



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

Fiebre tifoidea y factores de virulencia de
***Salmonella enterica* serotipo Typhi**

Autor: Elena Marín Rodríguez

Tutor: Concepción Pintado García

Convocatoria: Junio 2018

Resumen

Salmonella Typhi, la bacteria causante de fiebre tifoidea, infecta las células M del intestino a través de los sistemas de secreción de Tipo III codificados en las islas de patogenicidad 1 y 2. Después, alcanza las placas de Peyer donde infecta células fagocíticas que le van a permitir diseminarse por el organismo. Mediante dichos sistemas de secreción introduce una serie de factores que causan cambios en la célula hospedadora permitiéndole vivir de forma intracelular en ella. *S. Typhi* no solo hace uso de proteínas efectoras sino que, además, tiene la capacidad de producir la toxina tifoidea la cual procede de dos toxinas, CDT y la toxina pertussis, con una estructura novedosa que la hace característica de esta bacteria.

La presencia de la toxina podría estar relacionada con una modulación de la respuesta inmune en el individuo lo que concuerda con el hecho de que haya una gran cantidad de portadores crónicos asintomáticos. Este estado de portador se debe a la formación de biofilms de *S. Typhi* en cálculos biliares de la vesícula biliar y podría corresponderse con una mayor predisposición a tener cáncer en dicho órgano.

Abstract

Salmonella Typhi, the typhoid fever causing agent, infects M cells from the gut through type III secretion systems codified by the pathogenic island 1 and 2. Subsequently, it reaches Peyer's Patches where it infects phagocytic cells which allow bacteria to disseminate across the organism. Through these secretion systems, it introduces a range of factors that cause changes in host cells, allowing bacteria to live intracellularly. *S. Typhi* not only make use of effector proteins but also, has the capacity of developing typhoid toxin which comes from CDT and pertussis toxin, with a novel structure that makes it characteristic of this bacterium. Presence of the toxin could be associated to a modulation of the immune system response in the individual which agrees with the fact that there is a large number of asymptomatic chronic carriers. This carrier state is a consequence of *S. Typhi* biofilms in gallstones from the gallbladder and could correspond to a greater predisposition of developing gallbladder cancer.

Introducción y antecedentes

Salmonella enterica serotipo Typhi es una bacteria que produce una enfermedad sistémica conocida como fiebre entérica o fiebre tifoidea. Esta infección se encuentra restringida al hombre y se contrae por ruta fecal-oral a partir de enfermos, convalecientes o portadores, siendo de transmisión hídrica en países subdesarrollados, mientras que en países industrializados ésta tiene lugar a través del contacto directo o por la ingestión de alimentos contaminados. No existe ningún reservorio animal, aunque este serotipo produce en animales una enfermedad diseminada, similar a la fiebre tifoidea.

Pertenece al serogrupo D; con antígeno O (9-12), antígeno H monofásico (d) y antígeno Vi. Los antígenos somáticos (O) son termoestables y alcohol-resistentes y forman parte del LPS. Los antígenos flagelares (H), son de naturaleza proteica y termolábiles; la flagelina (proteína estructural de los flagelos) es un antígeno importante. El antígeno capsular (K) - el único que se conoce es el antígeno Vi - es un polímero lineal que puede estar acetilado ¹.

Aunque este patógeno es invasivo, no desencadena una respuesta inflamatoria rápida ni causa diarrea siendo dicha falta de respuesta inflamatoria lo que distingue a *S. Typhi* de otros serotipos de *Salmonella* no tifoidea (NTS). Tanto es así, que individuos que viven en zonas endémicas de fiebre tifoidea y nunca han manifestado dicha enfermedad pueden tener títulos elevados de anticuerpos Anti-Vi, sugiriendo que existe una infección subclínica ^{2, 3}; además, la fiebre tifoidea es difícil de distinguir clínicamente de otras causas de fiebre como la malaria, esencialmente debido a la coincidencia geográfica ⁴.

Se estima que cada año contraen fiebre tifoidea entre 11 y 20 millones de personas y que entre 128.000 y 161.000 de ellas acaban falleciendo, lo que supondría menos de 1%. El mayor riesgo se da en las comunidades pobres y los colectivos vulnerables, entre los que se incluye la población infantil ⁵.

S. Typhi presenta un polisacárido capsular que cubre la superficie de la bacteria y que actúa como factor de virulencia ya que le permite sobrevivir en el ambiente ácido del estómago poco después de la infección, inhibiendo la muerte mediada por el complemento y además es responsable de la resistencia a la fagocitosis ⁶.

A diferencia de lo que ocurre en otras infecciones causadas por *Salmonella*, las bacterias responsables de la fiebre tifoidea llegan al intestino delgado y atraviesan las células M, células epiteliales especializadas que recubren las placas de Peyer. Una vez se produce la interacción con las células M, *Salmonella* provoca en las mismas una reorganización del citoesqueleto de actina, induciendo cambios morfológicos en la superficie celular semejantes a proyecciones, que se denominan “*ruffling*” (ondulado) y que facilitan su internalización y la colonización

celular. Tras esta internalización, las bacterias se dirigen hacia las placas de Peyer siendo engullidas por las células fagocíticas -macrófagos, células dendríticas y neutrófilos- en cuyo interior sobreviven y se multiplican, pudiendo establecer, de esta manera, infección intracelular y diseminación sistémica ⁷.

El reconocimiento del LPS bacteriano por el TLR4 (Toll-Like Receptor) presente en la superficie de los macrófagos, provoca la liberación de citoquinas y quimioquinas IL-6 e IFN- γ que sirven como señal inicial para el reclutamiento de fagocitos. La respuesta inmune iniciada en las placas de Peyer provoca una llegada de neutrófilos y monocitos que ayudan a disminuir la dispersión de las bacterias a tejidos sistémicos.

Durante la infección inicial, los monocitos se acumulan rápidamente en las placas de Peyer y nódulos linfoides donde producen una serie de factores antimicrobianos entre los que se incluyen iNOS, TNF α e IL-1 β ⁸. Adicionalmente, los macrófagos residentes son capaces de fagocitar *Salmonella* y tras ello generar citoquinas proinflamatorias gracias al reconocimiento del LPS y la flagelina de *S. Typhi*.

