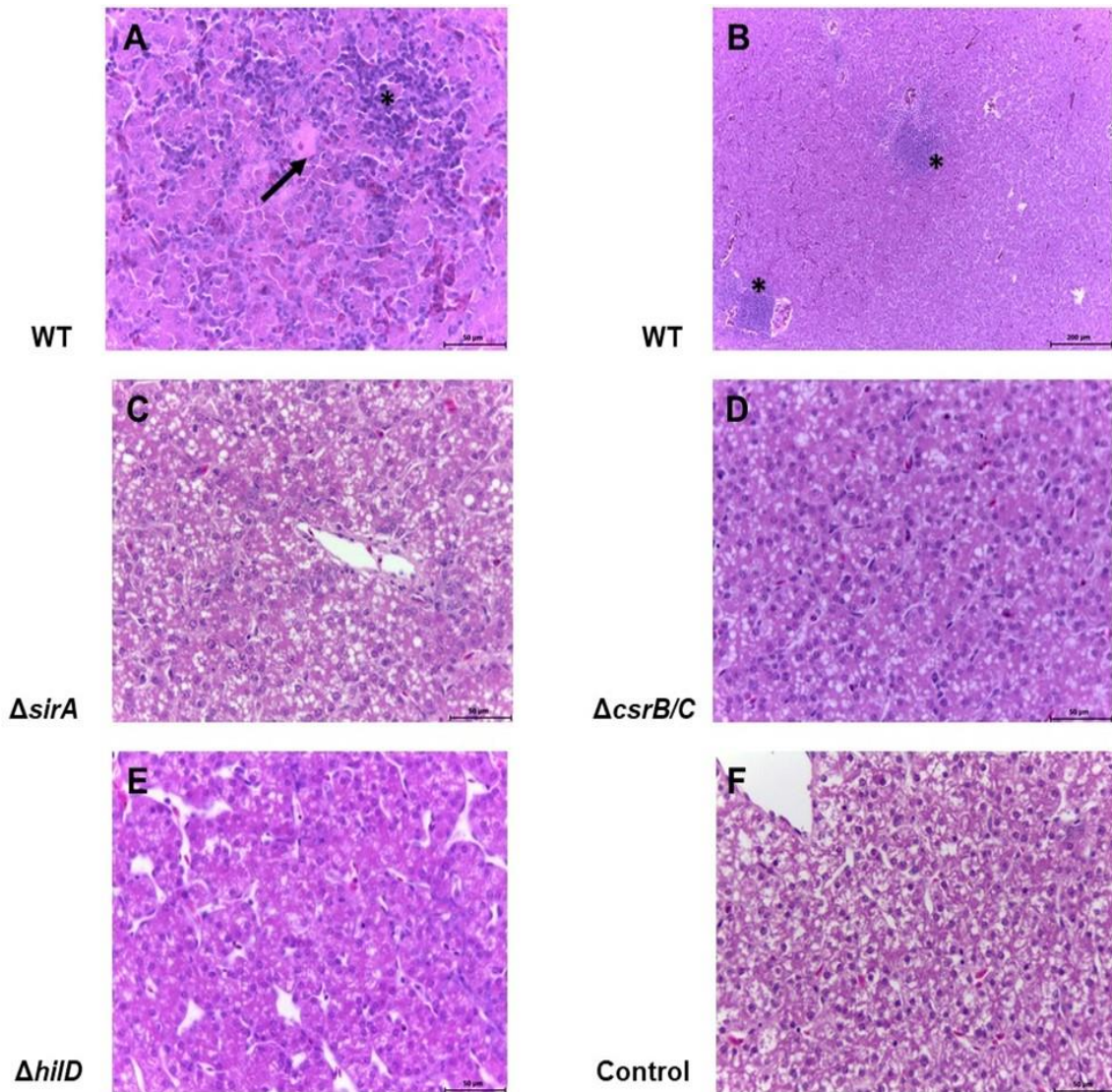


**Figura 10.** Hallazgos histopatológicos de las muestras de ciego provenientes de la infección oral en pollitos de un día de edad con la cepa silvestre de *S. Typhimurium* WT SL1344 y las cepas mutantes  $\Delta sirA$ ,  $\Delta csrB/C$  y  $\Delta hilD$ . Los segmentos de la barra indican las medias de cada criterio para ese grupo.

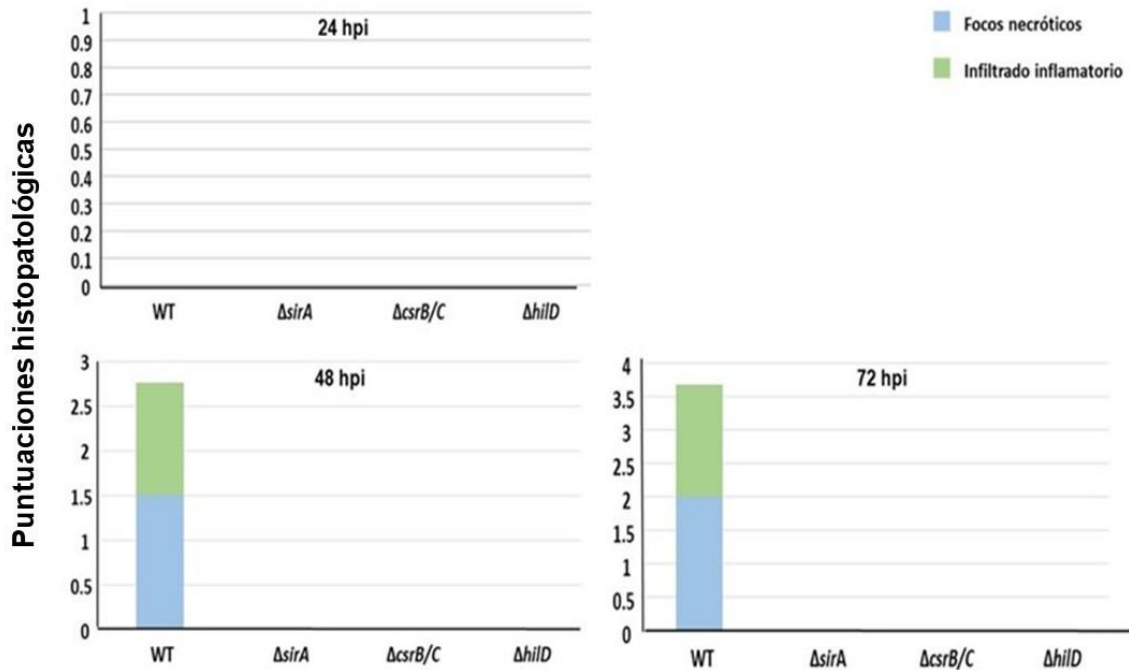
Respecto a los hígados, únicamente se observaron áreas de necrosis (Fig. 11A) y cúmulos linfoides (Fig. 11B) en los pollos infectados con la cepa silvestre a partir de las 48 hpi (Fig. 12), mientras que, en los hígados infectados con las cepas mutantes, no se hallaron lesiones durante toda la infección (Fig. 11 C-E y Fig. 12). Como era esperado, los pollos del grupo control tampoco presentaron ninguna lesión a lo largo de la infección (Fig. 11F).

Los resultados del análisis histopatológico muestran que *sirA*, *csrB/C* y *hilD*, no solo participan en la colonización y diseminación en este modelo aviar, también están relacionados con la producción de lesiones en ciego e hígado durante el transcurso de una infección por *S. Typhimurium*.





**Figura 11.** Fotomicrografías de cortes de hígados teñidos con HyE de los pollos infectados con la cepa *S. Typhimurium* WT SL1344 (A, B) y las cepas mutantes  $\Delta sirA$  (C),  $\Delta csrB/C$  (D) y  $\Delta hilD$  (E) provenientes de la infección experimental oral de pollitos de un día de edad. Zonas de necrosis hepática (flechas), cúmulos linfoides (asterisco). Control negativo (F). Las fotografías son de tejidos distintos y representativos de cada grupo.



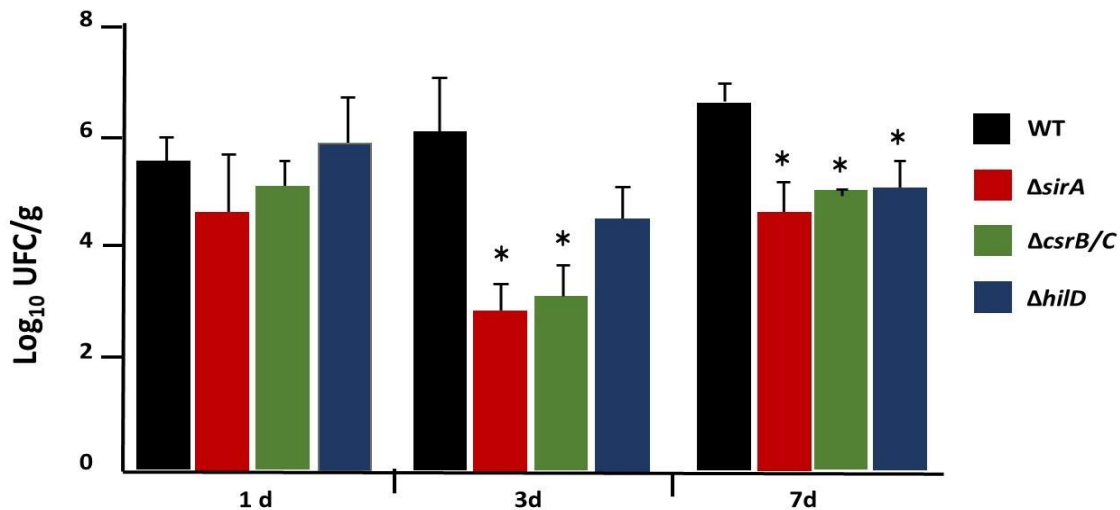
**Figura 12.** Hallazgos histopatológicos de las muestras de hígado provenientes de la infección oral en pollitos de un día de edad con la cepa silvestre de *S. Typhimurium* WT SL1344 y las cepas mutantes  $\Delta sirA$ ,  $\Delta csrB/C$  y  $\Delta hilD$ . Los segmentos de la barra indican las medias de cada criterio para ese grupo.

### 6.3 Las cepas de *Salmonella Typhimurium* carentes de SirA, CsrB/C o HilD, están afectadas en la colonización intestinal y la diseminación sistémica en pollos de una semana de edad

También se evaluó la colonización intestinal en aves de una semana de edad, modelo animal que generalmente presenta colonización intestinal por varios días o semanas (10). Como se observa en la figura 13, la cepa WT fue recuperada en cantidades que aumentaron ligeramente durante la infección ( $10^6$ - $10^7$ ). Interesantemente estas cantidades, aunque fueron constantes, fueron menores a las de la cepa WT recuperadas de los ciegos de los pollos de 1 día de edad ( $10^{10}$ ) (Fig 6), lo que indica claramente que, en aves recién nacidas, la bacteria

coloniza con mayor éxito el ciego. En comparación con la cepa WT, las cepas mutantes se recuperaron en menor cantidad a partir de los 3 días posinoculación (dpi) y después aumentaron a los 7 días. Esto puede indicar la existencia de otros elementos involucrados en la colonización intestinal de *S. Typhimurium* en esta etapa de la infección.

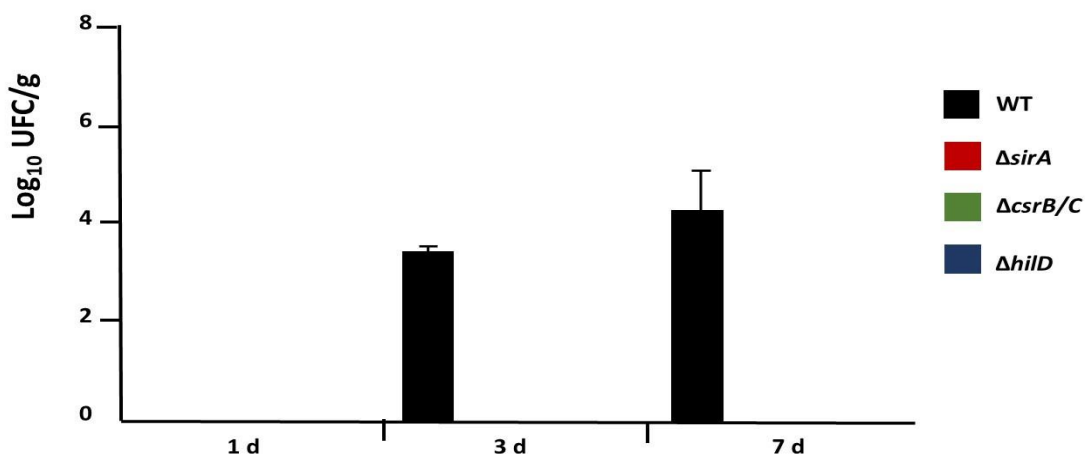
Estos resultados que muestra la participación de *sirA*, *csrB/C* y *hilD* durante el transcurso de la colonización intestinal en estas aves.



**Figura 13.** Recuperación de *S. Typhimurium* WT SL1344 y las cepas  $\Delta sirA$ ,  $\Delta csrB/C$  y  $\Delta hilD$  de las muestras de ciego provenientes de la infección experimental oral de pollitos de una semana de edad. Los cultivos bacterianos se hicieron en agar LB y los resultados se expresan en UFC/g. Los asteriscos indican diferencias significativas con la WT ( $P < 0,05$ ).

En el caso de la diseminación hacia el hígado, la cepa silvestre se recuperó a partir de los 3 dpi y en cantidades menores ( $10^4$ ) (Fig. 14) a las recuperadas del ciego (Fig 13). A diferencia de la cepa WT, las cepas mutantes no fueron recuperadas del hígado a ningún tiempo analizado (Fig. 14), lo que indica un

papel fundamental de estos genes en la supervivencia a nivel sistémico conforme va aumentando la edad de las aves. En conjunto estos resultados muestran, al igual que en aves de un día de edad, claramente la participación de SirA, CsrB/C y HilD en el proceso de colonización intestinal y diseminación sistémica en aves de una semana de edad.



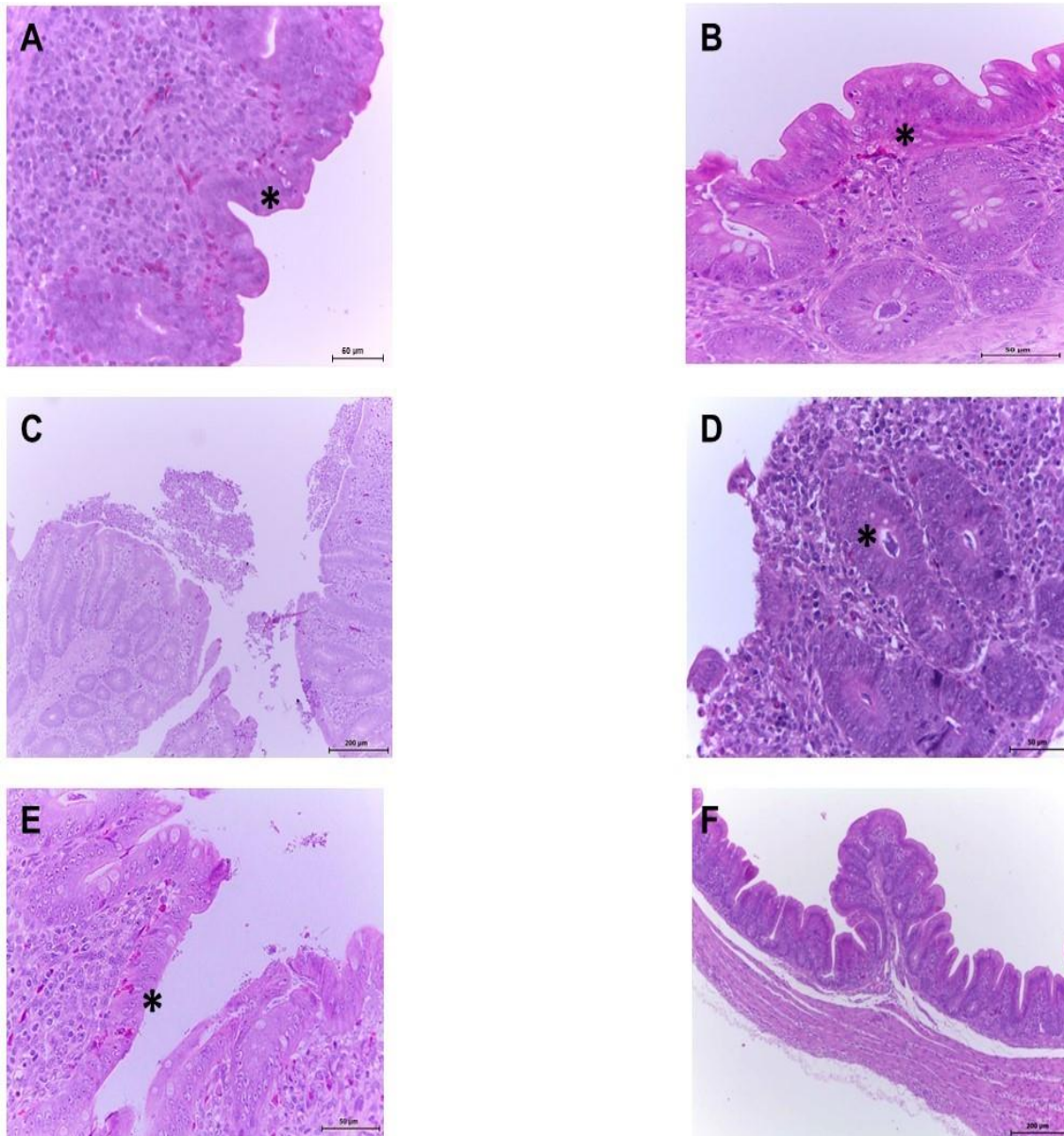
**Figura 14.** Recuperación de *S. Typhimurium* WT SL1344 y las cepas  $\Delta sirA$ ,  $\Delta csrB/C$  y  $\Delta hilD$  de las muestras de hígado provenientes de la infección experimental oral de pollitos de una semana de edad. Los cultivos bacterianos se hicieron en agar LB y los resultados se expresan en UFC/g.

#### **6.4 *Salmonella Typhimurium* requiere de SirA, CsrB/C y HilD para producir lesiones en ciego e hígado en aves de una semana de edad**

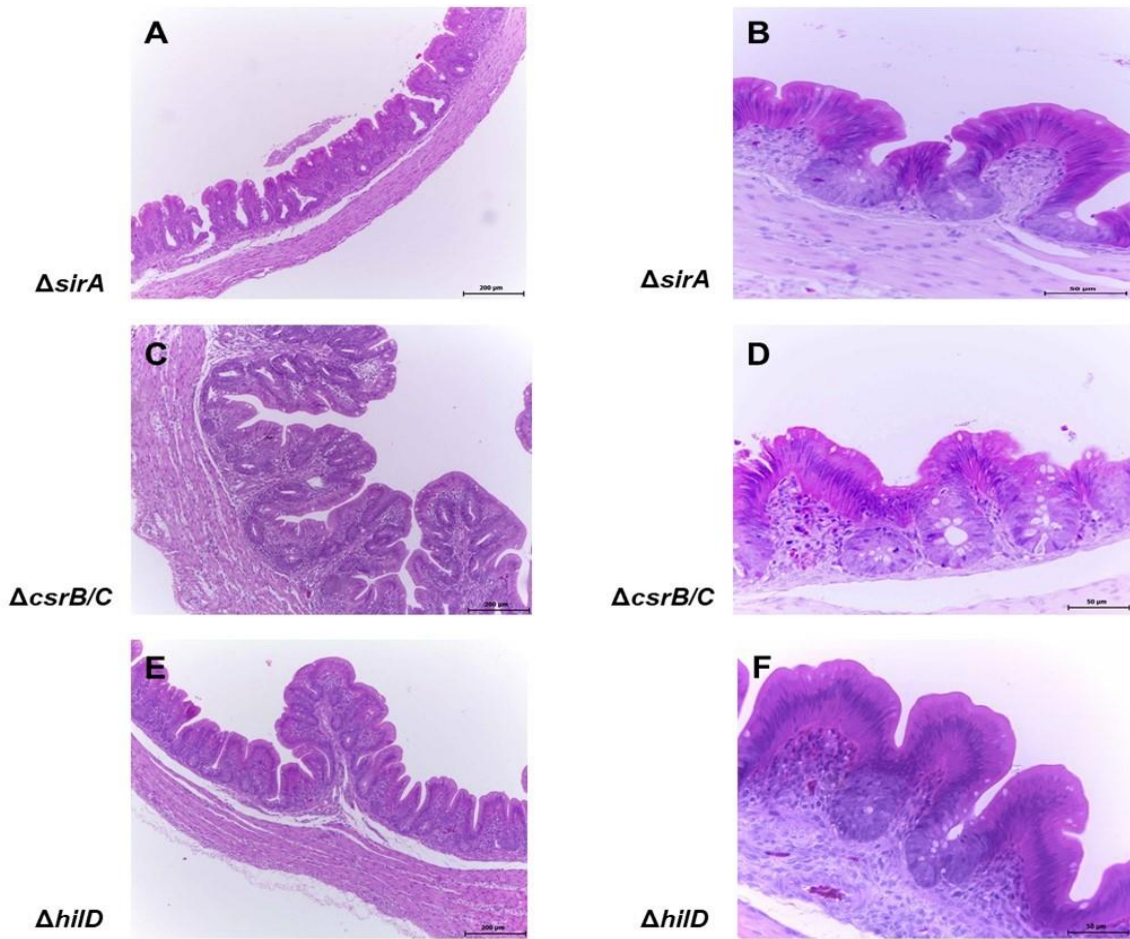
Posteriormente, se evaluaron cortes histológicos teñidos con HyE de ciego e hígado de las aves infectadas a la semana de edad con el fin de correlacionar los hallazgos histopatológicos con los recuentos bacterianos. En el caso de las aves inoculadas con la cepa WT, en el ciego se encontró escasa degeneración vacuolar (Fig. 15A) y cuerpos apoptóticos (Fig. 15B) desde el primer dpi. A partir

del día 3 posinoculación las lesiones aumentaron y se encontraron bacterias intraluminales (Fig. 15C) e intracriptales (Fig. 15D), así como exocitosis heterofílica intraepitelial (Fig. 15 E); sin embargo, estas lesiones se hallaron en menor proporción que las aves de un día de edad (Fig. 12 y 17). En contraste, en los cortes histológicos de aves infectadas con las cepas mutantes, sólo se halló la presencia de degeneración vacuolar y cuerpos apoptóticos en el primer dpi, aunque, en menor cantidad que los infectados con la cepa WT (Fig. 16 y 17). A los 3 y 7 dpi, las cepas mutantes produjeron lesiones mínimas y casi imperceptibles en comparación con la cepa WT (Fig. 16 y 17). Los pollos del grupo control no presentaron ninguna lesión a lo largo de la infección (Fig. 15F).

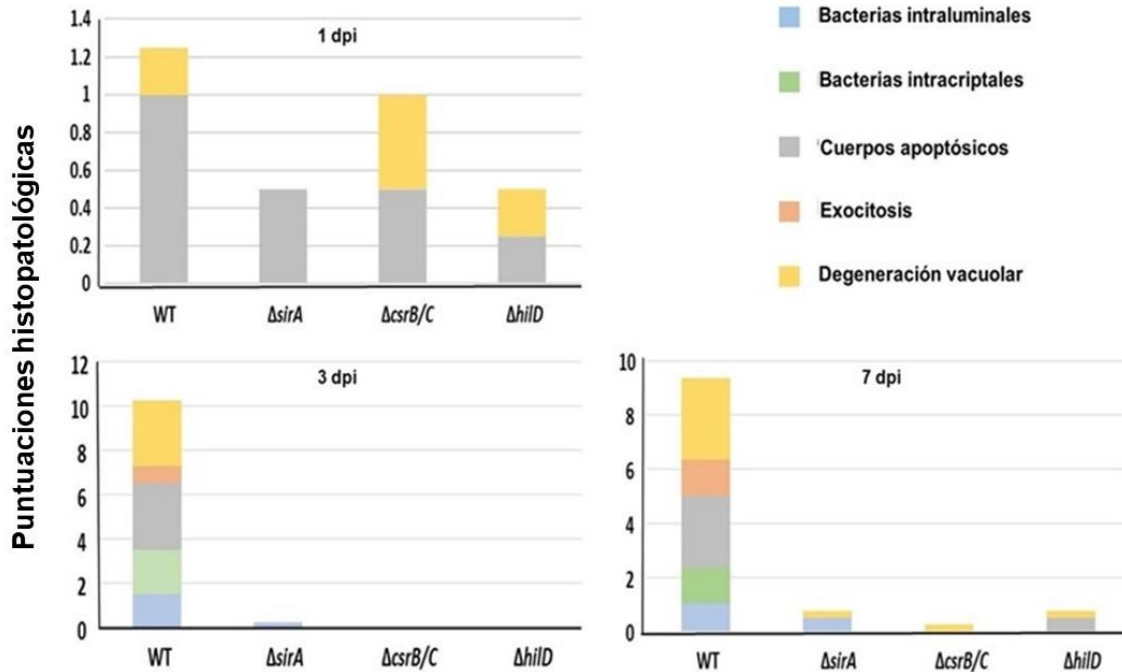




**Figura 15.** Fotomicrografías de cortes de ciego teñidos con HyE de los pollos infectados con la cepa de *S. Typhimurium* WT SL1344 provenientes de la infección experimental oral de pollitos de una semana de edad. Degeneración vacuolar (A, 50  $\mu$ m), cuerpos apoptóticos (B, 50 $\mu$ m), bacterias intraluminales (C, 200  $\mu$ m), bacterias intracriptales (D 50  $\mu$ m), exocitosis heterofílica intraepitelial (E 50  $\mu$ m). El hallazgo histopatológico mencionado en cada imagen, se indica con asteriscos. Control negativo (F, 200  $\mu$ m). Las fotografías son de tejidos distintos y representativos de cada grupo.



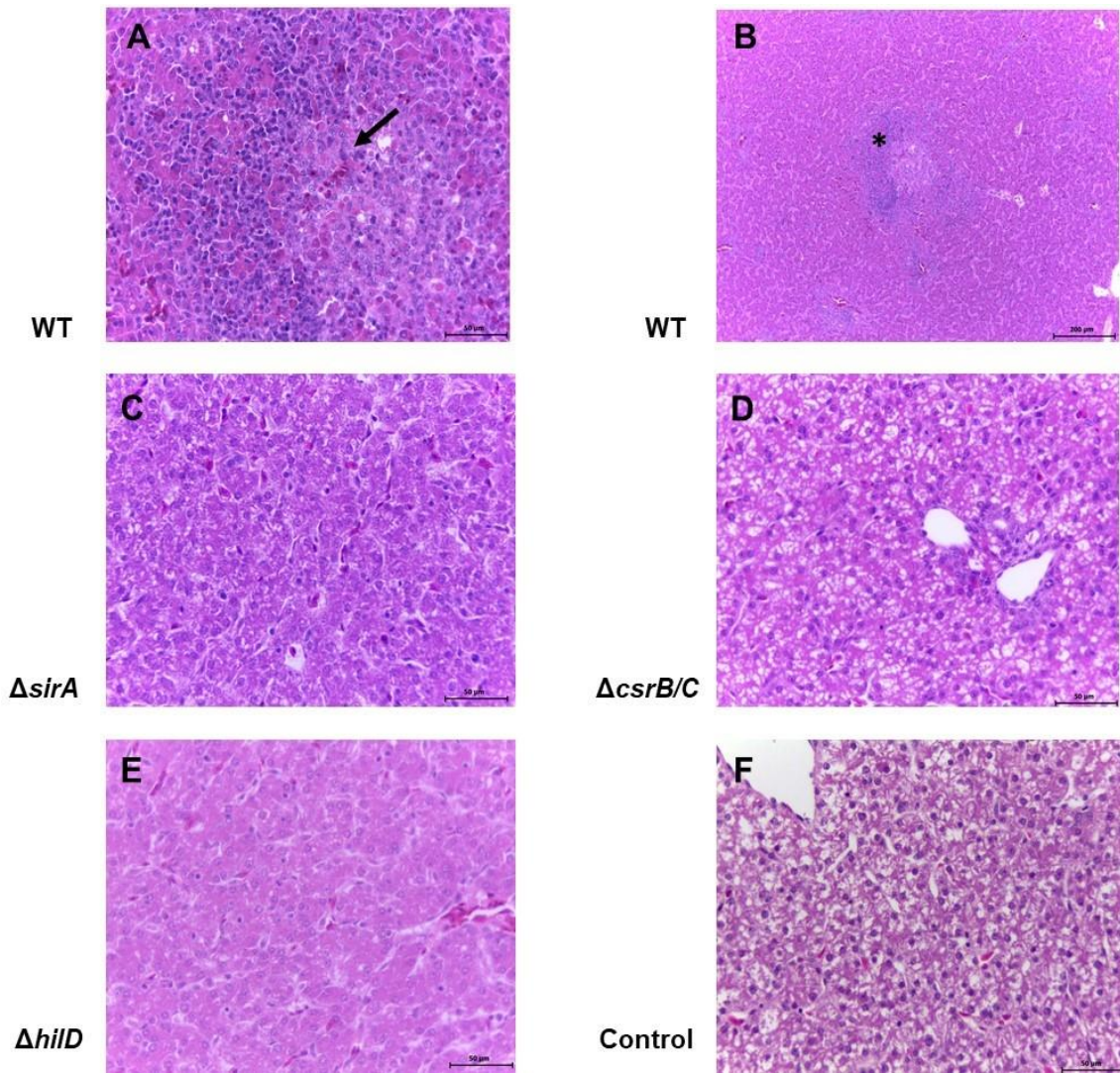
**Figura 16.** Fotomicrografías de cortes de ciego teñidos con HyE de los pollos infectados con las cepas mutantes  $\Delta sirA$  (A, 200  $\mu m$ ) / (B  $\mu m$ ),  $\Delta csrB/C$  (C 200  $\mu m$ ) / (D, 50  $\mu m$ ) o  $\Delta hilD$  (E, 200  $\mu m$ ) / (F, 50  $\mu m$ ) de *S. Typhimurium* provenientes de la infección experimental oral de pollitos de una semana de edad. Las fotografías son de tejidos distintos y representativos de cada grupo.