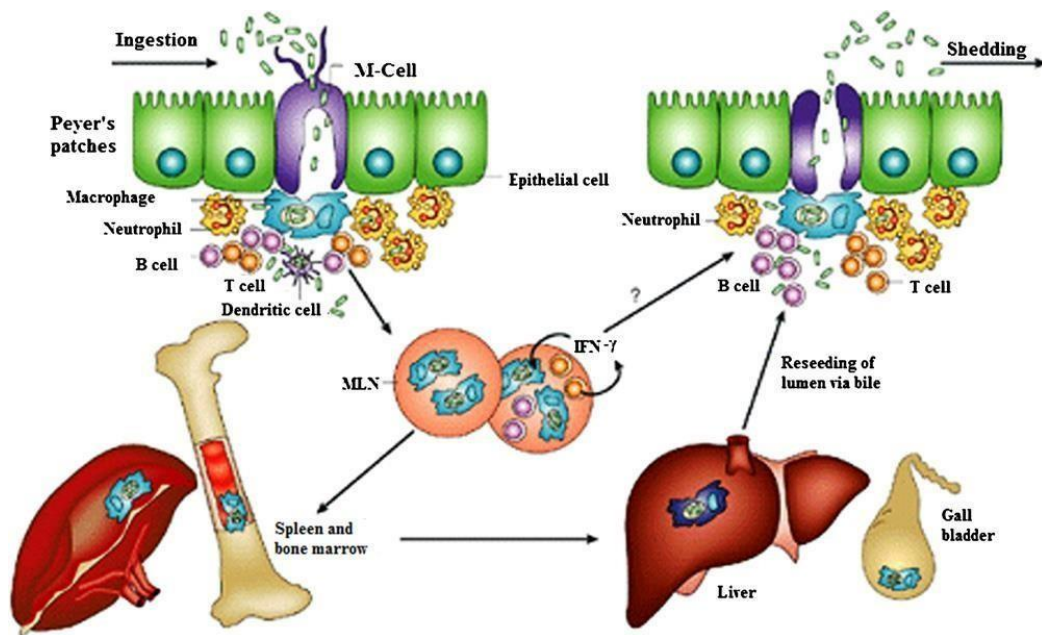


Figura 1. Diseminación de *Salmonella* a los diferentes órganos

Desde esta localización migran a los ganglios linfáticos mesentéricos los cuales se dividen estructuralmente en tres regiones con distinta composición celular; en la corteza, linfocitos B y células dendríticas; en la paracorteza, una elevada proporción de linfocitos T y células dendríticas y en la médula, linfocitos T, B y células plasmáticas. Las células dendríticas transportan a las bacterias hasta los ganglios linfáticos mesentéricos del intestino donde se activan los linfocitos T específicos de *Salmonella*.

A continuación, las bacterias pasan a sangre desde el sistema linfático a través del conducto torácico produciendo una bacteriemia primaria transitoria siendo de nuevo captadas por los macrófagos que recubren los sinusoides del hígado, bazo, médula ósea y vesícula biliar, donde las bacterias se siguen multiplicando. Desde estos órganos regresan a la sangre, causando una bacteriemia secundaria comenzando en ese momento las manifestaciones clínicas (incremento de la temperatura corporal, síntomas pseudogripales e incluso problemas neurológicos).

Las bacterias vuelven a ser eliminadas de la sangre por los macrófagos y vía hígado, alcanzan la vesícula biliar donde son capaces de establecer biofilms si se dan las condiciones adecuadas, persistiendo adheridas a cálculos biliares; esto permite la reinfección del tracto intestinal estableciéndose en las placas de Peyer del íleon distal donde causan inflamación, ulceración y necrosis. Las bacterias se excretan en heces y unas tres semanas después pueden aparecer hemorragias en la zona ulcerada e incluso perforación, la cual daría lugar a una septicemia que conlleva la muerte por fiebre tifoidea en la mayoría de los casos ¹.

Aproximadamente un 90% del genoma de *S. Typhi* está relacionado con secuencias que se presentan en otros serovares de *Salmonella*, lo que significa que hay un genoma central de *Salmonella* que facilita la colonización, infección y transmisión. El genoma específico de *S. Typhi* presenta unos 300-400 genes que están asociados a fagos específicos o a Islas de Patogenicidad de *Salmonella* (SPIs); hasta ahora se han descubierto 15 SPIs en *S. Typhi*, dos de las cuales (SPI-1 y SPI-2) codifican sistemas de secreción de proteínas muy importantes en la patogenia. Estas SPIs se encuentran flanqueadas por secuencias repetidas y tienden a poseer una composición variada de G/C comparada con las regiones a su alrededor ⁹.

S. Typhi produce un repertorio de productos que contribuyen a la patogénesis, algunos son compartidos por el resto de serovares o serotipos pero otros son únicos como es el caso de la **toxina tifoidea**, la cual es altamente inmunogénica y su expresión se encuentra altamente regulada cuando *S. Typhi* infecta células humanas ⁴.

La supervivencia de *S. Typhi* en el interior de los macrófagos se debe fundamentalmente a una resistencia al estrés oxidativo, por ejemplo mediante la reducción de intermediarios reactivos de nitrógeno, la actuación de la arginasa así como enzimas que degradan peróxidos (3 catalasas y 2 alquil hidroperóxido reductasas) ⁶.

El resultado de la infección de *Salmonella Typhi* viene determinado por factores relacionados tanto con el hospedador como con la bacteria. Esto incluye la virulencia de *S. Typhi*, la habilidad del hospedador para ejercer una respuesta inmune adecuada y finalmente con su capacidad para destruir el patógeno ⁷.

Objetivos

- Determinar cuáles son los factores de *S. Typhi* que intervienen en su patogenicidad, profundizar en el estudio de la toxina tifoidea y cómo ésta actuaría en el curso de la infección
- Analizar por qué *S. Typhi* se trata de un serotipo que solo afecta a humanos y qué le distingue de otros serotipos de *Salmonella*.
- Estudiar el estado de portador sano y asintomático y su relación con el cáncer de vesícula biliar.

Metodología

Revisión bibliográfica a través del uso de las herramientas proporcionadas por la Universidad Complutense de Madrid, como son artículos de revistas científicas, libros de texto así como bases de datos como PubMed.

Resultados y discusión

Salmonella ha desarrollado estrategias intrincadas para vencer o manipular la integridad de la barrera epitelial del intestino y para sobrevivir y multiplicarse dentro de los macrófagos. Las Islas de Patogenicidad de *Salmonella* están relacionadas con su virulencia, es decir, con fenómenos como la adhesión e invasión; SPI-1 y SPI-2 tienen distintos papeles en la patogénesis de *Salmonella*.

SPI-1 es activa cuando la bacteria es extracelular, ya que contiene genes para la invasión de células no fagocíticas del hospedador y es necesaria para que se produzca la infección intestinal, mientras que SPI-2 se relaciona con la capacidad de las bacterias de sobrevivir en el interior de los macrófagos, se activa tras la internalización y es necesaria para crear un nicho intracelular estable y permisivo, denominado **vacuola que contiene *Salmonella*** (VCS) y, por lo tanto, se requiere para la patogénesis intracelular ¹⁰.

Tanto SPI-1 como SPI-2 van a codificar sistemas de secreción de proteínas tipo III cruciales en *S. Typhi*, sin embargo, no van a ser iguales así como tampoco lo son los productos que translocan de un lado a otro de la membrana.

Isla de patogenicidad de *Salmonella*-1 (SPI-1) y sistema de secreción tipo III 1 (T3SS1).

El sistema de secreción tipo III 1 es un complejo proteico, codificado por SPI-1, cuya función esencial consiste en la transferencia de proteínas directamente desde el citoplasma bacteriano a la célula hospedadora; se le conoce como 'jeringuilla molecular' ¹¹ y está asociado con, al menos, 20-30 proteínas estructurales y reguladoras relacionadas con la invasión celular ^{12, 13}. Se trata de un sistema ATP-dependiente y es similar al aparato flagelar.