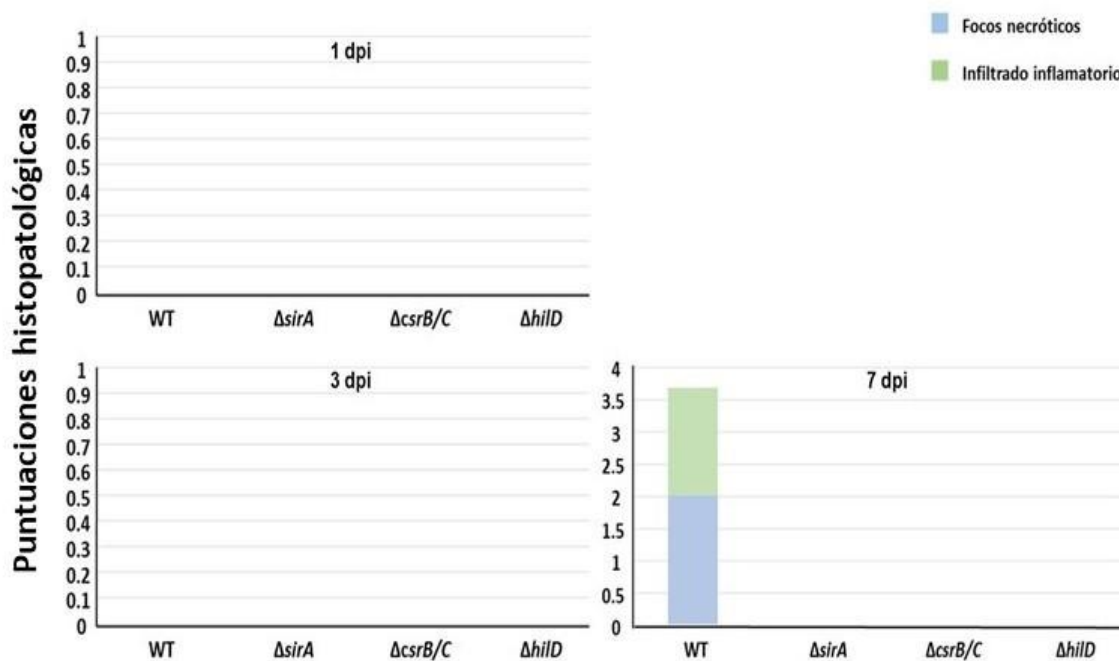
**Figura 17.** Hallazgos histopatológicos de las muestras de ciego provenientes de la infección oral en pollitos de una semana de edad con la cepa silvestre de *S. Typhimurium* SL1344 y las cepas mutantes  $\Delta sirA$ ,  $\Delta csrB/C$  y  $\Delta hilD$ . Los segmentos de la barra indican las medias de cada criterio para ese grupo.

Al evaluar los cortes histológicos de hígados infectados con la cepa WT, se visualizaron focos de necrosis e infiltrado inflamatorio a los 7 dpi de forma escasa; mientras que, en los hígados de aves infectadas con las cepas mutantes, no se encontraron lesiones en ningún momento del análisis histopatológico (Fig. 18 y 19). Estos resultados concuerdan con lo encontrado en el análisis de UFC, en el que no se recuperaron bacterias en este órgano (Fig. 14) y demuestran, que al igual que en aves de un día de edad, SirA, CsrB/C y HilD son necesarios para que *S. Typhimurium* produzca lesiones en ciego e hígado en aves de una semana de edad.





**Figura 18.** Fotomicrografías de cortes de hígados teñidos con HyE de los pollos infectados con la cepa *S. Typhimurium* WT SL1344 (A, 50 μm) / (B, 200 μm) y las cepas mutantes  $\Delta sirA$  (C, 50 μm),  $\Delta csrB/C$  (D, μm) y  $\Delta hilD$  (E, μm) provenientes de la infección experimental oral de pollitos de una semana de edad. Zonas de necrosis hepática (flechas), cúmulos linfoides (asterisco). Control negativo (F, μm). Las fotografías son de tejidos distintos y representativos de cada grupo.



**Figura 19.** Hallazgos histopatológicos de las muestras de hígado provenientes de la infección oral en pollitos de una semana de edad con la cepa silvestre de *S. Typhimurium* SL1344 y las cepas mutantes  $\Delta sirA$ ,  $\Delta csrB/C$  y  $\Delta hilD$ . Los segmentos de la barra indican las medias de cada criterio para ese grupo.

## 6.5 Detección inmunohistoquímica de *Salmonella Typhimurium*

Con el fin de determinar específicamente la localización de *Salmonella* en los tejidos durante la infección, detectamos a la bacteria mediante IHQ. En esta se emplearon los mismos bloques analizados en histopatología que contenían muestras de ciego e hígado, así como un anticuerpo policlonal anti-*Salmonella Typhimurium*.

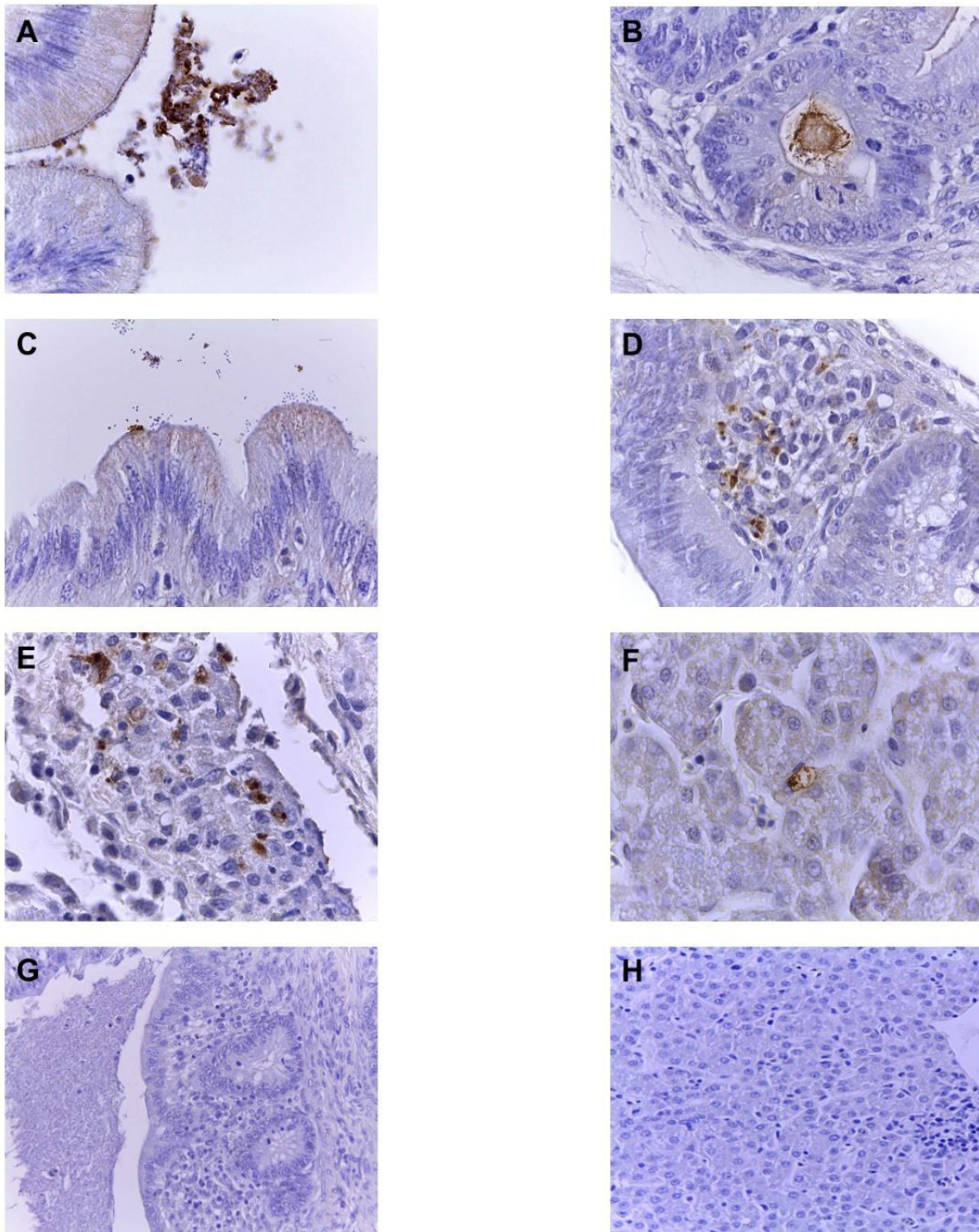
En el primer día post inoculación, tanto en los pollos de 1 día como de 1 semana de edad, la cepa WT se localizó en el lumen cecal (Fig. 20A), criptas intestinales (Fig. 20B) y adherida al epitelio (Fig. 20C), así como asociada a zonas de degeneración epitelial.

Conforme la infección avanzó en los pollos de 1 día de edad, fue posible detectar a la cepa WT dentro de los enterocitos y a las 72 hpi se le detectó dentro de vacuolas en las células de la lámina propia (Fig. 20D), así como dentro de los macrófagos. En el hígado no se observó positividad para *S. Typhimurium*.

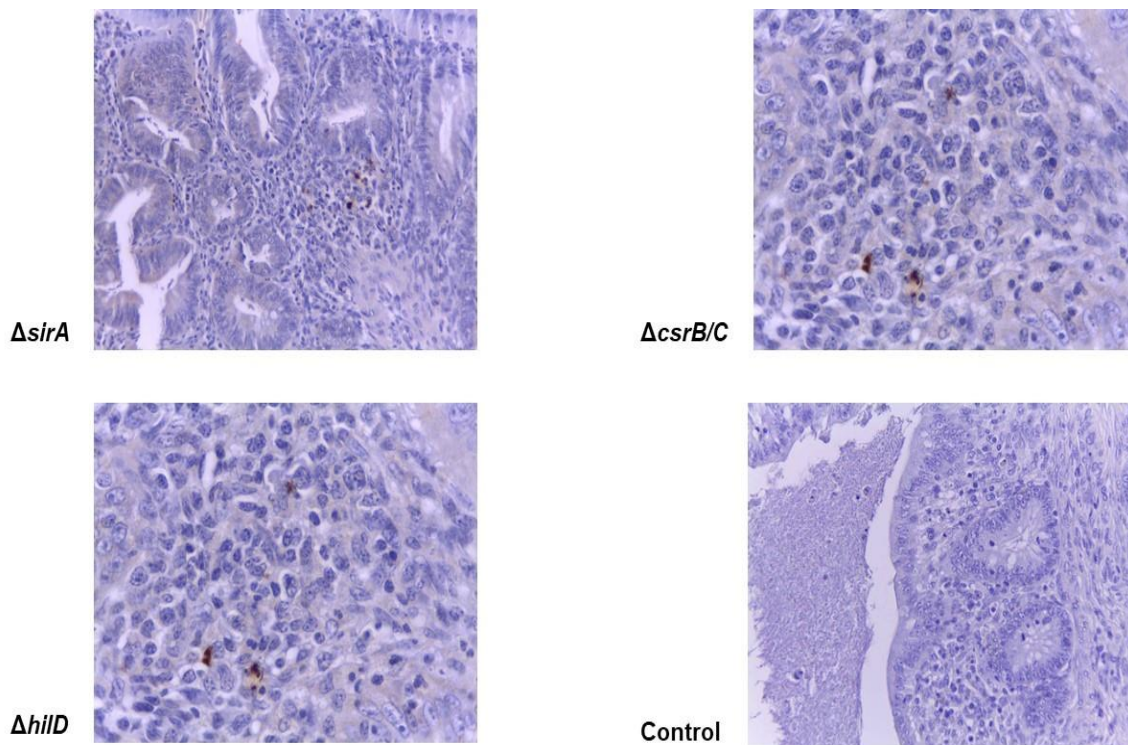
En pollos de 1 semana de edad, a los 3 y 7 dpi la cepa WT fue detectada en el lumen de las criptas, en zonas de úlceras y dentro de enterocitos necróticos (Fig. 20E). A los 7 dpi, también fue localizada multifocalmente en la lámina propia y dentro de algunos macrófagos. En el hígado la cepa WT pudo ser detectada entre los sinusoides hepáticos, así como en el citoplasma de algunos hepatocitos (Fig. 20F).

Por otro lado, focos bacterianos esporádicos y difusos en comparación con la cepa WT, fueron detectados en los ciegos inoculados con las mutantes  $\Delta sirA$ ,  $\Delta csrB/C$  y  $\Delta hilD$  (Fig. 21), tanto en los pollos de 1 día como de 1 semana de edad. Estos focos de marcaje positivo se detectaron en la lámina propia y cabe mencionar que no se encontraron asociados a la presencia de infiltrado inflamatorio.





**Figura 20.** Detección de *S. Typhimurium* mediante inmunohistoquímica en muestras de órganos provenientes de la inoculación oral en el modelo aviar con la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344. Las agrupaciones bacterianas pueden verse como marcas color marrón situadas en distintas zonas del tejido cecal tales como lámina propia lumen cecal (A), criptas intestinales(B), bacterias adheridas al epitelio (C) e intracriptales (F). Controles negativos de ciego e hígado (G y H, respectivamente).



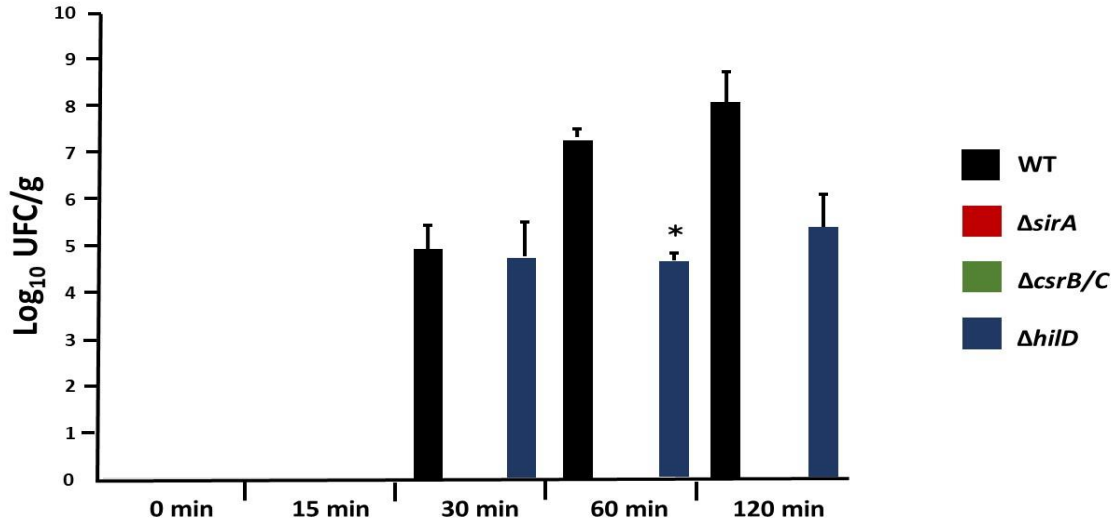
**Figura 21.** Detección de *S. Typhimurium* mediante inmunohistoquímica en muestras de ciego provenientes de la inoculación oral en el modelo aviar con las cepas  $\Delta sirA$ ,  $\Delta csrB/C$  y  $\Delta hilD$  de *S. Typhimurium* SL1344. Las agrupaciones bacterianas pueden verse como marcas color marrón.

### **6.6 La eliminación de SirA, CsrB/C y HilD afecta la colonización de *S. Typhimurium* en las primeras horas en el intestino de pollos de una semana de edad**

Los resultados descritos hasta ahora demostraron una clara participación de SirA, CsrB/C y HilD en el proceso infeccioso de *S. Typhimurium* en el modelo aviar. Posteriormente, quisimos saber si estos genes también podrían contribuir en los primeros momentos de una infección por *Salmonella*, específicamente cuando la bacteria se encuentra en el lumen intestinal, previo a la invasión a las células intestinales. Con el fin de esclarecer esto, se realizó una segunda

inoculación en aves SPF de una semana de edad con una cepa WT de *S. Typhimurium* y las mutantes  $\Delta sirA$ ,  $\Delta csrB/C$  y  $\Delta hilD$ . Posteriormente, se cuantificaron las bacterias recuperadas del lumen cecal a diferentes tiempos después de la inoculación por vía oral (0, 15, 30, 60, 120 min postinfección). Estos tiempos se determinaron tomando en cuenta que en estos animales se han detectado bacterias en el ciego desde 30 min post inoculación vía oral (134) y que el tiempo de tránsito intestinal puede durar en promedio 2-2.5 horas (135).

Como se observa en la figura 22, la recuperación de la cepa WT se detectó a partir de los 30 min de la inoculación con un aumento de manera progresiva en los recuentos a los 60 y 120 min posinoculación. Por su parte no hubo recuperación de las cepas  $\Delta sirA$  y  $\Delta csrB/C$  a ninguna hora. De manera interesante, la cepa  $\Delta hilD$  se detectó a los 30 min en cantidades similares a la cepa WT, pero a diferencia de la cepa WT, sus números no aumentaron conforme prosiguió la infección, por lo que en comparación con los valores de UFCs obtenidos de la WT a los 60 y 120 min posinoculación, esta mutante fue recuperada en cantidades significativamente menores. Estos resultados reafirman la importancia de estos genes para el establecimiento de *Salmonella* en su nicho replicativo desde los primeros min a su llegada al intestino en los pollos de esta edad.



**Figura 22.** Recuperación de *S. Typhimurium* WT SL1344 y las cepas  $\Delta sirA$ ,  $\Delta csrB/C$  y  $\Delta hilD$  de las muestras de ciego provenientes de la infección experimental oral de pollitos de una semana de edad. Los cultivos bacterianos se hicieron en agar LB y los resultados se expresan en UFC/g. Los asteriscos indican diferencias significativas con la WT ( $P < 0,05$ ).

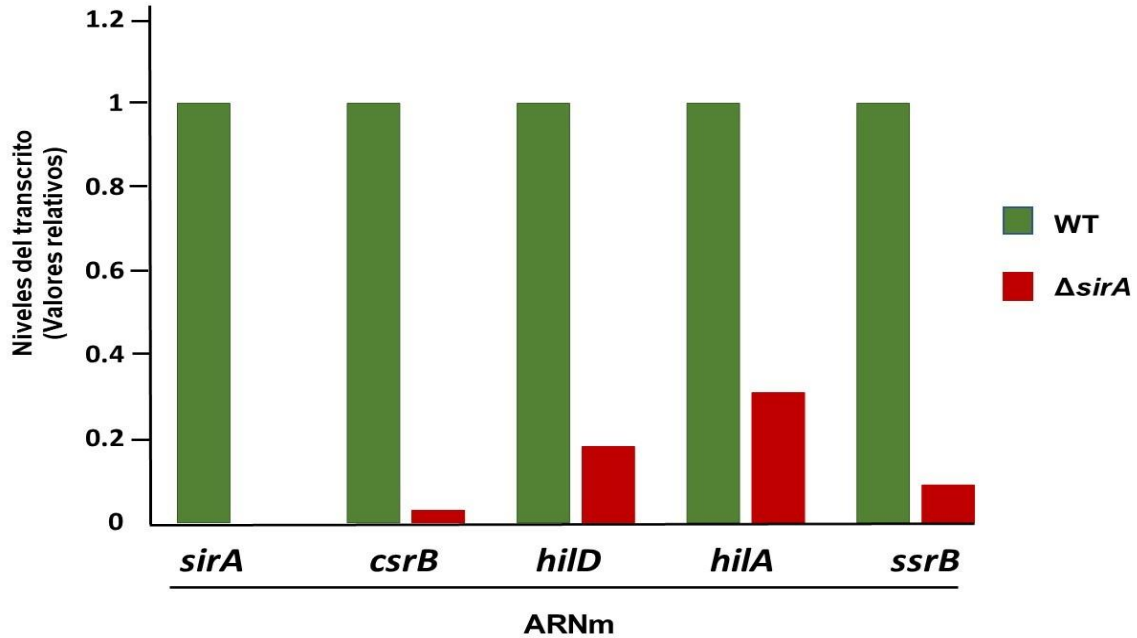
### 6.7 SirA, CsrB y HilD actúan en cascada para controlar la expresión *in vivo* de *hilA* y *ssrB*, en el lumen intestinal aviar

*In vitro*, se ha observado que SirA regula la expresión de SPI-1 y SPI-2 al inducir directamente la expresión de *csrB* y *csrC*, dos ARNs que desreprimen la traducción de HilD, que una vez activa, induce la expresión de *hilA* y *ssrB* (129, 130). Los resultados descritos en este trabajo y los reportados previamente (129, 130), sugieren que la cascada conformada por SirA, CsrB/C y HilD puede controlar la expresión de la SPI-1 y SPI-2 en el momento en que *Salmonella* está en el lumen intestinal, previo a la invasión celular. Por tanto, posteriormente quisimos corroborar por un lado, que estos genes efectivamente se encuentran conformando una cascada reguladora *in vivo* y además, que para controlar la expresión de SPI-1 y SPI-2 esta cascada se expresa antes de que la bacteria

invada las células intestinales. Para esto se analizó la expresión de los genes que conforman la cascada reguladora, en la cepa WT y las mutantes  $\Delta sirA$ ,  $\Delta csrB/C$  y  $\Delta hilD$ , mediante ensayos de PCR en tiempo real empleando ARN extraído del contenido cecal a los 120 min post inoculación, momento en el que *Salmonella* se encuentra en el lumen intestinal, previo a la invasión de los enterocitos (134).

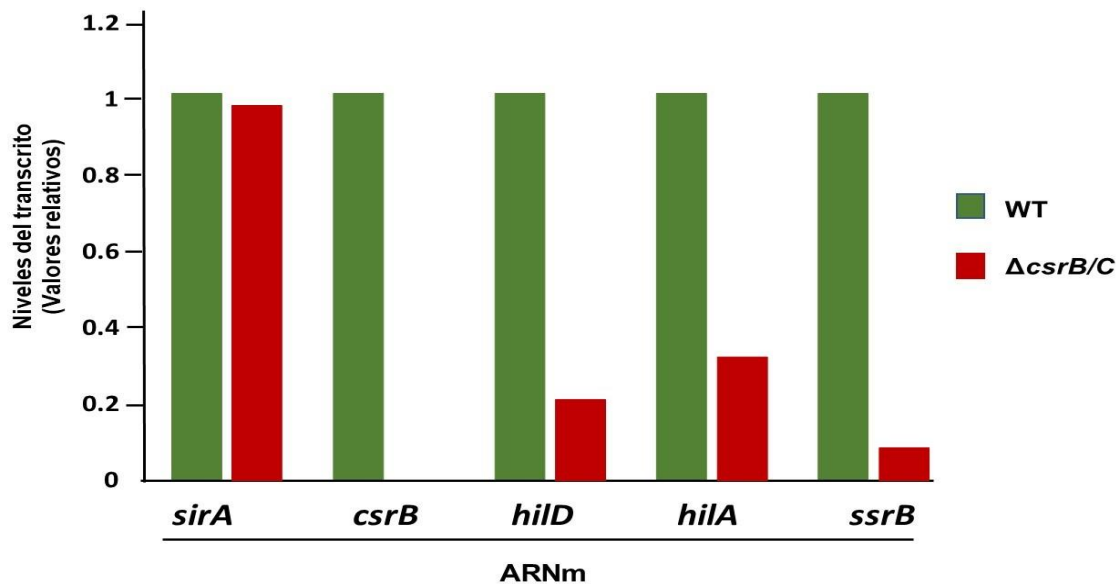
Primero analizamos la expresión de los genes de la cascada en una cepa mutante  $\Delta sirA$ , el regulador de respuesta que se encuentra al inicio de la cascada reguladora y que por tanto controla la expresión secuencial de *hilA* y *ssrB* a través del sistema CsrB/C y de HILD (130). Como se esperaba, los niveles de expresión de *hilA*, *ssrB*, *hilD* y *csrB*, genes que están por debajo de SirA en la cascada, disminuyeron al compararlos con su expresión en una cepa WT (Fig. 23). Estos resultados muestran que SirA controla positivamente la expresión del resto de genes de la cascada cuando *Salmonella* se encuentra en el lumen intestinal del pollo y corroboran que SirA es el regulador que comenzaría la cascada reguladora.





**Figura 23.** Expresión relativa del ARNm de *sirA*, *csrB*, *hilD*, *hilA* y *ssrB* usando ARN bacteriano extraído del contenido cecal de pollos infectados a la semana de edad con una cepa WT y una mutante  $\Delta sirA$  de *S. Typhimurium*. Las muestras se tomaron a los 120 min de la inoculación por vía oral.

Siguiendo con el orden de la cascada propuesta *in vitro*, para determinar si el sistema CsrB/C controla la expresión *in vivo* de *hilD*, *hilA* y *ssrB*, pero no de *sirA* (gen que lo precedería en la cascada), se analizó la expresión de todos los genes en la mutante  $\Delta csrB/C$ . La expresión de *hilA*, *ssrB* y *hilD* en esta mutante, se afectó en comparación con su expresión en la cepa WT (Fig. 24); en cambio, la expresión de *sirA* no se afectó, lo que demuestra que el sistema CsrB/C controla la expresión de *hilD*, *hilA* y *ssrB*, pero no de *sirA*, mientras *S. Typhimurium* está en el lumen intestinal. Esto comprueba que CsrB y CsrC se encuentran por debajo de SirA, controlando la expresión de *hilD* y por tanto del resto de los genes de SPI-1 y SPI-2.

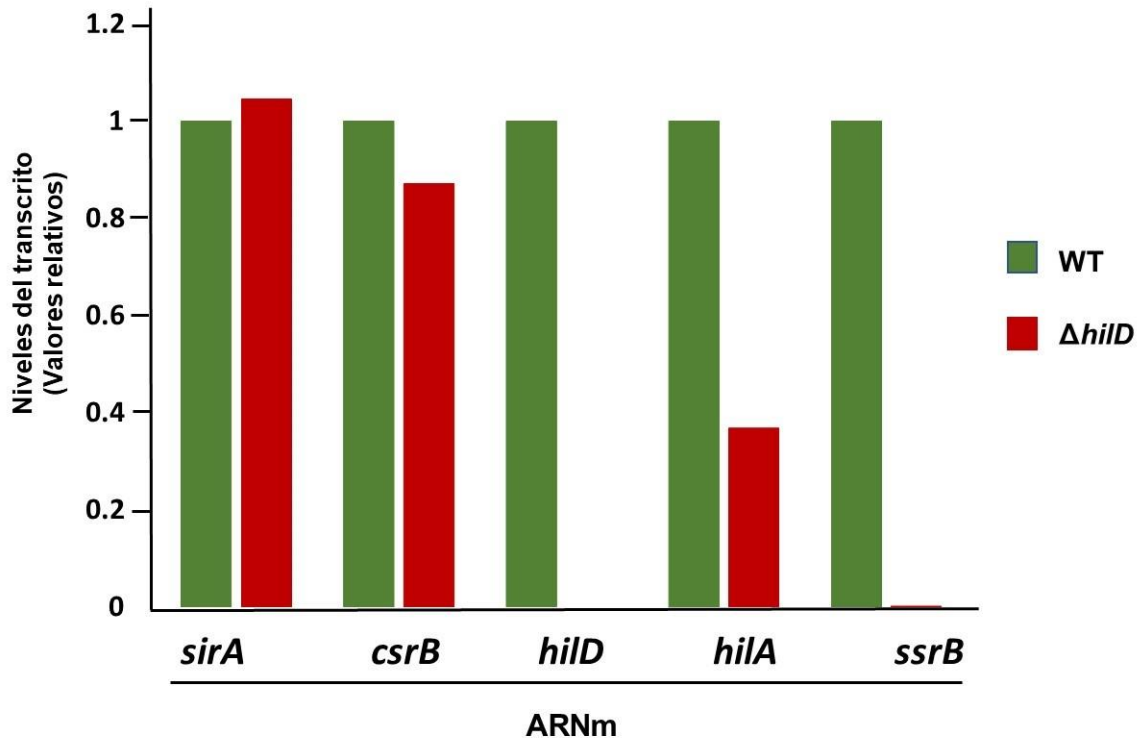


**Figura 24.** Expresión relativa del ARNm de *sirA*, *csrB*, *hilD*, *hilA* y *ssrB* usando ARN bacteriano extraído del contenido cecal de pollos infectados a la semana de edad con una cepa WT y una mutante  $\Delta csrB/C$  de *S. Typhimurium*. Las muestras se tomaron a los 120 min de la inoculación oral.

Por último, se analizó la expresión de los genes de la cascada en una cepa  $\Delta hilD$  con el propósito de determinar si este regulador transcripcional afecta la expresión *in vivo* de *hilA* y *ssrB* al igual que en medio LB (129), pero no la de *csrB* y *sirA*, genes que preceden a *hilD* en la cascada reguladora. Como se muestra en la figura 25, la expresión de *hilA* y *ssrB* disminuyó en la mutante  $\Delta hilD$ , siendo más drástico el decremento en *ssrB*. Por el contrario, la expresión de *csrB* y *sirA* no se vio afectada en la cepa  $\Delta hilD$ , lo que demuestra que, en el lumen intestinal, *hilD* controla la expresión de *hilA* y *ssrB*, pero no de *sirA* y *csrB*.

En conjunto, estos resultados comprueban que SirA, CsrB/CsrC y HilD, se encuentran formando una cascada reguladora que se activa *in vivo* en el lumen

intestinal de los pollos, para inducir la expresión de *hilA* y *ssrAB* y por tanto de SPI-1 y SPI-2, antes de que *Salmonella* invada el intestino.



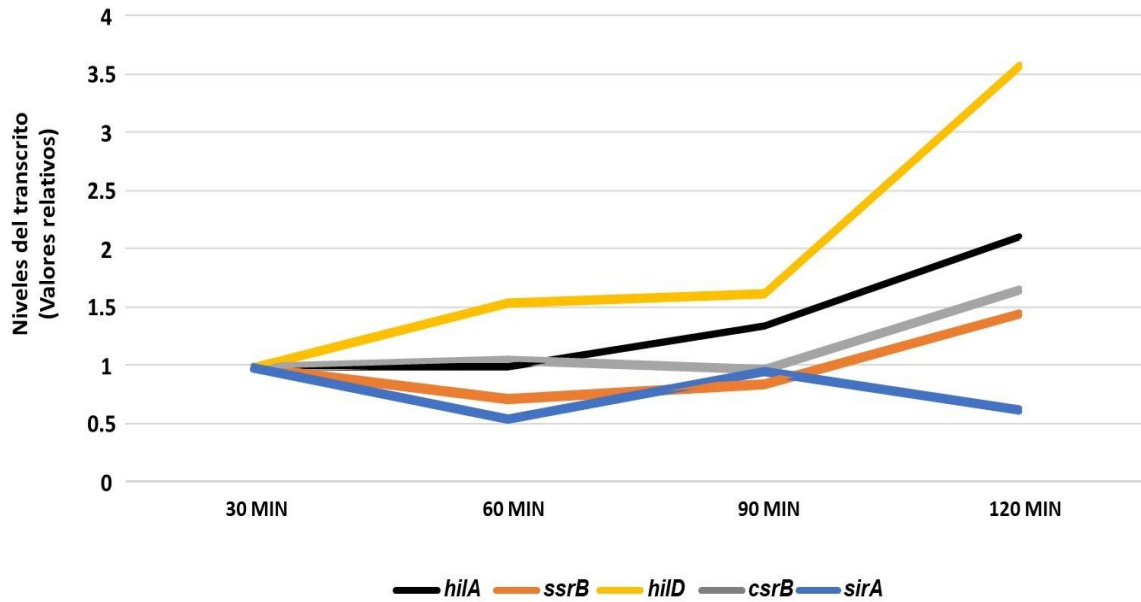
**Figura 25.** Expresión relativa del ARNm de *sirA*, *csrB*, *hilD*, *hilA* y *ssrB* usando ARN bacteriano extraído del contenido cecal de pollos infectados a la semana de edad con una cepa WT SL1344 y una mutante  $\Delta hilD$  de *S. Typhimurium*. Las muestras se tomaron a los 120 min de la inoculación por vía oral.

### 6.8 Los genes que controlan la expresión *in vivo* de la SPI-1 y 2 de *S. Typhimurium* van incrementando su expresión a través del tiempo y previo a la invasión intestinal

Por último, se quería conocer la cinética de expresión de los genes que conforman la cascada reguladora *in vivo* y previo a la invasión intestinal. Para esto, se utilizó el ARN total extraído del contenido cecal proveniente de la inoculación oral en aves de una semana de edad con la cepa WT de *S.*

*S. Typhimurium*. Debido a que se recuperó *Salmonella* desde los 30 min y hasta los 120 min posinoculación (Fig. 22), se determinó analizar la expresión de los genes de interés en este rango de tiempo a través de PCR en tiempo real. Como se aprecia en la figura 26, la expresión de los genes *hilA*, *ssrB*, *hilD*, *csrB/C* se incrementa con el paso de los min en el lumen cecal, siendo más evidente a los 120 min, particularmente *hilA* y *hilD*. Por su parte la expresión de *sirA* no tuvo un incremento en su expresión en los tiempos analizados, sino que su expresión fue constante desde el inicio, lo que sugiere que se necesitaría una expresión de tipo constitutiva de este gen y que ésta es suficiente para inducir la expresión del resto de genes de la cascada.