La estructura de la base del complejo T3SS1, constituida por varios anillos conectados entre sí, se extiende desde la membrana interna hasta la membrana externa de *Salmonella*, y de ella sale una estructura en forma de aguja que interacciona con la célula hospedadora. En el interior de la base y de la aguja hay una varilla que forma el conducto entre el citoplasma

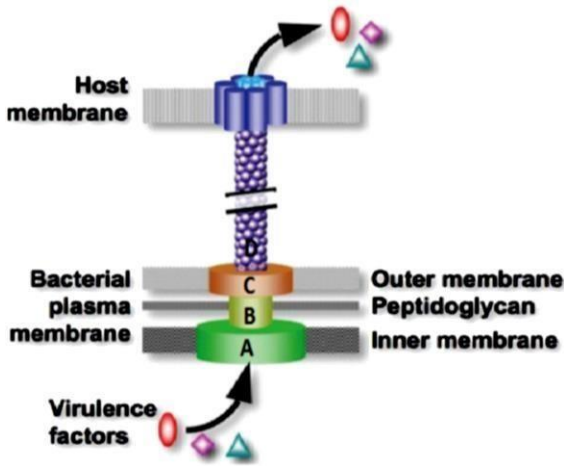


Figura 2. El T3SS está formado por un anillo (A), una maquinaria exportadora citoplásmica (B) y una estructura de anillo externa (C).

bacteriano y la membrana plasmática de la célula hospedadora ¹³. En la región citoplásmica de T3SS1 hay un complejo de ATPasa que facilita el transporte de efectores moleculares a través del conducto hacia una estructura de translocasa en la membrana de la célula hospedadora ⁹ (Fig. 2).

SPI-1 por tanto codifica una serie de proteínas efectoras que se translocan a través del T3SS1 y que desempeñan diferentes funciones en la invasión de *S. Typhi*. Dichas funciones se resumen en la Tabla 1.

Proteína efectora	Efecto en la célula hospedadora
SipA	Reclutamiento de neutrófilos y reorganización del citoesqueleto
SipB	Nucleación de actina y translocación de otros efectores
SipC	Translocación de otros efectores
SopA	Reclutamiento de células inmunes y secreción de fluidos
SopB	Reorganización del citoesqueleto, reclutamiento de neutrófilos y secreción de fluidos
SopC	Reclutamiento de neutrófilos y secreción de fluidos
SopD	Reclutamiento de neutrófilos y secreción de fluidos
SopE	Reorganización del citoesqueleto
SptP	Reorganización del citoesqueleto

Tabla 1. Proteínas efectoras del sistema de secreción de tipo III de la Isla de Patogenicidad-1

Los efectores **SipA** y **SipC** (*Salmonella* invasion proteins) afectan a la actina directamente durante los procesos de invasión, pero lo hacen a diferentes niveles. SipA puede unirse y estabilizar a la actina. SipC, que forma parte, junto con SipB, del poro de translocación de T3SS1, puede causar independientemente, el reordenamiento de la actina a través de distintos

dominios que desembocan en el ruffling de la membrana ^{14, 15, 16}, es decir, una reorganización de la membrana plasmática y del citosol de la célula hospedadora con la consiguiente formación de extrusiones o pseudópodos que rodean e internalizan a la bacteria. Además de modular la actina, SipC interacciona directamente con **Exo70**, un componente del complejo del exocisto, que interviene en el acoplamiento y fusión de las vesículas exocíticas con la membrana plasmática ¹⁷.

Salmonella también altera el citoesqueleto de actina a través de la manipulación de fosfoinosídeos. La membrana plasmática está íntimamente asociada con el citoesqueleto de actina y dicha interacción es a través del fosfatidil inositol 4-5 bifosfato (PtdIns (4-5) P2) ⁹. **SopB/SigD** (*Salmonella* outer protein) es una inositol-fosfatasa producida por SPI-1 que provoca la desaparición del PtdIns (4-5) P2 de regiones invaginadas de la membrana durante la invasión de *Salmonella* ¹⁸; esto permite que la membrana plasmática sea más elástica y así se puede facilitar el remodelamiento para la entrada de *S. Typhi*.

Los efectores **SopE** y **SopE2** actúan en concreto como factores intercambiadores de guanina (GEFs) para las pequeñas GTPasas **Cdc42** y **Rac** ¹⁹. SopE, además, puede también activar **RalA**, una GTPasa necesaria para la unión del exocisto ¹⁷.

Tras la invasión, SptP, un efector implicado en la mediación de la recuperación del citoesqueleto del huésped después de la infección, actúa como una proteína activadora de GTPasa (GAP) para **Cdc42** y **Rac1**, inactivando dichas proteínas G y devolviendo la morfología celular a un estado normal relativo ²⁰ (Fig. 3).

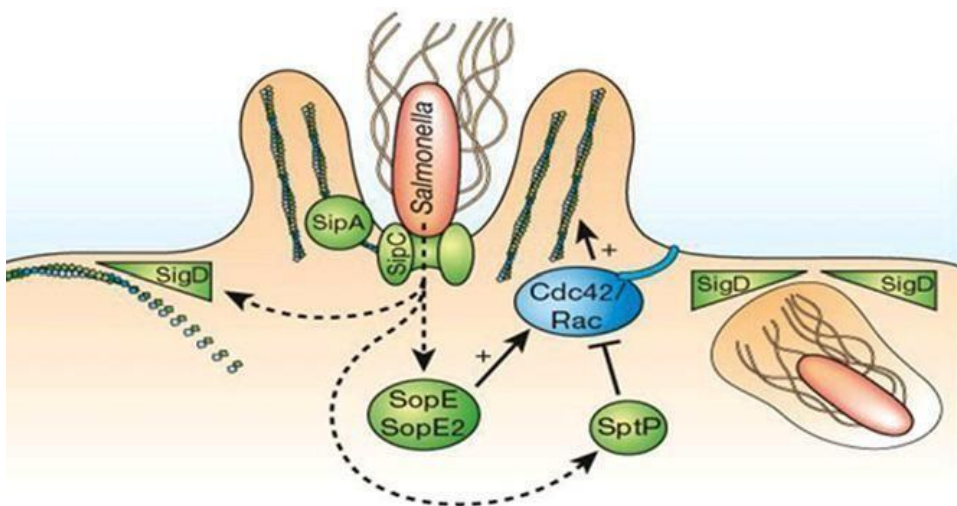


Figura 3. Entrada de *Salmonella* en la célula hospedadora

La principal proteína reguladora de T3SS1 es **HilA**, cuya expresión está mediada por factores ambientales importantes para la supervivencia celular ¹⁴.

Una vez internalizada la bacteria, queda encerrada en el compartimento VCS ²⁰ y mientras la vacuola madura, migra hacia el borde celular en la membrana basal donde *Salmonella* interactúa y penetra en los macrófagos asociados a las placas de Peyer ^{21,22}.

Parece ser que SopB altera la carga superficial de la VCS por lo que se inhibe su fusión con el lisosoma ^{18,23}. En concreto permite a la bacteria evadir el proceso normal fagolisosomal por el cual se destruiría a *Salmonella*, y es capaz así de sobrevivir en el interior de las células fagocíticas (requisito fundamental para la infección sistémica).

Isla de patogenicidad de *Salmonella*-2 (SPI-2) y sistema de secreción tipo III 2 (T3SS2).