En conjunto, estos resultados muestran que los genes involucrados en la expresión de las SPIs de *S. Typhimurium* incrementan su actividad desde que se encuentran en el lumen intestinal, previo a la invasión intestinal.



**Figura 26.** Cinética de la expresión de los genes *sirA*, *csrB*, *hilD*, *ssrB* y *hilA* usando ARN bacteriano extraído del contenido cecal de pollos infectados a la semana de edad con la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344. Las muestras se tomaron a los 30, 60, 90 y 120 min de la inoculación por vía oral.

## 7. Discusión

Las islas de patogenicidad tienen una función importante en la patogenia de *S. Typhimurium*. Mientras que la SPI-1 participa en la invasión a las células epiteliales, la SPI-2 está involucrada en la supervivencia y proliferación intracelular (21). Sin embargo, Coombes *et al* mostraron que algunos genes que codifican proteínas efectoras de la SPI-2 se expresan antes de la invasión intestinal de *S. Typhimurium* (131). Además, se ha reportado que los reguladores globales SirA y CsrB/C, así como el regulador transcripcional codificado en la SPI-1, HilD, forman una cascada reguladora que controla positivamente la expresión de *hilA* y *ssrAB*, reguladores centrales de SPI-1 y SPI-2, respectivamente (129, 130). Este sistema regulador funciona cuando *S. Typhimurium* crece en medio LB, por tanto, se sugirió que también se podría expresar cuando la bacteria se encuentra en el lumen del intestino, previo a la invasión de las células del hospedador.

En este trabajo quisimos demostrar si el sistema SirA-Csr-HilD forma una cascada *in vivo*, y si este sistema regulador induce la expresión del regulador *ssrB*, y en consecuencia, de la SPI-2. Para esto, realizamos infecciones en pollos (modelo animal que presenta tanto colonización intestinal como enfermedad sistémica por *Salmonella*) con una cepa WT de *S. Typhimurium* y sus derivadas mutantes en los genes que conforman la cascada (*sirA*, *csrB/C* y *hilD*).

Primero, quisimos saber si estos genes contribuían a la colonización intestinal y diseminación hepática en nuestro modelo animal. Demostramos que cepas de *Salmonella Typhimurium* mutantes en *sirA*, *csrB/C* o *hilD* colonizan el

ciego de pollos de un día de edad en menor cantidad que una cepa WT desde 24 hasta 72 hpi (Fig. 6). Además, mostramos claramente que estos genes se requieren para la diseminación hepática, ya que las cepas  $\Delta sirA$  y  $\Delta csrBC$  se recuperaron en menor cantidad a las 24 hpi en comparación con la cepa WT, y ninguna de las 3 cepas ( $\Delta sirA$ ,  $\Delta csrBC$  y  $\Delta hild$ ) fue recuperada a las 48 y 72 hpi (Fig. 7).

En aves de una semana de edad, todas las cepas mutantes colonizaron el ciego en menor cantidad que la cepa WT a partir de los 3 dpi (Fig.13). Interesantemente, ninguna de las cepas mutantes logró diseminarse sistémicamente, a diferencia de la cepa WT, que se recuperó a partir de los 3 dpi (Fig. 14).

En cuanto a las diferencias en los recuentos bacterianos de la cepa WT en nuestros dos modelos de infección, está documentado que en aves de 1 día de edad, *S. Typhimurium* puede ser recuperada en ciego e hígado en mayores cantidades que en aves de una semana de edad (10). Lo anterior puede ser debido a que las aves de una semana de edad tienen mayor madurez inmunológica, así como la microbiota más desarrollada, lo que puede limitar el crecimiento y supervivencia de la bacteria.

Estudios previos han reportado la importancia de la SPI-1 y SPI-2 durante una infección en distintos modelos animales como el aviar, bovino y murino (10, 133, 136, 137). Sin embargo, el efecto individual de los genes que conforman la cascada reguladora de interés en este estudio no ha sido ampliamente estudiado en modelos animales o cultivo celular. Respecto a esto, se ha reportado que

mutantes en *sirA*, *csrB/C* y *hilD* de *S. Typhimurium* se ven afectadas en la invasión a líneas celulares como HEp-2 y HeLa (105, 138, 139). Eade *et al.*, mostraron que, en pollos inoculados a los 4 días de edad con mutantes *hilD*, no hubo diferencias significativas en la colonización cecal con respecto a la cepa WT en los primeros 2 dpi, pero sí a los 9 dpi (140). De forma similar, aquí no se encontraron diferencias en la colonización cecal entre la cepa WT y la  $\Delta$ *hilD* en aves de una semana a los días 1 y 3 posinoculación, pero sí a los 7 dpi (Fig. 13). Si bien, hay diferencias en la práctica experimental en los dos trabajos, podemos especular que, en aves cercanas a la semana de edad, el regulador HilD no es indispensable en estas primeras etapas de la infección. En contraste, las dos mutantes  $\Delta$ *sirA* y  $\Delta$ *csrB/C* sí estuvieron afectadas en la colonización intestinal a partir de los 3 dpi (Fig. 13) en comparación con la cepa WT. La diferencia entre estas dos mutantes y la mutante  $\Delta$ *hilD*, puede atribuirse a que SirA y CsrB/C, son reguladores globales que controlan no solo la expresión de las SPIs, sino también la de otros procesos metabólicos en la bacteria que pueden contribuir a la colonización (101, 111); a diferencia de HilD que es un regulador específico de las islas (120, 131). Conforme la infección progresó, la presencia de HilD fue necesaria, puesto que la mutante  $\Delta$ *hilD* se vio afectada en la colonización del ciego, lo que confirma que este regulador es fundamental para el establecimiento exitoso de *Salmonella* en el intestino debido a la activación de la SPI-1. Así mismo, se requerirá estudiar otros elementos del genoma de *Salmonella* (SPI-5, SPI-6) para determinar de qué forma pueden estar involucrados en la colonización *in vivo* durante distintas etapas de la infección.



Interesantemente tanto en pollos de un día como de una semana de edad, la recuperación de las tres mutantes en el hígado se vio severamente afectada (Fig. 7 y 14). Eade *et al.*, mostraron que en aves de 4 días de edad, mutantes en *hilD* colonizaron el bazo en menor cantidad 2 dpi, en comparación con una cepa WT (140). La baja recuperación bacteriana en ciegos en las aves inoculadas con las mutantes explicaría la escasa recuperación en hígado debido a que menos bacterias llegarían exitosamente a sitios sistémicos. El análisis de los conteos bacterianos empleando mutantes en los reguladores SirA, CsrB/C y HilD mostró que estos reguladores tienen una clara participación en la supervivencia y proliferación en órganos como el hígado debido a su participación en la activación *in vivo* de genes de las SPIs.

Con base en estudios previos y nuestros resultados (Fig. 6, 7, 13 y 14), ampliamos el entendimiento sobre el papel de *sirA*, *csrBC*, y *hilD* de *S. Typhimurium* en el proceso infeccioso. La participación individual de los genes de la cascada *sirA*, *csr* y *hilD in vivo* no se había estudiado hasta este trabajo. Mostramos claramente que estos reguladores están involucrados en la colonización intestinal y la diseminación a órganos como el hígado en un modelo aviar de un día y una semana de edad.

En este estudio, también realizamos el análisis histopatológico de lesiones encontradas en ciego e hígado de las aves de un día y una semana de edad, infectadas con la cepa WT de *S. Typhimurium* y las mutantes de interés.

A las 24 hpi se encontraron bacterias intraluminales e intracriptales y degeneración vacuolar y cuerpos apoptóticos en el tejido epitelial, así como

exocitosis linfocítica intraepitelial (Fig. 8), que aumentaron conforme fue progresando la infección (Fig. 10). En aves de una semana de edad con la cepa WT (Fig. 15), también se encontró la presencia de degeneración vacuolar y cuerpos apoptóticos a partir del primer dpi con un aumento progresivo hasta los 7 días. Se recuperaron bacterias intraluminales e intracriptales, y se observó exocitosis heterofílica e intraepitelial hasta los 3 dpi (Fig. 15). Estos hallazgos se dieron en menor proporción que las aves de un día de edad (Fig. 10 y 17). Estos resultados comparados con los obtenidos en los recuentos bacterianos, reflejan claramente que la cantidad de bacterias presentes en ciego e hígado, se correlaciona con la cantidad de hallazgos patológicos encontrados en estos órganos.

En las aves de un día de edad inoculadas con las cepas mutantes se encontraron cuerpos apoptóticos y bacterias en lumen y criptas a las 24 hpi. A las 48 hpi se observó además degeneración vacuolar y exocitosis; todas estas lesiones se vieron a las 72 hpi pero en cantidades drásticamente menores en comparación con las observadas en la cepa WT (Fig. 9 y 10). En los pollos de una semana de edad inoculados con las mutantes sólo se halló la presencia de degeneración vacuolar y cuerpos apoptóticos en el primer dpi, aunque en menor cantidad que los infectados con la cepa WT (Fig. 16 y 17). A los 3 y 7 dpi, las cepas mutantes produjeron lesiones mínimas y casi imperceptibles en comparación con la cepa WT (Fig. 16 y 17).

Por su parte, en el hígado, la cepa WT indujo infiltrado inflamatorio y focos de necrosis en los dos modelos de infección siendo más aparente en las aves de un día de edad (Fig. 11, 12, 18 y 19).

En general, se encontró que, en aves inoculadas con las mutantes  $\Delta sirA$ ,  $\Delta csrBC$  y  $\Delta hilD$ , la producción de lesiones en ciego se ve disminuida, siendo más drástica la diferencia a partir de 48 hpi en aves de un día de edad y 3 dpi en aves de una semana de edad (Fig. 8, 9, 10, 15, 16 y 17). Por su parte, en el hígado no se hallaron lesiones tanto en aves de un día como de una semana de edad inoculadas con las cepas mutantes, a diferencia de las lesiones que produjo la cepa WT (Fig. 11, 12, 18 y 19). Como se esperaba, el descenso en los recuentos bacterianos en los órganos de interés debido a la ausencia de *sirA*, *csrB/C* y *hilD*, tiene como consecuencia una disminución en la producción de lesiones.

El efecto de la SPI-1 y 2 en la producción de lesiones se ha estudiado en ratones pretratados con estreptomicina, un modelo en el que se afecta a la microbiota y por tanto se permite el desarrollo de colitis inducida por *Salmonella*. En este modelo es notoria una atenuación en el infiltrado de células inflamatorias en mucosa intestinal, la necrosis intestinal y edema submucoso al inocularlos con salmonelas que carecen del SST3 de la SPI-1 y SPI-2. Respecto al papel de los reguladores de las SPIs, en especies como el bovino, *sirA* y *hilA* tienen un papel clave en la producción de lesiones, tal como lo demostraron Ahmer *et al.* en un estudio en asas ileales ligadas de bovinos, en el que demostraron que *sirA* y *hilA* se requieren para la acumulación de líquido en el intestino, así como la migración de neutrófilos (137). Además, Eade *et al.* reportaron que *hilD* está involucrado en

la producción de lesiones en el tejido cecal en pollos de un día de edad (140). Por tanto, nuestros resultados son consistentes con estudios previos y muestran que estos reguladores de *Salmonella* están claramente involucrados en la producción de lesiones *in vivo*.

Así como en los recuentos bacterianos, las diferencias en los hallazgos histopatológicos entre las aves de un día y una semana de edad, se pueden atribuir a factores como una respuesta inmune innata mejor desarrollada en aves de una semana de edad (10, 137, 138), así como una microbiota más poblada en estas aves, la cual competiría con *S. Typhimurium* por sitios de unión y nutrientes y explicaría por qué la cepa WT se recuperó en mayor cantidad en aves de un día de edad (10, 141, 142).

Por otra parte, en este trabajo, también se realizó inmunohistoquímica en el tejido cecal y hepático de las aves de una semana y un día de edad inoculadas con la cepa WT y sus derivadas mutantes. En los dos modelos estudiados, se pudo localizar la cepa WT en lumen, criptas y epitelio cecal desde el primer día posinoculación (Fig. 20). Conforme la infección progresó en los dos modelos, la bacteria se localizó dentro de enterocitos, macrófagos y lámina propia. Por su parte, las salmonelas carentes de SirA, HilD y CsrB/C se hallaron solo como pequeños focos difusos en lámina propia (Fig. 21).

Hasta la publicación de este trabajo, no encontramos algún estudio en el que se haya intentado localizar cepas de *Salmonella* carentes de nuestros genes de interés (*sirA*, *hilD* y *csrB/C*) a lo largo de una infección, por medio de inmunohistoquímica. Con relación a los hallazgos en la cepa WT, otros estudios

han empleado esta técnica con éxito para detectar a la bacteria en tejidos intestinales como el íleon y ciego de cerdos, ya sea individualmente o agrupadas entre el tejido, mucosa, intracelularmente, macrófagos y lámina propia (143, 144). Similar a nuestros resultados, la bacteria se pudo detectar desde el primer dpi hasta los 6 días y el marcaje positivo aumentó mientras la infección progresaba. Estos hallazgos ponen en evidencia que la bacteria puede localizarse y persiste con éxito en distintas zonas del tejido cecal a lo largo del curso de la infección *in vivo*. Además, al igual que para la colonización intestinal, diseminación hepática y producción de lesiones, los genes de la cascada *sirA*, *hilD* y *csrB/C* son requeridos para que la bacteria pueda ser detectada en tejidos durante el curso de la infección.

Martínez *et al.*, demostraron la existencia de una cascada reguladora que controla la expresión de *hilD*, y por tanto de ambas islas, cuando *Salmonella* Typhimurium crece en LB (130) (Fig. 5). En esta cascada, cuando SirA está activa, induce la expresión de los ARNs no codificantes CsrB y CsrC. Estos a su vez, se unen a la proteína CsrA y la secuestran del ARNm de *hilD*, contrarrestando así el efecto represor de CsrA sobre la traducción de HilD. Después, HilD desplaza al regulador negativo H-NS del promotor de *hilA* y *ssrAB*, con lo que desreprime la expresión de estos reguladores centrales de SPI-1 y SPI-2, respectivamente, y con ello se induce la expresión del resto de los genes de cada isla (130).

Con nuestros resultados demostramos que SirA, CsrB/C y HilD contribuyen de manera individual en el proceso de colonización cecal. Para esto,

cuantificamos las bacterias recuperadas del contenido cecal de pollos infectados con las diferentes cepas a distintos tiempos (0, 15, 30, 60 y 120 min) después de la inoculación. Respecto a los tiempos en los que se hizo este análisis, tomamos en cuenta que en estos animales se han detectado bacterias en ciego desde 30 min después de su inoculación (134), así como el tiempo de tránsito intestinal (120 min aprox.) (135). Así, este intervalo de tiempo que determinamos para el análisis, nos ayudaría a detectar a *Salmonella* cuando se encuentra en el lumen cecal, antes de la invasión al intestino.

Los resultados (Fig. 22) mostraron que, en los primeros minutos posinoculación, se requieren *sirA* y *csrB/C* en el establecimiento de *Salmonella*, ya que no se recuperó la bacteria a ningún tiempo. Acerca de estos hallazgos, se conoce que el regulador de respuesta SirA es necesario en *Salmonella* y otras especies de bacterias para la síntesis de factores de virulencia, producción de exoenzimas, motilidad y formación de biopelículas (101, 102, 145); por lo que su ausencia no sólo afectaría la síntesis del SST3 de la SPI-1 y SPI-2, sino que también tendría efecto negativo en otros procesos metabólicos necesarios para que la bacteria sobreviva en el hostil ambiente intestinal en estas aves. En cuanto al sistema CsrB/C, cuya eliminación tuvo un efecto drástico en la detección de bacterias intraluminales, se sabe que su regulación es controlada en mayor medida por el sistema de dos componentes BarA-SirA de *Salmonella* y su ortólogo BarA-UvrY en *Escherichia coli* (130, 146, 147). Por lo tanto, aunque SirA esté presente, en una mutante *csrB/C* la expresión de numerosos genes que codifican una amplia variedad de funciones celulares en *Salmonella*, se verían

afectados, lo que explicaría el motivo por el que la cepa  $\Delta csrB/C$ , al igual que la  $\Delta sirA$ , no se recuperó en los recuentos bacterianos.

El regulador transcripcional *hilD* es necesario para la inducción de *hilA* y *ssrB* en condiciones *in vitro* (130), y no se conoce que controle otros procesos celulares como metabolismo central del carbono, la motilidad o formación de biopelículas. Lo anterior podría explicar que, a diferencia de las mutantes en *sirA* y *csrB/C*, en ausencia de *hilD*, *Salmonella* pudo ser recuperada 30 min postinfección en cantidades similares a la cepa WT, pero menores a los 60 y 120 min postinfección en comparación con la WT. En conjunto, estos resultados muestran que SirA, el sistema CsrB/C, así como HilD (este último en menor medida) tienen un impacto sustancial cuando *Salmonella* comienza su adaptación en el lumen cecal en pollos de una semana de edad.

Para analizar si estos genes actúan *in vivo* en forma de cascada, es decir, en el momento en que *Salmonella* logra llegar al lumen cecal, previo a la invasión intestinal, realizamos infecciones en pollos SPF de 1 semana de edad (modelo animal que presenta colonización intestinal) con la cepa WT y las cepas  $\Delta sirA$ ,  $\Delta csrB/C$  y  $\Delta hilD$ , para posteriormente analizar la expresión de *sirA*, *csrB/C*, *hilD*, *hilA* y *ssrB* en la cepa WT y las mutantes. Para esto empleamos el contenido cecal obtenido a los 120 min posinoculación, tiempo aproximado de tránsito intestinal en pollos (135).

Al analizar la expresión de los genes que conforman este sistema en la cepa  $\Delta sirA$  de *S. Typhimurium*, observamos que la expresión de *csrB*, *hilD*, *hilA* y *ssrB* disminuyó en comparación con la cepa WT (Fig. 23). Esto demuestra que estos

genes están debajo de SirA y corroboran que el regulador de respuesta SirA se encuentra en el inicio de la cascada reguladora. Este resultado coincide con lo visto en otros trabajos en donde la actividad de la proteína SsrB y fusiones transcripcionales de las regiones reguladoras de *hilA* y *hilD*, disminuyeron significativamente *in vitro* en una cepa de *S. Typhimurium* carente de SirA (129, 130, 145).

Posteriormente, analizamos la expresión de los genes de la cascada en la doble mutante  $\Delta csrB/C$ . Como se esperaba, la expresión de *hilD*, *hilA* y *ssrB* disminuyó drásticamente en comparación con la cepa WT (Fig. 24), mientras que la expresión de *sirA* no se vio afectada en esta mutante, lo que confirma que *csrB* está por debajo de SirA en la cascada reguladora de las SPIs. Esto concuerda con lo observado *in vitro* por Martínez *et al.*, en donde la expresión de estos mismos genes también se veía afectada en una doble mutante  $\Delta csrB/C$  de *Salmonella* cuando estas cepas crecen en medio LB (130). Nuestros hallazgos demuestran la participación del sistema CsrB/C en la cascada reguladora de las SPIs en el momento en que *Salmonella* se encuentra en el lumen intestinal.

Finalmente, para saber si HilD controlaba *in vivo* la expresión de *hilA* y *ssrB*, pero sin afectar la actividad de *sirA* y *csrB*, que están por arriba de *hilD* en la cascada reguladora, analizamos la expresión de estos genes en una cepa  $\Delta hilD$ . Nuestros resultados confirmaron que tanto *hilA* como *ssrB* tuvieron un claro decremento en su expresión al compararla con una cepa WT, siendo más marcado en *ssrB* (Fig. 25), pero no se afectó la expresión de *sirA* y *csrB*. Esto confirma que *in vivo*, SirA y CsrB están por arriba de HilD en esta cascada



reguladora. Estos resultados son consistentes con lo observado en otros trabajos en los cuales HilD es indispensable para que *hilA* y el sistema de dos componentes *ssrAB* se exprese cuando *Salmonella* crece en medio LB (110, 124, 130, 148).

Finalmente, se analizó la cinética de la expresión *in vivo* de todos los genes que conforman esta cascada (Fig. 26). Todos los genes, excepto *sirA*, mostraron un incremento gradual en su expresión desde los 30 min posinoculación. Esto sugiere que probablemente *in vivo*, solo se requiera la expresión constitutiva de *sirA* para que active la expresión del resto de genes de la cascada. El sistema de dos componentes SirA/BarA además de estar relacionado con la expresión de los genes de las SPIs, es un regulador global de genes de virulencia y metabólicos, lo que explicaría su expresión constitutiva *in vivo* (101, 137). Por otra parte, estudios han demostrado que existen otros reguladores como *slyA*, *grhD1*, *ompR* y *phoP* que pueden estar involucrados en la expresión *in vivo* de los genes de las islas (105, 120).

En conjunto, nuestros resultados confirman que *in vivo*, el sistema SirA, CsrB/C y HilD conforman una cascada que se requiere para la expresión de *hilA* y *ssrB* en el lumen intestinal aviar (Fig. 23, 24 y 25). Con relación a esto, es importante tener en cuenta que en condiciones de laboratorio esta cascada funciona cuando *S. Typhimurium* es crecida específicamente en medio LB, cuyos elementos parecen favorecer la expresión secuencial de *hilA* y *ssrB* (129). Sin embargo, SirA y HilD no se requieren para la expresión de los genes de la SPI-2 cuando la bacteria crece en medios mínimos ácidos MM-N con baja

concentración de magnesio y fosfatos (129, 130). En esta condición de crecimiento, y para la supervivencia en macrófagos, los sistemas de dos componentes EnvZ/OmpR, PhoP/PhoQ y el regulador SlyA son indispensables para la expresión de los genes del operón *ssrAB*, y con ello, el resto de los genes de la SPI-2 (116, 149).

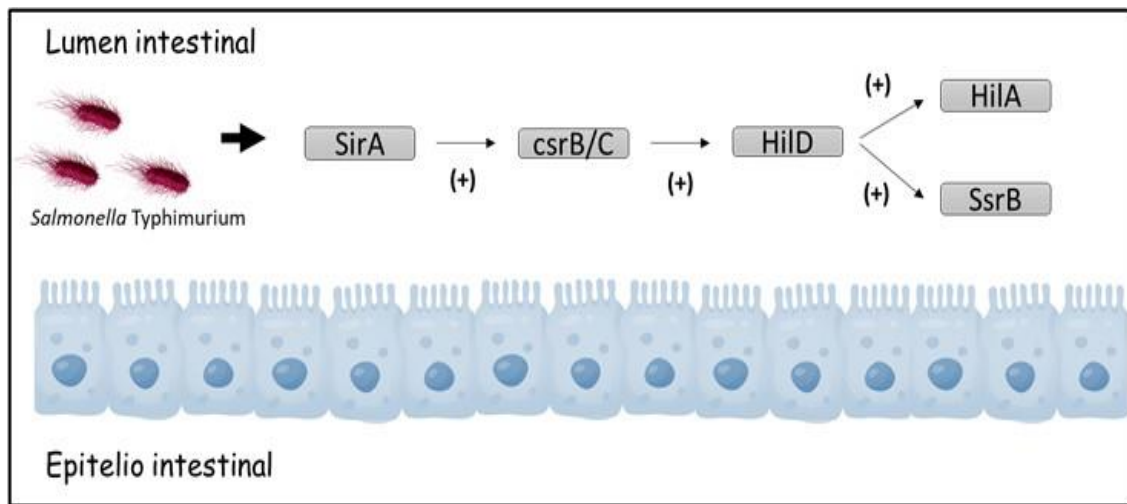
Lo anterior sugiere dos mecanismos para la expresión del regulador *ssrB* y el resto de la SPI-2 con base en las distintas señales fisicoquímicas y ambientales que *S. Typhimurium* detecta. El primero sería necesario una vez que la bacteria ya invadió, cuando necesita sobrevivir y proliferar en un ambiente intracelular como macrófagos, células M, enterocitos o hepatocitos, en donde se requieren los reguladores EnvZ/OmpR, PhoP/PhoQ y SlyA, que activan su expresión a concentraciones bajas de fosfatos, magnesio, pH ácido y nula presencia de péptidos antimicrobianos (149).

El segundo mecanismo es el que se describió en estudios previos realizados *in vitro* (129, 130), y se comprobó en este estudio (Fig. 27), en el que claramente se muestra que SirA, CsrB/C y HilD actúan en cascada para inducir la expresión de *hilA* y de *ssrB in vivo*, en el lumen intestinal, antes de que *Salmonella* invada el intestino. Las diversas y complejas señales ambientales y fisicoquímicas que inducen esta cascada en esta condición de crecimiento podrían ser un campo de estudio en futuros trabajos; pero se sabe que factores ambientales como altas concentraciones de NaCl, el pH básico y una baja tensión de oxígeno inducen la expresión de los genes de la SPI-1 (97, 103) y que son condiciones que *S. Typhimurium* puede encontrar a su llegada al intestino

delgado y favorecer la actividad de la cascada en estudio. Otro factor para tomar en cuenta para la expresión de los genes de la SPIs en el lumen cecal es la concentración de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) producidos por el metabolismo de la microbiota residente a lo largo del intestino, especialmente en el ciego. Algunos estudios han demostrado que el acetato, el AGCC más concentrado en el íleon distal y en el ciego de mamíferos y pollos, penetra en el citoplasma de la bacteria y fosforila a SirA, que ya activa, puede inducir el resto de los genes de la cascada reguladora de las SPIs (99, 102, 150,151).

Resultados obtenidos por Brown *et al.*, mostraron una rápida inducción de genes de la SPI-2 en el lumen intestinal (131), sin que se supiera hasta ese momento cómo es que se daba dicha inducción. Por otro lado, estudios previos habían reportado la necesidad de la SPI-2 para inducir una enfermedad intestinal completa, sin identificar tampoco la causa de este fenómeno (131). Finalmente, el estudio previo que identificó la cascada reguladora SirA-CsrB/C-HilD mostró solo la inducción de los genes de SPI-1 y SPI-2 *in vitro*. Nuestros resultados relacionan y dan explicación a todos estos hallazgos previos e inconclusos, pues demuestran que los reguladores SirA, CsrB/C y HilD se encuentran actuando en cascada *in vivo*, para inducir la expresión de *hilA* y *ssrB* en el lumen intestinal, antes de que *Salmonella* invada el intestino. Esto por tanto induce la expresión del resto de genes de SPI-1 y SPI-2 y por tanto explica también, la expresión de genes de SPI-2 en el lumen intestinal reportada previamente. Además, la inducción de esta manera de los genes de ambas islas contribuye al desarrollo de lesiones y explica por qué los genes de SPI-2 son necesarios para producir

una enfermedad intestinal completa como se reportó previamente. Es posible que la inducción intraluminal de los genes de la SPI-2 le permita a *S. Typhimurium* iniciar la adaptación o transición al ambiente hostil intracelular en los enterocitos, células M y macrófagos, y así coordinar de una manera más óptima los mecanismos de supervivencia y proliferación en estos nichos de replicación intracelular.



**Figura 27.** Cascada reguladora conformada por SirA, CsrB/C y HilD de *S. Typhimurium* que controla *in vivo* la expresión de *hilA* y *ssrB*. Esta cascada se induce una vez que *Salmonella* se encuentra en el lumen intestinal, previo a la invasión intestinal (ver en texto los detalles).

La expresión en el lumen intestinal de esta compleja cascada de genes constata que la transición exitosa de este patógeno del medio extracelular al intracelular depende en gran parte de los reguladores globales que responden a distintas señales ambientales y, en consecuencia, actúan para controlar la expresión de numerosos genes que facultan a *Salmonella* para ser virulenta.

Como ya se mencionó, además de ser necesarios para la expresión de *hilA* y *ssrB* en el lumen intestinal, se demostró que el sistema SirA-HilD-CsrB/C es

importante para una completa colonización cecal y diseminación al hígado en el modelo aviar (Fig. 6 y 7), lo que abre un campo de oportunidad para seguir estudiando estos genes a nivel individual en otros modelos animales como los bovinos, en donde se ha visto que SirA es indispensable para el desarrollo de gastroenteritis (131), o los ratones pretratados con estreptomicina que proporcionan un modelo para estudiar la colitis causada por *S. Typhimurium* (130). Así mismo, el cultivo celular también podría ser útil para comparar la expresión de *hilA* y *ssrB*, en cepas carentes de los genes de la cascada SirA-Csr-HilD con cepas WT de *Salmonella*, y con ello, integrar mejor los resultados obtenidos en este trabajo y estudios previos.

## **8. Conclusiones**

Nuestros resultados demostraron que, los reguladores SirA, CsrB y HilD contribuyen de manera individual en la colonización intestinal, diseminación hepática y la producción de lesiones en estos órganos en aves de un día y una semana de edad.

Se determinó que la cascada genética conformada por SirA, CsrB/C y HilD, induce la expresión *in vivo* de *hilA* y particularmente de *ssrB*, en el lumen intestinal aviar, antes de la invasión al intestino.

## **9. Perspectivas**

Determinar el papel de *hilA* y *ssrB* en la colonización y diseminación sistémica durante el transcurso de una infección *in vivo* de *S. Typhimurium*.

Deteminar el papel de otros reguladores globales de *S. Typhimurium* que puedan estar involucrados en la colonización y diseminación sistémica de la bacteria.

Analizar la cinetica de expresión de la cascada SirA, CsrB/C, HilD, HilA y SsrB en cultivo celular con el fin de seguir entendiedo el mecanismo de regulación de la SPI-1 y 2 de *S. Typhimurium*.

Estudiar la expresión de los genes de la cascada en medio LB y analizar su respuesta a la suplementación y disminución de nutrientes u otros metabolitos con el fin de entender de mejor manera su adaptación a las condiciones del medio.

## 10. Referencias

1. Barlag B, Hensel M. The giant adhesin SiiE of *Salmonella enterica*. *Molecules*. 2015;20(1):1134–50.
2. Fookes M, Schroeder GN, Langridge GC, Blondel CJ, Mammina C, Connor TR, *et al.* *Salmonella bongori* provides insights into the evolution of the *salmonellae*. *PLoS Pathog* 2011;7(8).
3. Lamas A, Miranda JM, Regal P, Vázquez B, Franco CM, Cepeda A. A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. *Microbiol Res* 2018;206 (2017):60–73.
4. Gibani MM, Britto C, Pollard AJ. Typhoid and paratyphoid fever: A call to action. *Curr Opin Infect Dis* 2018;31(5):440–8.
5. Saleh S, Van Puyvelde S, Staes A, Timmerman E, Barbé B, Jacobs J, *et al.* *Salmonella* Typhi, Paratyphi A, Enteritidis and Typhimurium core proteomes reveal differentially expressed proteins linked to the cell surface and pathogenicity. *PLoS Negl Trop Dis* 2019;13(5):1–16.
6. Rabsch W, Tschäpe H, Bäumler AJ. Non-typhoidal salmonellosis: Emerging problems. *Microbes Infect* 2001;3(3):237–47.
7. Jajere SM. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and adaptation and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Vet World* 2019;12(4):504–21.
8. Haraga A, Ohlson MB, Miller SI. *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6:53-66.