Los genes de SPI-2 de T3SS2 solo van a ser expresados en el interior de las VCS por lo tanto son necesarios para la supervivencia intracelular y la infección sistémica. Entre ellos hay genes que codifican el aparato del sistema de secreción (ssaG-U), los genes para los efectores del sistema de secreción (sseA-F) y de las chaperonas del sistema de secreción (sscAB), así como genes que codifican proteínas reguladoras del sistema de secreción (ssrAB), siendo todos ellos necesarios para un T3SS2 funcional ²⁴.

Ciertas condiciones ambientales han sido asociadas con la inducción de la expresión de los genes de SPI-2 de T3SS2, entre las que se incluyen una baja osmolaridad, bajos niveles de ciertos nutrientes y la acidificación de la VCS ^{25,26}.

Muchas proteínas efectoras producidas por SPI-2 e introducidas por T3SS como SifA, SifB, SseJ, SseF, SseG, PipB y SopD2 interactúan con haces de microtúbulos y sus proteínas motoras asociadas, y también están relacionadas con la formación de **filamentos inducidos por *Salmonella*** (SIF) que se extienden desde la VCS ^{27,28}. Dicha formación es debida a que la VCS se fusiona con otras vesículas en la célula hospedadora. Los SIF son importantes en la patogénesis y podrían jugar un papel esencial en la replicación intracelular de *Salmonella* debido a que su formación suele coincidir con la replicación del microorganismo ²⁰.

Los genes codificados por SPI-2 en T3SS2 parecen suprimir la presentación antigénica por parte de las células dendríticas lo que limita una respuesta inmune por las células infectadas ²⁷. Cuando los fagocitos entran en los órganos, *Salmonella* puede propagarse hacia células adyacentes y disparar un mecanismo de apoptosis, lo que lleva a un incremento en la patología entre las células infectadas ²⁹.

Otras Islas de patogenicidad de *Salmonella*.

Es posible que muchos de los genes codificados por las SPI-3, SPI-4 y SPI-5 estén relacionados con las anteriores, ya que, si son desactivados, *S. Typhi* podría perder varias de

sus características virulentas y esto podría relacionarse con la pérdida de selectividad en sus hospedadores en estos serovares.

Toxina tifoidea

Salmonella Typhi posee un potente factor de patogenicidad que es la toxina tifoidea, la cual se ha descubierto recientemente. Dicha toxina parece haber surgido tras la combinación evolutiva de las actividades de dos exotoxinas antecesoras, como son CDT (*Cytolethal Distending Toxin*, un tipo de toxinas heterotriméricas producidas por bacterias Gram negativas con actividad DNAsa) y la toxina pertussis ³⁰.

Se trata de una toxina de tipo AB con una estructura única **A₂B₅** sin precedentes. A diferencia de otras toxinas de tipo AB, como la toxina Shiga, la toxina colérica o la toxina pertussis en las que solo existe una subunidad A, la toxina tifoidea está constituida por dos subunidades A, CdtB y PltA, unidas covalentemente entre sí y asociadas no covalentemente a la subunidad B pentamérica PltB ³¹ (Fig.4).

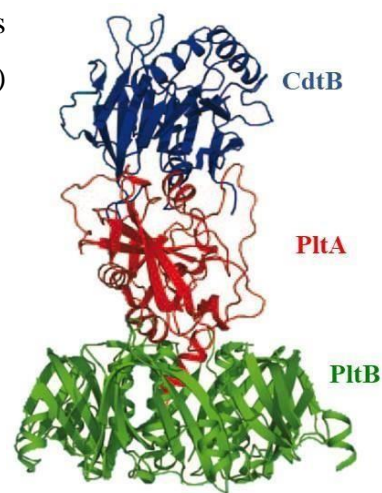


Figura 4. Estructura toxina tifoidea

La existencia de un único residuo de cisteína en las dos subunidades A permite la formación de un puente disulfuro que las mantiene unidas covalentemente, no habiendo ningún otro tipo de interacción entre ambas.

La subunidad PltA se asocia con el pentámero PltB a través de una hélice corta en el carboxilo terminal que se inserta en el lumen hidrofóbico del canal PltB. No existen interacciones entre CdtB y PltB. La subunidad CdtB se ancla al complejo PltA/PltB a través del puente disulfuro entre ambas subunidades A, siendo necesario ese puente para el ensamblaje de la toxina tifoidea en el periplasma de la bacteria.

PltA es una ADP ribosil-transferasa, que posee una secuencia aminoacídica así como semejanzas estructurales a las de la toxina pertussis S1 ³¹, mientras que CdtB tiene una actividad desoxirribonucleasa que detiene el ciclo celular o causa muerte celular debido al daño que causa en el ADN de la célula intoxicada ^{32,33}.

La subunidad PltB de la toxina tifoidea se une a un receptor que contiene una secuencia consenso de un sialoglicano específico. Se trata del ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac)- α 2,3Galactosa (Gal)- β 1,3/ β 1,4Glucosa/N-acetilglucosamina (GlcNAc), muy común entre las glicoproteínas superficiales y que se encuentra abundantemente en humanos ³⁴. De esta secuencia trisacáridica, el azúcar terminal ácido N-acetilneuramínico es el más importante en

la unión ya que va a encajar en un bolsillo de PltB gracias a una serina.

La toxina tifoidea está codificada en una isla de patogenicidad y se produce exclusivamente por la bacteria cuando se encuentra en células infectadas. Una vez sintetizada es excretada en el interior del lumen de la VCS por **TtsA** (typhoid toxin secretion protein A) la cual pertenece a una clase de endolisinas de bacteriófagos. En concreto, TtsA se trata de una N-acetil-β-D-muraminidasa.

Tras su secreción en el lumen de la VCS, la toxina es empaquetada en transportadores vesiculares y transportada al espacio extracelular donde puede alcanzar células diana. Es importante destacar que la toxina no necesariamente afecta las células que contienen las bacterias, sino que puede intoxicar a cualquier célula localizada en un lugar remoto, tenga o no en su interior VCS, como neutrófilos, células endoteliales del cerebro, linfocitos, etc. ^{31, 33}.

La toxina tifoidea muestra una gran selectividad por los azúcares terminados en Neu5Ac (ácido N-acetilneuramínico), los cuales son muy comunes en las células humanas, al contrario que Neu5Gc (ácido N-glicolilneuramínico) que es más propio de otros mamíferos como los

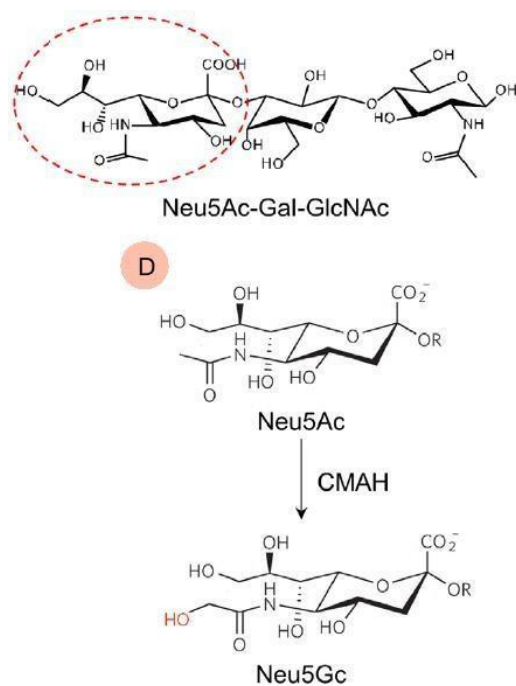


Figura 5. Conversión de azúcares por CMAH

En el caso de los ratones, éstos presentan una CMAH funcional y su expresión es variable ya que tienen los dos tipos de azúcares terminales, por lo que la toxina tifoidea es capaz de inducir los síntomas de la fiebre tifoidea en ellos. Sin embargo, si se expresa constitutivamente la enzima en los ratones para que sólo expresen Neu5Gc, se ha demostrado que son totalmente resistentes a la toxina tifoidea ³⁶.

chimpancés, esta sería una de las razones esenciales por la especificidad de *S. Typhi* por los seres humanos.