9. Zhang L, Ren T, Qiao M, Huang T, Xia X. The reduction of *Salmonella* on chicken skin by the combination of sodium dodecyl sulfate with antimicrobial chemicals and coating wax microemulsions. *Poult Sc* 2019; 48: 2615–2621.
10. Jones MA, Hulme SD, Barrow PA, Wigley, P. The *Salmonella* Pathogenicity Island 1 and *Salmonella* Pathogenicity Island 2 Type III Secretion Systems play a major role in pathogenesis of systemic disease and gastrointestinal tract colonization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken. *Avian Pathol* 2007; 36:199-203.
11. Secretaria de Salud/Dirección General de Epidemiología. Vigilancia Epidemiológica Semana 52, 2020. Mexico: SS/DGE, 2020.
12. dos Santos AMP, Ferrari RG, Conte-Junior CA. Virulence Factors in *Salmonella* Typhimurium: The Sagacity of a Bacterium. *Curr Microbiol* 2019;76(6):762–73.
13. Aldapa-Vega G, Moreno-Eutimio MA, Berlanga-Taylor AJ, Jiménez-Urbe AP, Nieto-Velazquez G, López-Ortega O, *et al.* Structural variants of *Salmonella* Typhimurium lipopolysaccharide induce less dimerization of TLR4/MD-2 and reduced pro-inflammatory cytokine production in human monocytes. *Mol Immunol* 2019; 111:43–52.
14. Pastelin-Palacios R, Gil-Cruz C, Pérez-Shibayama CI, Moreno-Eutimio MA, Cervantes-Barragán L, Arriaga-Pizano L, *et al.* Subversion of innate and adaptive immune activation induced by structurally modified lipopolysaccharide from *Salmonella* Typhimurium. *Immunology* 2011;133(4):469–81.
15. Dey S, Chakravarty A, Guha Biswas P, De Guzman RN. The Type III Secretion System needle, tip, and translocon. *Protein Sci* 2019;28(9):1582–93.



16. Bai F, Li Z, Umezawa A, Terada N, Jin S. Bacterial type III secretion system as a protein delivery tool for a broad range of biomedical applications. *Biotechnol Adv* 2018;36(2):482–93.
17. Thomas CMs, Tomoko Kubori AS. Structural Insights into the Assembly of the Type III Secretion Needle Complex Thomas. *Science* 2008; 15(10):1203–14.
18. Chen LM, Briones G, Donis RO, Galán JE. Optimization of the delivery of heterologous proteins by the *Salmonella* enterica serovar Typhimurium type III secretion system for vaccine development. *Infect Immun* 2006;74(10):5826–33.
19. Miao EA, Brittnacher M, Haraga A, Jeng RL, Welch MD, Miller SI. *Salmonella* effectors translocated across the vacuolar membrane interact with the actin cytoskeleton. *Mol. Microbiol* 2003;48: 401–415.
20. Jennings E, Thurston TLM, Holden DW. *Salmonella* SPI-2 Type III secretion system effectors: molecular mechanisms and physiological consequences. *Cell Host Microbe* 2017; 22(2):217–31.
21. Tanner JR, Kingsley RA. Evolution of *Salmonella* within Hosts. *Trends Microbiol* 2018; 12:986–98.
22. Hansen-Wester I, Hensel M. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect* 2001; 3:549-559.
23. Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2:414–24.
24. Lindsay JA, Ruzin A, Ross HF, Kurepina N, Novick RP. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 1998; 29:527–43.

25. Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect* 2000; 2:145-156.
26. Hallstrom KN, McCormick BA. Pathogenicity Islands: Origins, Structure, and Roles in Bacterial Pathogenesis. Vols. 1–3, *Molecular Medical Microbiology: Second Edition*. Elsevier Ltd; 2014. 303–314.
27. Sabbagh SC, Forest CG, Lepage C, Leclerc JM, Daigle F. So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS Microbiol Lett* 2010; 305:1-13.
28. Groisman EA y Ochman H. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* 1996;87:791-7.
29. Lermينياux NA, Mackenzie KD, Cameron ADS. *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1): The evolution and stabilization of a core genomic type three secretion system. *Microorganisms* 2020;8(4):1–22.
30. Chubiz JEC, Golubeva YA, Lin D, Miller LD, Slauch JM. FliZ Regulates Expression of the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Invasion Locus by Controlling HilD Protein Activity in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 2010;192: 6261–6270.
31. Dietsche T, Tesfazgi Mebrhatu M, Brunner MJ, Abrusci P, Yan J, Franz-Wachtel M, *et al.* Structural and Functional Characterization of the Bacterial Type III Secretion Export Apparatus. *PLoS Pathog* 2016;12(12):1–25.
32. Hu J, Worrall LJ, Vuckovic M, Hong C, Deng W, Atkinson CE, *et al.* T3S injectisome needle complex structures in four distinct states reveal the basis of membrane coupling and assembly. *Nat Microbiol* 2019;4(11):2010–9.

33. Zilkenat S, Franz-Wachtel M, Stierhof YD, Galán JE, Macek B, Wagner S. Determination of the stoichiometry of the complete bacterial type III secretion needle complex using a combined quantitative proteomic approach. *Mol Cell Proteomics* 2016;15(5):1598–609.
34. Wu H, Jones RM, Neish AS. The *Salmonella* effector AvrA mediates bacterial intracellular survival during infection in vivo. *Cell Microbiol* 2012;14(1):28–39.
35. Singh PK, Kapoor A, Lomash RM, Kumar K, Kamerkar SC, Pucadyil TJ, *et al.* *Salmonella* SipA mimics a cognate SNARE for host Syntaxin8 to promote fusion with early endosomes. *J Cell Biol* 2018;217(12):4199–214.
36. Johnson R, Byrne A, Berger CN, Klemm E, Crepin VF, Dougan G, *et al.* The type III secretion system effector SptP of *Salmonella enterica* Serovar Typhi. *J. Bacteriol.* 2017; 199(4):1–18.
37. Kamanova J, Sun H, Lara-Tejero M, Galán JE. The *Salmonella* Effector Protein SopA Modulates Innate Immune Responses by Targeting TRIM E3 Ligase Family Members. *PLoS Pathog* 2016;12(4):1–21.
38. Romero-González LE, Pérez-Morales D, Cortés-Avalos D, Vázquez-Guerrero E, Paredes-Hernández DA, Estrada-De los Santos P, *et al.* The *Salmonella* Typhimurium InvF-SicA complex is necessary for the transcription of *sopB* in the absence of the repressor H-NS. *PLoS One* 2020; 15:1–18.
39. García-Gil A, Galán-Enríquez CS, Pérez-López A, Nava P, Alpuche-Aranda C, Ortiz-Navarrete V. SopB activates the akt-yap pathway to promote *Salmonella* survival within B cells. *Virulence* 2018;9(1):1390–402.
40. Miold S, Ehrbar K, Weissmüller A, Prager R, Tschäpe H, Rüssmann H, *et al.* *Salmonella* host cell invasion emerged by acquisition of a mosaic of separate

- genetic elements, including *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1), SPI-5, and SopE2. *J Bacteriol* 2001; 183(7):2348–58.
41. Bakowski MA, Cirulis JT, Brown NF, Finlay BB, Brumell JH. SopD acts cooperatively with SopB during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion. *Cell Microbiol* 2007;9(12):2839–55.
42. Valenzuela LM, Hidalgo AA, Rodríguez L, Urrutia IM, Ortega AP, Villagra NA, *et al.* Pseudogenization of *sopA* and *sopE2* is functionally linked and contributes to virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Infect Genet Evol* 2015; 33:131–42.
43. Deiwick J, Nikolaus T, Erdogan S, Hensel M. Environmental regulation of *Salmonella* Pathogenicity island 2 gene expression. *Mol Microbiol* 1999; 31:1759–1764.
44. Hacker J, Kaper JB. Pathogenicity islands and evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54:641-679.
45. Khan CMA. The Dynamic Interactions between *Salmonella* and the Microbiota, within the Challenging Niche of the Gastrointestinal Tract. *Int Sch Res Not* 2014; 10:1–23.
46. Yu XJ, Grabe GJ, Liu M, Mota LJ, Holden DW. SsaV interacts with SsaL to control the translocon-to-effector switch in the *Salmonella* SPI-2 type three secretion system. *MBio* 2018; 9 (5): 1149-18.
47. Lefebvre MD, Gálan JE. The inner rod protein controls substrate switching and needle length in a *Salmonella* type III secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111(2):817–22.

48. Yu XJ, Liu M, Holden DW. *Salmonella* effectors SseF and SseG interact with mammalian protein ACBD3 (GCP60) to anchor *Salmonella*-containing vacuoles at the Golgi network. *MBio* 2016;7(4):1–11.
49. Ruiz-Albert J, Mundy R, Yu XJ, Beuzón CR, Holden DW. SseA is a chaperone for the SseB and SseD translocon components of the *Salmonella* pathogenicity-island-2-encoded type III secretion system. *Microbiology* 2003;149(5):1103–11.
50. Stein MA, Leung KY, Zwick M, Garcia-del Portillo F, Finlay BB. Identification of a *Salmonella* virulence gene required for formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins within epithelial cells. *Mol Microbiol* 1996;20(1):151–64.
51. Boucrot E, Henry T, Borg JP, Gorvel JP, Méresse S. The intracellular fate of *Salmonella* depends on the recruitment of kinesin. *Science* 2005; 308(5725): 1174–8.
52. Brumell JH, Kujat-Choy S, Brown NF, Vallance BA, Knodler LA, Finlay BB. SopD2 is a novel type III secreted effector of *Salmonella* Typhimurium that targets late endocytic compartments upon delivery into host cells. *Traffic* 2003;4(1):36–48.
53. Teo WX, Yang Z, Kerr MC, Luo L, Guo Z, Alexandrov K, *et al.* *Salmonella* effector SopD2 interferes with Rab34 function. *Cell Biol Int* 2017;41(4):433–46.
54. Spanò S, Galán JE. A Rab32-dependent pathway contributes to *Salmonella* Typhi host restriction. *Science* 2012; 338:960–3.
55. Wachtel R, Bräuning B, Mader SL, Ecker F, Kaila VRI, Groll M, *et al.* The protease GtgE from *Salmonella* exclusively targets inactive Rab GTPases. *Nat Commun* 2018;9(1).

56. Jennings E, Esposito D, Rittinger K, Thurston TLM. Structure-function analyses of the bacterial zinc metalloprotease effector protein GtgA uncover key residues required for deactivating NF- $\kappa$ B. *J Biol Chem* 2018;293(39):15316–29
57. S, Günster RA, Matthews SA, Holden DW, Thurston. SseK1 and SseK3 Type III Secretion System Effectors Inhibit NF- $\kappa$ B Signaling and Necroptotic Cell Death in *Salmonella*-Infected Macrophages. *Infect Immun* 2017;85(3):1–18.
58. Gopinath A, Allen TA, Bridgwater CJ, Young CM, Worley MJ. The *Salmonella* type III effector SpvC triggers the reverse transmigration of infected cells into the bloodstream. *PLoS One* 2019;14(12):1–15.
59. Wang Y, Cai Y, Zhang J, Liu D, Gong X, Pan Z, *et al.* Controversy Surrounding the Function of SpiC Protein in *Salmonella*: An Overview. *Front Microbiol* 2019;10.
60. Poh J, Odendall C, Spanos A, Boyle C, Liu M, Freemont P, *et al.* SteC is a *Salmonella* kinase required for SPI-2-dependent F-actin remodelling. *Cell Microbiol* 2008;10(1):20–30.
61. Ilyas B, Tsai CN, Coombes BK. Evolution of *Salmonella*-host cell interactions through a dynamic bacterial genome. *Front Cell Infect Microbiol* 2017;29(7):428.
62. Bernal-Bayard J, Ramos-Morales F. Molecular Mechanisms Used by *Salmonella* to Evade the Immune System. *Curr Issues Mol Biol* 2018;25:133–68.
63. Sana TG, Lugo KA, Monack DM. T6SS: The bacterial “fight club” in the host gut. *PLoS Pathog* 2017;13(6):6–10.
64. Ledebouer NA, Frye JG, McClelland M, Jones BD. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium requires the Lpf, Pef, and tafi fimbriae for biofilm formation on HEp-2 tissue culture cells and chicken intestinal epithelium. *Infect Immun* 2006; 74(6):3156–69.

65. Humphries AD, Raffatellu M, Winter S, Weening EH, Kingsley RA, Droleskey R, *et al.* The use of flow cytometry to detect expression of subunits encoded by 11 *Salmonella enterica* serotype Typhimurium fimbrial operons. *Mol Microbiol* 2003;48(5):1357–76.
66. Bäumler AJ, Tsolis RM, Heffron F. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella* Typhimurium. *Infect Immun* 1996; 64:1862-1865
67. Van Der Velde n AWM, Bäumler AJ, Tsolis RM, Heffron F. Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonella* Typhimurium in mice. *Infect Immun* 1998;66(6):2803–8.
68. Chang JH, Myeni SK, Lin TL, Wu CC, Staiger CJ, Zhou D. SipC multimerization promotes actin nucleation and contributes to *Salmonella*-induced inflammation. *Mol Microbiol* 2007;66(6):1548–56.
69. Hänisch J, Kölm R, Wozniczka M, Bumann D, Rottner K, Stradal TEB. Activation of a RhoA/myosin II-dependent but Arp2/3 complex-independent pathway facilitates *Salmonella* invasion. *Cell Host Microbe* 2011;9(4):273–85.
70. Truong D, Boddy KC, Canadien V, Brabant D, Fairn GD, D’Costa VM, *et al.* *Salmonella* exploits host Rho GTPase signalling pathways through the phosphatase activity of SopB. *Cell Microbiol* 2018;20(10)
71. Johnson R, Byrne A, Berger CN, Klemm E, Crepin VF, Dougan G, *et al.* The Type III Secretion System Effector SptP of *Salmonella enterica* Serovar Typhi. *J. Bacteriol.* 2017;199(4):1–18.

72. Abdul-Sater AA, Saïd-Sadier N, Ojcius DM, Yilmaz Ö, Kelly KA. Inflammasomes bridge signaling between pathogen identification and the immune response. *Drugs of Today* 2009;45:105–12.
73. Obregon C, Dreher D, Kok M, Cochand L, Kiama GS, Nicod LP. Human alveolar macrophages infected by virulent bacteria expressing SipB are a major source of active interleukin-18. *Infect Immun* 2003;71(8):4382–8.
74. Keestra-Gounder AM, Tsohis RM, Bäumlér AJ. Now you see me, now you don't: the interaction of *Salmonella* with innate immune receptors. *Nat Rev Microbiol* 2015;13(4):206–16.
75. Fiskin E, Bhogaraju S, Herhaus L, Kalayil S, Hahn M, Dikic I. Structural basis for the recognition and degradation of host TRIM proteins by *Salmonella* effector SopA. *Nat Commun* 2017;8.
76. Harrison R, Brumell J, Khandani A, Bucci C, Scott C, Jiang X, *et al.* *Salmonella* impairs RILP recruitment to Rab7 during maturation of invasion vacuoles. *Mol Biol Cell* 2004; 15(7):3146-54.
77. McQuate SE, Young AM, Silva-Herzog E, Bunker E, Hernandez M, de Chaumont F, *et al.* Long-term live-cell imaging reveals new roles for *Salmonella* effector proteins SseG and SteA. *Cell Microbiol* 2017;19(1).
78. McGourty K, Thurston TL, Matthews SA, Pinaud L, Mota LJ, Holden DW. *Salmonella* inhibits retrograde trafficking of mannose-6-phosphate receptors and lysosome function. *Science* 2012;338(6109):963–7.
79. Henry T, Couillault C, Rockenfeller P, Boucrot E, Dumont A, Schroeder N, *et al.* The *Salmonella* effector protein PipB2 is a linker for kinesin-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(36):13497–502.