La presencia de este azúcar inusual en humanos se debe a la mutación del gen que codifica la enzima CMP-ácido N-acetilneuramínico hidroxilasa, **CMAH**, la cual está presente en otros mamíferos y convierte Neu5Ac en Neu5Gc ³⁵ (Fig. 5); se cree que dicha mutación podría haber surgido después de que los homínidos se separasen de otros primates. Esta es la razón por la cual *S. Typhi* no causa fiebre tifoidea en chimpancés (ya que su toxina no tiene un receptor al que unirse), y es un serotipo restringido a los seres humanos.

La secuencia consenso trisacáridica es, por tanto, el receptor de la toxina tifoidea; se une a PltB a través de interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno y es bastante común en la superficie de las glicoproteínas, aunque varía en diferentes tipos celulares (más o menos glicosiladas u otras modificaciones). En el caso de las células epiteliales, su receptor es la proteína tipo Podocalyxina-1 mientras que en células del sistema inmune como monocitos o linfocitos B y T el receptor se trata del CD45 ³⁶.

Un hecho poco corriente, es que cuando se administra la toxina intravenosamente en ratones, ésta se dirige principalmente a dos sitios, el bazo (junto con los fagocitos infectados) y el cerebro, concretamente, en torno a la barrera hematoencefálica, y sin embargo no se localiza en el endotelio de vasos sanguíneos de otros órganos lo que supone un mecanismo *in vivo* que aún está por entender.

En bajas concentraciones, la toxina tifoidea se une a las células del sistema inmunitario y ayuda aparentemente a *S. Typhi* a establecer una infección persistente en el tiempo a través de una alteración en la respuesta inmune innata y adaptativa ³⁷, mientras que, al contrario, a altas concentraciones, la toxina es capaz de destruir dichas células inmunes. La toxina tifoidea parece jugar un papel esencial, además, en las manifestaciones clínicas de la fiebre tifoidea. Existe otro mecanismo por el cual *S. Typhi* tiene restringida su replicación en hospedadores no humanos. En las células de estos hospedadores se producen unas GTPasas Rab (Rab29, Rab32 y Rab380), necesarias para la formación de intermediarios que intervienen en el transporte de la toxina tifoidea al ambiente extracelular y que son reclutadas al interior de la vacuola que contiene *S. Typhi* pero no a la que contiene *S. Typhimurium* ^{38, 39}.

Una de ellas, **Rab32**, la más importante, actúa en unión a **BLOC-3**, un factor intercambiador de nucleótido, transportando unos factores antimicrobianos a la VCS donde se encuentra *S. Typhi*, acabando así con la bacteria (Fig.6).

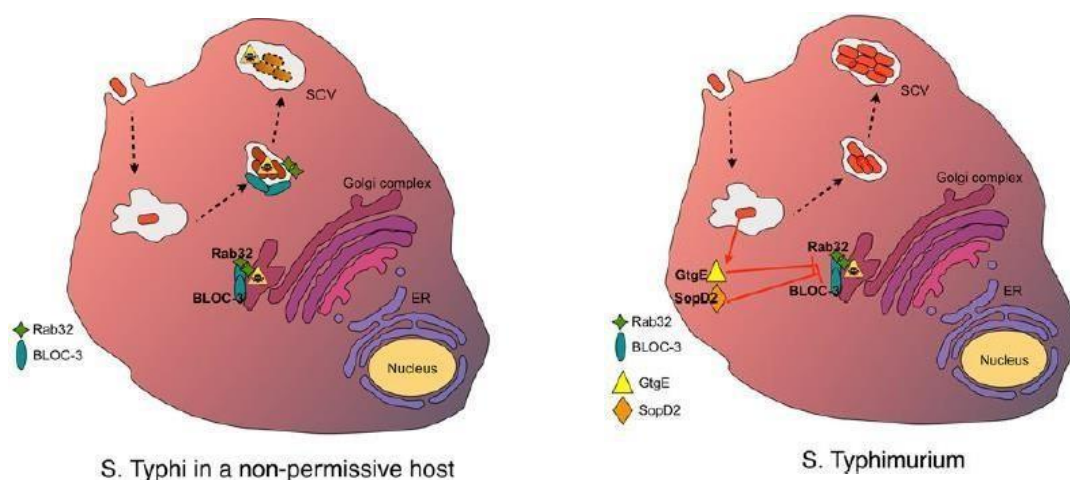


Figura 6. Mecanismo de defensa mediado por Rab32/BLOC3 en *S. Typhi* en hospedador no humano

Esto, sin embargo, no ocurre en células y tejidos de ratones deficientes en **Rab32** o en su factor intercambiador de nucleótido **BLOC-3** ⁴⁰. Rab32 define, por lo tanto, un nuevo modelo de mecanismo de defensa basado en la entrega de un factor antimicrobiano a la VCS de *S. Typhi* ³⁰.

Además Rab32 es escindida específicamente por la actividad proteolítica de **GtgE**, una proteína efectora del T3SS1 del SPI-1, producida por *S. Typhimurium* pero no por *S. Typhi*. GtgE actúa junto con una segunda proteína efectora, **SopD2** que, aunque no se trate de una proteasa, inactiva Rab32 funcionando como GAP (proteína que acelera el intercambio de GTP→GDP) para su GTPasa ³⁷.

Como se ha mencionado anteriormente, la presencia de la toxina en dosis bajas podría intervenir en una infección persistente lo que estaría directamente relacionado con un estado de portador crónico. En regiones donde *S. Typhi* es endémica, aproximadamente un 1-4% de los individuos infectados pasan a ser portadores crónicos asintomáticos los cuales representan un peligro para la salud local pública ^{41, 42}. Dicha infección crónica normalmente se localiza en la vesícula biliar, lo que se relaciona con una excreción de la bacteria a largo plazo. Además, aproximadamente un 90% de esos portadores crónicos posee también cálculos biliares y esta asociación se relaciona con una mayor predisposición para desarrollar un cáncer de vesícula biliar ⁴³⁻⁴⁷.

Se trata del sexto cáncer más común del tracto gastrointestinal y representa uno de los más malignos debido a que se extiende por todo el tracto biliar. Su malignidad ha sido asociada con factores genéticos y de estilo de vida, pero la infección por *S. Typhi* y la producción de cálculos biliares son los principales factores de riesgo.

Recientemente, la técnica de PCR anidada reveló la presencia del gen de la flagelina de *S. Typhi* en un 67.3% de muestras hepatobiliares de pacientes con cáncer de vesícula mientras que, en pacientes con enfermedades benignas de la vesícula y población sana, este porcentaje era significativamente más bajo ⁴⁵, por lo que la detección temprana de *S. Typhi* podría usarse como estrategia de prevención de cáncer de vesícula.

La producción de un biofilm podría ejercer un papel clave en la colonización y persistencia crónica de *S. Typhi* ⁴⁸. Existen informes que documentan que la bilis, rica en lípidos y con actividad antimicrobiana, induce la producción de una matriz formada por un exopolisacárido de antígeno O que facilita la formación del biofilms de *S. Typhi* sobre la superficie de los cálculos biliares humanos

De ser así, podría darse un ambiente propicio para la persistencia de la bacteria y que ésta pudiera ser liberada al intestino donde, a través de las heces, reinfectaría a nuevos

hospedadores; además el epitelio de la vesícula estaría en continua exposición a los factores de patogenicidad de la bacteria (propiedades carcinogénicas potenciales).

Actividad carcinogénica potencial de productos de *S. Typhi*

Diferentes productos bacterianos poseen potencial carcinogénico entre los que se incluyen la glucuronidasa, que después de actuar sobre la bilis origina unos intermediarios de alta energía, y los compuestos nitrosos, generados a partir del nitrato por acción de enzimas bacterianas ⁴⁹, pero esencialmente la subunidad **CdtB** de la toxina tifoidea induce un daño en el DNA y provoca la detención del ciclo celular, así como apoptosis; en concreto, dicha subunidad es un homólogo de la DNAsa, una endonucleasa que causa la ruptura de la doble hebra de DNA.

La toxina entra en la célula a través de endocitosis y es transportada al aparato de Golgi que la guía hacia el retículo endoplásmico; a continuación, la subunidad CdtB se transloca al núcleo celular para provocar el daño en el DNA ⁵⁰. Este hecho activa una cascada de acontecimientos como es el reclutamiento del complejo sensor al daño de DNA llamado **MRN** que inicia la resección del extremo del DNA produciendo un extremo 3' y además, la acumulación de la quinasa **ATM** en el sitio del daño ⁵¹. Esta quinasa promueve la fosforilación de la histona H2AX y la activación de una serie de puntos de control de daño del DNA entre los que se incluyen el supresor de tumores **p53** y su efector **p21**, que paran el ciclo celular en G1 ⁵².

Por otra parte, ATM activa el punto de control 2 (CHK2) que inactiva la fosfatasa de ciclo de división celular (CDC25) y cuando dicha fosfatasa no funciona, se acumula la forma hiperfosforilada de una ciclina (CDK1) que bloquea la proliferación celular en la fase G2/M del ciclo celular ⁵³ (Fig. 7).

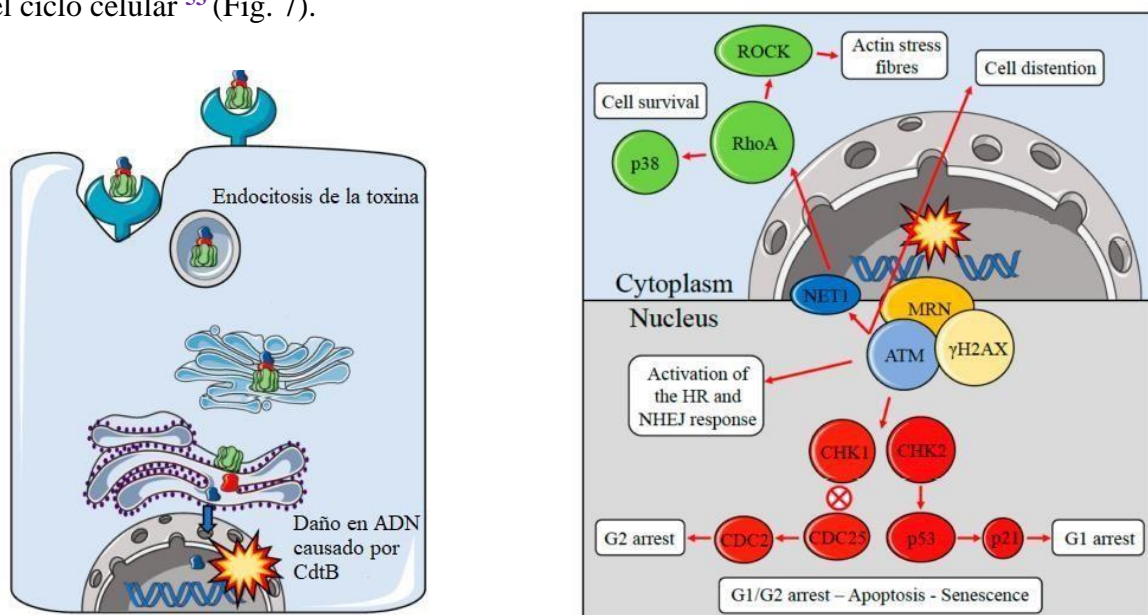


Figura 7. Entrada de la toxina y daño en el núcleo celular

La supervivencia de las células expuestas a la toxina tifoidea se debe, por otra parte, a la activación de genes homólogos de las GTPasas Ras, en concreto **RhoA**, que previene la muerte celular a través de la activación de p38 y MK2 ⁵⁴, aunque los factores que interrumpen la progresión del ciclo celular pueden provocar la adquisición de mutaciones.

Las respuestas provocadas por CdtB en la célula contribuyen a la acumulación de inestabilidad genética que, junto con una respuesta inflamatoria local crónica por la infección persistente, proporcionan un ambiente propicio para la transformación de células pre-neoplásicas a células malignas en el hospedador. La producción de biofilms por *S. Typhi* en la vesícula biliar puede representar un factor clave para la promoción de dicha infección persistente y, por lo tanto, a la exposición del epitelio a un daño repetido causado por toxinas cancerígenas ⁴⁹. No obstante se necesitan estudios adicionales para investigar la posible asociación entre *S. Typhi* productora de biofilms, portadores crónicos con cálculos biliares y la aparición de cáncer de vesícula biliar ⁴⁸.

Producción de biofilms

La persistencia crónica, la dificultad en la erradicación terapéutica de *S. Typhi* junto con su habilidad para evadir la respuesta inmune del hospedador, sugieren que se trata de bacterias formadoras de biofilms ⁴⁶.

Se ha encontrado *S. Typhi* en muestras de biopsias de vesícula biliar procedentes de pacientes que han sufrido una colecistectomía y en la observación microscópica de los cálculos, se reveló una capa de biofilm que cubría su superficie ^{54, 55}. Puede ser que *S. Typhi* haya desarrollado una estrategia específica para formar un biofilm sobre la superficie de los cálculos biliares y de esta forma persistir crónicamente en la vesícula biliar y apoyar el proceso microbiano continuo de reinfección, seguido por diseminación bacteriana a través de la orina y las heces, como se observa en portadores crónicos ⁵⁶.

La colonización de los cálculos biliares expone a *S. Typhi* a la bilis la cual posee propiedades antimicrobianas, entre otras. Esta bacteria aparentemente tolera este ambiente hostil demostrando que su resistencia a la bilis supone un mecanismo de patogénesis muy importante tanto en la infección de vesícula biliar aguda como la crónica ⁵⁷. La presencia de la bilis puede inducir procesos pleiotrópicos en la bacteria como la regulación de la expresión de numerosos genes.