80. Schroeder N, Mota LJ, Méresse S. *Salmonella*-induced tubular networks. Trends Microbiol 2011;19(6):268–77.
81. Rajashekar R, Hensel M. Dynamic modification of microtubule-dependent transport by effector proteins of intracellular *Salmonella enterica*. Eur J Cell Biol 2011;90(11):897–902.
82. Domingues L, Holden DW, Mota LJ. The *Salmonella* effector SteA contributes to the control of membrane dynamics of *Salmonella*-containing vacuoles. Infect Immun 2014;82(7):2923–34.
83. Tezcan- Merdol D, Nyman T, Lindberg U, Haag F, Koch-Nolte F, Rhen M. Actin is ADP-ribosylated by the *Salmonella enterica* virulence-associated protein SpvB. Mol Microbiol 2001;39(3):606–19.
84. Groote MA De, Testerman T, Xu Y, Fang FC. Homocysteine Antagonism of nitric oxide-related cytoasis in *Salmonella Typhimurium*. Sciencie. 1994;1669:1992–5.
85. Fang FC, Degroote MA, Foster JW, Bäumlér AJ, Ochsner U, Testerman T, *et al.* Virulent *Salmonella Typhimurium* has two periplasmic Cu, Zn-superoxide dismutases. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96(13):7502–7.
86. Tidhar A, Rushing MD, Kim B, Slauch JM. Periplasmic superoxide dismutase SodCI of *Salmonella* binds peptidoglycan to remain tethered within the periplasm. Mol Microbiol 2015;97(5):832–43.
87. Wang Y, Liu B, Zhang J, Sun L, Wen W, Fan Q, *et al.* Infection with *sodA* mutant of *S. Typhimurium* leads to up-regulation of autophagy in Raw264.7 macrophages. Lett Appl Microbiol 2019; 69(1):11–5.

88. S, Günster RA, Matthews SA, Holden DW, Thurston. SseK1 and SseK3 Type III Secretion System Effectors Inhibit NF- $\kappa$ B Signaling and Necroptotic Cell Death in *Salmonella*-Infected Macrophages. *Infect Immun* 2017;85(3):1–18.
89. Haneda T, Ishii Y, Shimizu H, Ohshima K, Iida N, Danbara H, *et al.* *Salmonella* type III effector SpvC, a phosphothreonine lyase, contributes to reduction in inflammatory response during intestinal phase of infection. *Cell Microbiol* 2012;14(4):485–99.
90. Akbar S, Schechter LM, Lostroh CP, Lee CA. AraC/XylS family members, HilD and HilC, directly activate virulence gene expression independently of HilA in *Salmonella* Typhimurium. *Mol Microbiol* 2003;47(3):715–28.
91. Bajaj V, Hwang C, Lee CA. HilA is a novel OmpR/ToxR family member that activates the expression of *Salmonella* Typhimurium invasion genes. *Mol Microbiol* 1995; 18:715-727.
92. Ellermeier JR, Slauch JM. Adaptation to the host environment: regulation of the SPI-1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Curr Opin Microbiol* 2007;10(1):24–9.
93. Lostroh CP, Lee CA. The HilA box and sequences outside it determine the magnitude of HilA-dependent activation of PprgH from *Salmonella* pathogenicity island 1. *J Bacteriol* 2001;183(16):4876–85.
94. Darwin KH, Miller VL. InvF is required for expression of genes encoding proteins secreted by the SPI-1 type III secretion apparatus in *Salmonella* Typhimurium. *J Bacteriol* 1999;181:4949-4954.
95. Eichelberg K, Galán JE. Differential regulation of *Salmonella* Typhimurium type III secreted proteins by pathogenicity island 1 (SPI-1) encoded transcriptional activators *invF* and *hilA*. *Infect Immun* 1999;67:4099-4105.

96. Narm K-E, Kalafatis M, Slauch JM. HilD, HilC, and RtsA Form Homodimers and Heterodimers to Regulate Expression of the *Salmonella* Pathogenicity Island I Type III Secretion System. *J Bacteriol* 2020;217–44.
97. Lou L, Zhang P, Piao R, Wang Y. *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and Its Complex Regulatory Network. *Front Cell Infect Microbiol* 2019;9:1–12.
98. Ellermeier CD, Ellermeier JR, Slauch JM. HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI-1 type three secretion system regulator *hilA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* 2005; 57:691-705.
99. De Keersmaecker SCJ, Marchal K, Verhoeven TLA, Engelen K, Vanderleyden J, Detweiler CS. Microarray analysis and motif detection reveal new targets of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium HilA regulatory protein, including *hilA* itself. *J Bacteriol* 2005;187:4381-4391.
100. Martínez LC, Martínez-Flores I, Salgado H, Fernández-Mora M, Medina-Rivera A, Puente JL, *et al.* *In silico* identification and experimental characterization of regulatory elements controlling the expression of the *Salmonella csrB* and *csrC* genes. *J Bacteriol* 2014;196(2):325–36.
101. Teplitski M, Goodier RI, Ahmer BMM. Pathways Leading from BarA/SirA to Motility and Virulence Gene Expression in *Salmonella*. *J Bacteriol* 2003;185(24):7257–65.
102. Lawhon SD, Maurer R, Suyemoto M, Altier C. Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella* Typhimurium invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol Microbiol* 2002;46(5):1451–64.

103. Altier C. Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *J Microbiol* 2005;43: 85-92.
104. Teplitski M, Goodier RI, Ahmer BMM. Pathways Leading from BarA/SirA to Motility and Virulence Gene Expression in *Salmonella*. *J Bacteriol* 2003;185(24):7257–65.
105. Banda MM, López C, Manzo R, Rico-Pérez G, García P, Rosales-Reyes R, *et al.* HilD and PhoP independently regulate the expression of *grhD1*, a novel gene required for *Salmonella* Typhimurium invasion of host cells. *Sci Rep* 2018;8(1):1–15.
106. Grenz JR, Chubiz JEC, Thaprawat P, Slauch JM. HilE regulates HilD by blocking DNA binding in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 2018;200(8):1–13.
107. Baxter MA, Jones BD. Two-component regulators control *hilA* expression by controlling *fimZ* and *hilE* expression within *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* 2015;83(3):978–85.
108. Takaya A, Kubota Y, Isogai E, Yamamoto T. Degradation of the HilC and HilD regulator proteins by ATP-dependent Lon protease leads to downregulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Mol Microbiol* 2005;55(3):839–52.
109. Stoebel DM, Free A, Dorman CJ. Anti-silencing: Overcoming H-NS-mediated repression of transcription in Gram-negative enteric bacteria. *Microbiology* 2008;154(9):2533–45.

110. Hurtado-Escobar GA, Grépinet O, Raymond P, Abed N, Velge P, Virlogeux-Payant I. H-NS is the major repressor of *Salmonella* Typhimurium Pef fimbriae expression. *Virulence* 2019;10(1):849–67.
111. Timmermans J, Van Melderen L. Post-transcriptional global regulation by CsrA in bacteria. *Cell Mol Life Sci* 2010;67:2897-2908.
112. Altier C, Suyemoto M, Lawhon S. Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion genes by CsrA. *Infect Immun* 2000b;68:6790-6797.
113. Mulder DT, Mcphee JB, Reid-Yu SA, Stogios PJ, Savchenko A, Coombes BK. Multiple histidines in the periplasmic domain of the *Salmonella enterica* sensor kinase SsrA enhance signaling in response to extracellular acidification. *Mol Microbiol* 2015;95(4):678–91.
114. Miao EA, Freeman JA, Miller SI. Transcription of the SsrAB regulon is repressed by alkaline pH and is independent of PhoPQ and magnesium concentration. *J Bacteriol* 2002;184:1493-7.
115. Walthers D, Carroll RK, Navarre WW, Libby SJ, Fang FC, Kenney LJ. The response regulator SsrB activates expression of diverse *Salmonella* pathogenicity island 2 promoters and counters silencing by the nucleoid-associated protein H-NS. *Mol Microbiol* 2007;65:477-493.
116. Bijlsma JJE, Groisman EA. The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 2005;57(1):85–96.
117. Kenney LJ, Anand GS. EnvZ/OmpR Two-Component Signaling: An Archetype System That Can Function Noncanonically. *EcoSal Plus* 2020;9(1):1–47.

118. Liew ATF, Foo YH, Gao Y, Zangoui P, Singh MK, Gulvady R, *et al.* Single cell, super-resolution imaging reveals an acid pH-dependent conformational switch in SsrB regulates SPI-2. *Elife* 2019;8:1–26.
119. Okada N, Oi Y, Takeda-Shitaka M, Kanou K, Umeyama H, Haneda T, *et al.* Identification of amino acid residues of *Salmonella* SlyA that are critical for transcriptional regulation. *Microbiology* 2007;153(2):548–60.
120. Banda MM, Zavala-Alvarado C, Pérez-Morales D, Bustamante VH. SlyA and HilD counteract H-NS-mediated repression on the *ssrAB* virulence operon of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and thus promote its activation by OmpR. *J Bacteriol* 2019;201(8):1–14.
121. Perez JC, Latifi T, Groisman EA. Overcoming H-NS-mediated transcriptional silencing of horizontally acquired genes by the PhoP and SlyA proteins in *Salmonella enterica*. *J Biol Chem* 2008;283:10773–10783.
122. Silphaduang U, Mascarenhas M, Karmali M, Coombes BK. Repression of intracellular virulence factors in *Salmonella* by the Hha and YdgT nucleoid-associated proteins. *J Bacteriol* 2007;189:3669–3673.
123. Nieto JM, Madrid C, Miquelay E, Parra JL, Rodriguez S, Juarez A. Evidence for direct protein-protein interaction between members of the enterobacterial Hha/YmoA and H-NS families of proteins. *J Bacteriol* 2002;184:629–635.
124. Martínez LC, Banda MM, Fernández-Mora M, Santana FJ, Bustamante VH. HilD induces expression of *Salmonella* pathogenicity Island 2 genes by displacing the global negative regulator H-NS from *ssrAB*. *J Bacteriol* 2014;196(21):3746–55.

125. Johnson R, Ravenhall M, Pickard D, Dougan G, Byrne A, Frankel G. Comparison of *Salmonella enterica* serovars Typhi and Typhimurium reveals typhoidal serovar-specific responses to bile. *Infect Immun* 2018;86(3):1–16.
126. Prouty AM, Gunn JS. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion is repressed in the presence of bile. *Infect Immun* 2000;68(12):6763–9.
127. Conlon MA, Bird AR. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients* 2015;7(1):17–44.
128. Jacobson A, Lam L, Rajendram M, Tamburini F, Honeycutt J, Pham T, *et al.* A Gut Commensal-Produced Metabolite Mediates Colonization Resistance to *Salmonella* Infection. *Cell Host Microbe* 2018;24(2):296-307.
129. Bustamante VH, Martínez LC, Santana FJ, Knodler LA, Steele-Mortimer O, Puente JL. HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(38):14591–6.
130. Martínez LC, Yakhnin H, Camacho MI, Georgellis D, Babitzke P, Puente JL, *et al.* Integration of a complex regulatory cascade involving the SirA/BarA and Csr global regulatory systems that controls expression of the *Salmonella* SPI-1 and SPI-2 virulence regulons through HilD. *Mol Microbiol* 2011;80(6):1637–56.
131. Brown NF, Vallance BA, Coombes BK, Valdez Y, Coburn BA, Finlay BB. *Salmonella* pathogenicity island 2 is expressed prior to penetrating the intestine. *PLoS Pathog* 2005;1(3):0252–8.
132. Kurtz JR, Goggins JA, McLachlan JB. *Salmonella* infection: Interplay between the bacteria and host immune system. *Immunol Lett* 2017;190:42–50.

133. Tsolis RM, Xavier MN, Santos RL, Bäumlér AJ. How to become a top model: impact of animal experimentation on human *Salmonella* disease research. *Infect Immun* 2011;79:1806-14.
134. Blajman JE, Astesana DM, Zimmermann JA, Rossler E, Romero Scharpen A, Berisvil AP, *et al.* Quantification of FITC-labelled probiotic *Lactobacillus salivarius* DSPV 001P during gastrointestinal transit in broilers. *Benef Microbes* 2017;8(1):55–64.
135. Ferrando C, Vergara P, Jiménez M, Goñalons E. Study of the Rate of Passage of Food With Chromium-Mordanted Plant Cells in Chickens (*Gallus Gallus*). *Q J Exp Physiol* 1987;72(3):251–9.
136. Barthel M, Hapfelmeier S, Quintanilla-Martínez L, Kremer M, Rohde M, Hogardt M, *et al.* Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect Immun* 2003;71(5):2839–58.
137. Ahmer BMM, Van Reeuwijk J, Watson PR, Wallis TS, Heffron F. *Salmonella* SirA is a global regulator of genes mediating enteropathogenesis. *Mol Microbiol* 1999;31(3):971–82.
138. Fortune DR, Suyemoto M, Altier C. Identification of CsrC and characterization of its role in epithelial cell invasion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* 2006;74(1):331–9.
139. Hung CC, Eade CR, Betteken MI, Pavinski Bitar PD, Handley EM, Nugent SL, *et al.* *Salmonella* invasion is controlled through the secondary structure of the *hilD* transcript. *PLoS Pathog* 2019;15(4):1–18.



140. Eade CR, Bogomolnaya L, Hung Chien-Che, Betteken MI, Adams LG, Andrews-Polymenis H, *et al.* *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Is Expressed in the Chicken Intestine and Promotes Bacterial Proliferation. *Infect Immun* 2019; 87(1): 503-18.
141. Alkie TN, Yitbarek A, Hodgins DC, Kulkarni RR, Taha-Abdelaziz K, Sharif S. Development of innate immunity in chicken embryos and newly hatched chicks: a disease control perspective. *Avian Pathol* 2019;48(4):288–310.
142. Crhanova M, Hradecka H, Faldynova M, Matulova M, Havlickova H, Sisak F, *et al.* Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microflora and to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection. *Infect Immun* 2011;79(7):2755–63.
143. Rieger J, Janczyk P, Hünigen H, Plendl J. Enhancement of immunohistochemical detection of *Salmonella* in tissues of experimentally infected pigs. *Eur J Histochem* 2015;59(3):2516.
144. Bellido-Carreras N, Argüello H, Zaldívar-López S, Jiménez-Marín A, Martins R, Arce C, *et al.* *Salmonella* Typhimurium Infection Along the Porcine Gastrointestinal Tract and Associated Lymphoid Tissues. *Vet Pathol* 2019 Sep;56(5):681-690.
145. Johnston C, Pegues DA, Hueck CJ, Lee CA, Miller SI. Transcriptional activation of *Salmonella* Typhimurium invasion genes by a member of the phosphorylated response-regulator superfamily. *Mol Microbiol* 1996;22(4):715–27.

146. Zere TR, Vakulskas CA, Leng Y, Pannuri A, Potts AH, Dias R, *et al.* Genomic targets and features of BarA-UvrY (-SirA) signal transduction systems. *PLoS One* 2015;10(12):1–29.
147. Suzuki K, Wang X, Weilbacher T, Pernestig AK, Melefors Ö, Georgellis D, *et al.* Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2002;184(18):5130–40.
148. Petrone BL, Stringer AM, Wade JT. Identification of HilD-regulated genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 2014;196(5):1094–101.
149. Fass E, Groisman EA. Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Curr Opin Microbiol* 2009;12(2):199–204.
150. le Bars HL, Bonnaure-Mallet M, Barloy-Hubler F, Jolivet-Gougeon A, Bousarghin L. Strong mutator phenotype drives faster adaptation from growth on glucose to growth on acetate in *Salmonella*. *Microbiol* 2014;160:2264–71.
151. Liao X, Shao Y, Sun G, Yang Y, Zhang L, Guo Y, *et al.* The relationship among gut microbiota, short-chain fatty acids, and intestinal morphology of growing and healthy broilers. *Poult Sci* 2020;99(11):5883–95.

## 11. Anexos

### Fórmula para preparar 1 litro de LB

Triptona .....	10 g
Extracto de levadura .....	5 g
NaCl .....	10 g
Agua destilada .....	950 ml

### Fórmula para preparar 1 litro de PBS 1X

NaCl .....	8 g
KCl.....	5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1.44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.24 g
Agua destilada .....	Cbp 1 L