Se ha demostrado que *S. Typhi* es capaz de formar biofilms en cálculos biliares humanos “in vitro” utilizando tubos Eppendorf recubiertos de colesterol (el colesterol es el principal componente de los cálculos, además de otros compuestos como la bilirrubina cálcica) e

incubados con la bacteria en presencia de bilis. La bilis ejerce un efecto intenso en la regulación directa e indirecta de genes en *S. Typhi* mediante la regulación a la baja de la expresión de genes que se ven involucrados en la invasión celular, en la movilidad y proteínas de membrana externas ⁵⁸.

Una vez que se ha formado el biofilm, las células individuales que lo componen presentan una tolerancia mayor a agentes antimicrobianos y por tanto el tratamiento antibiótico pasa a ser inadecuado ⁴⁸. En la matriz del biofilm, las células microbianas muestran una concentración mínima inhibitoria (CMI) entre 10 y 1.000 veces mayor comparadas con las mismas células en condiciones de crecimiento planctónico ^{59, 60}. Por lo tanto, la concentración efectiva de antibióticos que habría que alcanzar para eliminar el biofilm en el organismo es imposible de conseguir debido a su toxicidad y a los efectos adversos en los pacientes.

La rápida identificación de cepas de *S. Typhi* formadoras de biofilms permitiría reconocer pacientes con alto riesgo, y eso mejoraría la prevención de cáncer relacionado con infecciones bacterianas ⁴⁸.

Conclusiones

- Los factores de patogenicidad de *Salmonella Typhi* vienen determinados por las Islas de patogenicidad, entre las que destacan **SPI-1** (con genes de invasión esenciales para la infección intestinal) y **SPI-2** (necesaria para la supervivencia intracelular de la bacteria). SPI-1 y SPI-2 codifican dos Sistemas de secreción de Tipo III, que facilitan el transporte de efectores hacia la célula hospedadora.
- La **toxina tifoidea**, uno de los principales factores de virulencia, se forma exclusivamente cuando la bacteria es intracelular y presenta una arquitectura A₂B₅ única. Uno de sus principales componentes, **CdtB**, es capaz de provocar un daño en el DNA y detener el ciclo celular, así como causar apoptosis.
La toxina tiene como receptor una secuencia trisacarídica cuyo azúcar terminal solo se encuentra en humanos debido a la desaparición de la enzima CMAH. Esta enzima está presente en otros mamíferos y, por ello, *S. Typhi* no causa fiebre tifoidea en ellos.
- *S. Typhi* es capaz de formar **biofilms** en la superficie de cálculos de la vesícula biliar, hecho que podría suponer un factor clave para el desarrollo de la infección persistente en dicha localización y a la existencia de portadores crónicos asintomáticos, que excretan la bacteria y que diseminan la enfermedad. Esta situación aumenta la predisposición de desarrollar **cáncer de vesícula biliar** ya que la persistente liberación de mediadores de inflamación, toxinas y metabolitos, pueden ser potencialmente mutagénicos.

Bibliografía

1. Martínez Álvarez N. Virulencia, resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella enterica*. Memoria Grado de Doctor. 2007.
2. Karkey A, Thompson CN, Tran Vu Thieu N, Dongol S, Le Thi Phuong T, et al. Differential epidemiology of *Salmonella* Typhi and Paratyphi A in Kathmandu, Nepal: a matched case control investigation in a highly endemic enteric fever setting. PLoS Negl. Trop. Dis. 2013; 7(8):e2391
3. Pulickal AS, Gautam S, Clutterbuck EA, Thorson S, Basynat B, et al. Kinetics of the natural, humoral immune response to *Salmonella enterica* serovar Typhi in Kathmandu, Nepal. Clin. Vaccine Immunol. 2009. 16:1413–1419
4. Dougan G, Baker S. *Salmonella enterica* Serovar Typhi and the Pathogenesis of Typhoid Fever. Annu. Rev. Microbiol. 2014; 68: 317-336.
5. WHO.int [Internet]. [actualizado Ene 2018; citado 5 abr 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/features/qa/typhoid-fever/es/>
6. Kurtz JR, Goggins JA, McLachaln JB. *Salmonella* infection: Interplay between the bacteria and host immune system. Immunology Letters. 2017 (190): 42-50
7. Lahiri A, Lahiri A, Iyer N, Das P, Chakravorty D. Visiting the cell biology of *Salmonella* infection. Microbes and Infection. 2010; 12: 809-818
8. Kaiser P, Hardt WD. *Salmonella* Typhimurium diarrhea: switching the mucosal epithelium from homeostasis to defense, Curr. Opin. Immunol. 2011; 23: 456–463
9. Kaur J, Jain S. K. Role of antigens and virulence factors of *Salmonella enterica* serovar Typhi in its pathogenesis. Microbiological research. 2012; 167: 199-210
10. Hansen-Wester I, Hensel M. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. Microbes Infect. 2001; 3: 549–559
11. Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiol Mol Biol Rev. 1998; 62: 379–433
12. Marlovits TC, Stebbins CE. Type III secretion systems shape up as they ship out. Curr Opin Microbiol. 2010; 13: 47–52
13. Galán JE, Wolf-Watz H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. Nature. 2006; 444: 567–573
14. Lostroh CP, Lee CA. The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. Microbes Infect. 2001; 3: 1281–1291
15. McGhie EJ, Hayward RD, Koronakis V. Cooperation between actin-binding proteins of invasive *Salmonella*: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin. EMBO J. 2001; 20: 2131–2139
16. Myeni SK, Zhou D. The C terminus of SipC binds and bundles F-actin to promote *Salmonella* invasion. J Biol Chem. 2010; 285: 13357–13363
17. Nichols CD, Casanova JE. *Salmonella*-directed recruitment of new membrane to invasion foci via the host exocyst complex. Curr Biol. 2010; 20: 1316–1320

18. Bakowski MA, Braun V, Lam GY, Yeung T, Heo WD, Meyer T, et al. The phospho inositide phosphatase SopB manipulates membrane surface charge and trafficking of the *Salmonella*-containing vacuole. *Cell Host Microbe*. 2010; 7: 453–462
19. Thomson N, Baker S, Pickard D, Fookes M, Anjum M, Hamlin N, et al. The role of prophage-like elements in the diversity of *Salmonella* enteric serovars. *J Mol Biol*. 2004; 339: 279–300
20. Knodler LA, Steele-Mortimer O. Taking possession: biogenesis of the *Salmonella* containing vacuole. *Traffic*. 2003; 4: 587–599
21. Ohl ME, Miller SI. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annu Rev Med*. 2001; 52: 259–274
22. Pegues DA, Ohl ME, Miller SI. *Salmonella* species, including *Salmonella typhi*. In: Mandell GL, Bennet GE, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005. p. 2636–2654
23. Jantsch J, Chikkaballi D, Hensel M. Cellular aspects of immunity to intracellular *Salmonella enterica*. *Immunol Rev*. 2011; 240: 185–195
24. Hensel M. *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol*. 2000; 36: 1015–1023
25. Cirillo DM, Valdivia RH, Monack DM, Falkow S. Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol Microbiol*. 1998;30:175–188.
26. Lee AK, Detweiler CS, Falkow S. OmpR regulates the two-component system Ssra-Ssrb in *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *J Bacteriol* 2000;182:771–781
27. Waterman SR, Holden DW. Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol*. 2003; 5: 501–511
28. Abrahams GL, Hensel M. Manipulating cellular transport and immune responses: dynamic interactions between intracellular *Salmonella enterica* and its host cells. *Cell Microbiol*. 2006; 8: 728–737
29. Tierrez A, Garcia-del Portillo F. New concepts in *Salmonella* virulence: the importance of reducing the intracellular growth rate in the host. *Cell Microbiol*. 2005; 7: 901–909.
30. Galán JE. Typhoid toxin provides a window into typhoid fever and the biology of *Salmonella Typhi*. *PNAS*. 2016; 23: 6338-6344
31. Chong A, Sohyoung L, Yang YA, Song J. The role of typhoid toxin in *Salmonella Typhi* virulence. *YJBM*. 2017; 90: 283-290
32. Haghjoo E, Galan JE. *Salmonella Typhi* encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(13):4614-4619
33. Spano S, Ugalde JE, Galan JE. Delivery of a *Salmonella Typhi* exotoxin from a host intracellular compartment. *Cell Host Microbe*. 2008;3(1): 30-38
34. Song J, Gao X, Galan JE. Structure and function of the *Salmonella Typhi* chimaeric A(2)B(5) typhoid toxin. *Nature*. 2013;499(7458):350-354

35. Chou HH, Hayakawa T, Diaz S, Krings M, Indriati E, Leakey M, et al. Inactivation of CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase occurred prior to brain expansion during human evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(18):11736-11741
36. Deng L, et al. Host adaptation of a bacterial toxin from the human pathogen *Salmonella* Typhi. *Cell*. 2014; 159(6):1290–1299
37. Song J, Willinger T, Rongvaux A, Eynon EE, Stevens S, Manz MG, et al. A mouse model for the human pathogen *Salmonella* Typhi. *Cell Host Microbe*. 2010;8(4):369-376.
38. Spanò S, Liu X, Galán JE. Proteolytic targeting of Rab29 by an effector protein distinguishes the intracellular compartments of human-adapted and broad-host *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011, 108(45):18418–18423
39. Spanò S, Galán JE. A Rab32-dependent pathway contributes to *Salmonella* typhi host restriction. *Science*. 2012, 338(6109):960–963
40. Spanò S, Gao X, Hannemann S, Lara-Tejero M, Galán JE. A bacterial pathogen targets a host Rab-family GTPase defense pathway with a GAP. *Cell Host Microbe*. 2016, 19(2):216–226
41. Crump JA, Mintz ED. Global trends in typhoid and paratyphoid Fever. *Clin. Infect. Dis*. 2010, 50, 241–246.
42. Mogasale V, Maskery B, Ochiai RL, Lee JS, Mogasale VV, Ramani E et al. Burden of typhoid fever in low-income and middle-income countries: A systematic, literature-based update with risk-factor adjustment. *Lancet Glob. Health* 2014, 2, e570–e580
43. Caygill CP, Hill MJ, Braddick M, Sharp JC. Cancer mortality in chronic typhoid and paratyphoid carriers. *Lancet* 1994, 343, 83–84.
44. Dutta U, Garg PK, Kumar R, Tandon RK. Typhoid carriers among patients with gallstones are at increased risk for carcinoma of the gallbladder. *Am. J. Gastroenterol*. 2000, 95, 784–787.
45. Nath G, Singh YK, Kumar K, Gulati AK, Shukla VK, Khanna AK et al. Association of carcinoma of the gallbladder with typhoid carriage in a typhoid endemic area using nested PCR. *J. Infect. Dev. Ctries*. 2008, 2, 302–307.
46. González-Escobedo G, Marshall JM, Gunn JS. Chronic and acute infection of the gall bladder by *Salmonella* Typhi: Understanding the carrier state. *Nat. Rev. Microbiol*. 2011, 9, 9–14.
47. Gunn JS, Marshall JM, Baker S, Dongol S, Charles RC, Ryan ET. *Salmonella* chronic carriage: Epidemiology, diagnosis, and gallbladder persistence. *Trends Microbiol*. 2014, 22, 648–655.
48. Di Domenico EG, Cavallo I, Pontone M, Toma L, Ensoli F. Biofilm Producing *Salmonella* Typhi: Chronic Colonization and Development of Gallbladder Cancer. *Int. J. Mol. Sci*. 2017; 18(1887): 1-14
49. Nath G, Gulati AK, Shukla VK. Role of bacteria in carcinogenesis, with special reference to carcinoma of the gallbladder. *World J Gastroenterol* 2010 November 21; 16(43): 5395-5404
50. Miller R., Wiedmann M. Dynamic Duo-The *Salmonella* Cytolethal Distending Toxin Combines ADP-Ribosyltransferase and Nuclease Activities in a Novel Form of the Cytolethal Distending Toxin. *Toxins* 2016, 8, 121

51. Di Domenico EG, Romano E, del Porto P, Ascenzioni F. Multifunctional role of ATM/Tel1 kinase in genome stability: From the DNA damage response to telomere maintenance. *BioMed Res. Int.* 2014, 2014, 787404
52. Grasso F, Frisan T. Bacterial Genotoxins: Merging the DNA Damage Response into Infection Biology. *Biomolecules.* 2015, 5: 1762–1782
53. Li L, Sharipo A, Chaves-Olarte E, Masucci MG, Levitsky V, Thelestam M et al. The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin activates sensors of DNA damage and repair complexes in proliferating and non-proliferating cells. *Cell Microbiol.* 2002, 4, 87–99
54. Guerra L, Carr HS, Richter-Dahlfors A, Masucci MG, Thelestam M, Frost JA et al. A bacterial cytotoxin identifies the RhoA exchange factor Net1 as a key effector in the response to DNA damage. *PLoS ONE* 2008, 3, e2254
55. Dongol S, Thompson CN, Clare S, Nga TV, Duy PT, Karkey A et al. The microbiological and clinical characteristics of invasive *Salmonella* in gallbladders from cholecystectomy patients in Kathmandu, Nepal. *PLoS ONE* 2012, 7, e47342
56. Kalai Chelvam K, Chai LC, Thong KL. Variations in motility and biofilm formation of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Gut. Pathog.* 2014, 6, 2.
57. Crawford RW, Rosales Reyes R, Ramirez-Aguilar Mde L, Chapa-Azuela O, Alpuche-Aranda C, Gunn JS. Gallstones play a significant role in *Salmonella* spp. gallbladder colonization and carriage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107, 4353–4358
58. Crawford RW, Gibson DL, Kay WW, Gunn JS. Identification of a bile-induced exopolysaccharide required for *Salmonella* biofilm formation on gallstone surfaces. *Infect. Immun.* 2008, 76, 5341–5349.
59. Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song ZJ, Moser C, Jensen PØ et al. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int. J. Oral Sci.* 2011, 3, 55–65.
60. Hengzhuang W, Wu H, Ciofu O, Song Z, Høiby N. In vivo pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, 56, 2683–2690