

Patogenia de mutantes de *Salmonella Typhimurium* en dos modelos experimentales *in vivo*

Judith Velasco-Carrillo,^{1*} María Araque-Granadillo,¹ Juan Ayala-Serrano,² Delsy Dávila-Vera,³ Zulma Peña-Contreras,³ Rosa Mendoza-Briceño³

¹ Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

² Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” CSIC-UAM, Campus de Cantoblanco. Madrid, España.

³ Centro de Microscopía Electrónica “Dr. Ernesto Palacios Prü”, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

email: judithvelasco2005@yahoo.es

Con la finalidad de evaluar la patogenia en cepas de *Salmonella Typhimurium* con mutaciones en los genes *invG/invE* de la Isla de Patogenicidad de *Salmonella* 1 (SPI-1) y de los genes *ssaJ/ssaK* en la SPI-2, se evaluaron los modelos asa intestinal ligada de ratón asociado a la observación de los tejidos por microscopía electrónica de transmisión (MET) y la producción de salmonelosis sistémica en ratón. Para ello, se utilizaron seis cepas de *Salmonella*: *S. Typhimurium* SL-1344 (cepa control) y sus derivadas mutantes: Δ invEG *S. Typhimurium* SL-1344 (mutante en SPI-1) y Δ ssaJK *S. Typhimurium* SL-1344 (mutante en SPI-2), *S. Typhimurium* (cepa clínica) y sus derivadas mutantes: Δ invEG *S. Typhimurium* y Δ ssaJK *S. Typhimurium*. Los resultados de MET permitieron verificar las alteraciones morfológicas del epitelio intestinal en el ratón infectado con cepas de *Salmonella* cuyos genes de patogenicidad estaban intactos. Fue comprobada la pérdida del poder invasivo solo en las cepas mutadas en la SPI-1. A través del modelo de salmonelosis sistémica en ratón se pudo comprobar la pérdida de la capacidad de diseminación en ambas mutantes. En conclusión los modelos permitieron verificar la importancia que tienen los genes *invG/invE* de la SPI-1 y *ssaJ/ssaK* de la SPI-2 en la patogenia de la salmonelosis, utilizando como modelo experimental de infección ratones BALB/c. Se sugieren estos modelos *in vivo* para evaluar mutantes de genes implicados en la patogenia de *Salmonella*, ya que representan una herramienta importante para la comprensión de la interacción *Salmonella*-hospedero.

Palabras clave: *Salmonella*, islas de patogenicidad, mutación, microscopía electrónica de transmisión, ultraestructura.

Introducción

Salmonella enterica se encuentra asociada a infecciones gastrointestinales y septicemia en el hospedero humano, gracias a su capacidad de invasión celular y sobrevivencia intrafagocítica. La mayoría de los genes involucrados en el proceso de invasión a las células epiteliales, se encuentran localizados en la isla de patogenicidad 1 (SPI-1).

Estos genes median la formación de un primer sistema de secreción tipo 3 (SST3), encargado de translocar las proteínas efectoras en el citosol de la célula eucariota promoviendo cambios en el citoesqueleto y facilitando el ingreso de la bacteria por macropinocitosis.

Los genes localizados en la isla SPI-2 regulan la supervivencia y replicación bacteriana en los compartimientos intracelulares de fagocitos y células epiteliales, mediante la formación de un segundo SST3.^(1,2)

Para comprender estos procesos de interacción entre patógenos y hospederos humanos se han utilizado diversos modelos animales, que han contribuido de manera significativa en el conocimiento de la fisiopatogenia de la enfermedad que ocasionan^(3, 4) En relación al estudio de la infección ocasionada por *Salmonella* se han utilizado voluntarios humanos, monos, terneros, vacas, asnas de íleon de conejos y roedores.⁽⁵⁾

Entre los modelos mencionados destaca el murino, donde la posibilidad de manipular genéticamente la bacteria o la respuesta inmunológica del hospedero (ratón) permite estudiar las variaciones de la severidad de la enfermedad y facilitar la evaluación de las relaciones patogénicas entre la bacteria y el hospedero. En este orden de ideas, los análisis comparativos han revelado sorprendentes similitudes entre los mecanismos inmunológicos y genéticos que regulan la interacción de *S. enterica* y sus hospederos, tales

* Doctora en Ciencias Médicas (PhD).

como ratones, humanos y animales domésticos. Estos modelos experimentales en *Salmonella* han permitido la extrapolación de los hallazgos fisiopatológicos a otras infecciones bacterianas, causadas principalmente por enteropatógenos.⁽⁵⁻⁷⁾

En este sentido, se ha demostrado que los ratones BALB/c son particularmente susceptibles a la infección por *Salmonella* porque portan una mutación en el locus que codifica la proteína de macrófagos asociada a la resistencia natural (Nramp-1). Esta proteína participa en los mecanismos de la resistencia o susceptibilidad innata a las infecciones causadas por patógenos intracelulares.⁽⁸⁾

En Venezuela son escasos los trabajos que han incorporado modelos experimentales en animales asociados con el análisis ultraestructural para el estudio de los procesos de patogenicidad en bacterias entéricas.^(9, 10) Con la finalidad de contar con un modelo animal que permita evaluar mutantes de genes involucrados en la patogenia de *Salmonella*, se evaluaron dos modelos *in vivo* empleando ratones BALB/c, en cepas de *Salmonella* Typhimurium con mutaciones en los genes *invG/invE* de la Isla de Patogenicidad de *Salmonella* 1 (SPI-1) y de los genes *ssaJ/ssaK* en la SPI-2.

Materiales y Métodos

Cepas de *S. Typhimurium*

En este estudio se utilizaron un total de 6 cepas de *S. Typhimurium* SL-1344 y *S. Typhimurium* LMM87 correspondiente a las colecciones del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Universidad Autónoma de Madrid, España y del Laboratorio de

Microbiología Molecular, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela, respectivamente.

Las mutantes derivadas SL-1344/ Δ SPI1-R, SL-1344/ Δ SPI2-R y LMM87/ Δ SPI1, LMM87/ Δ SPI2 fueron obtenidas en un estudio anterior realizado por Velasco y col. (2010).⁽¹¹⁾ Las características de las cepas se describen en la Tabla 1.

Animales

Se utilizaron ratones BALB/c provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Los animales se mantuvieron en jaulas de polipropileno a una temperatura promedio 21°C \pm 3 alimentados con ratarina comercial (Protinal®, Caracas, Venezuela) y con agua esterilizada *ad libitum* en un ambiente de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Todos los procedimientos que se describen a continuación fueron aprobados y realizados según la normativa del Comité de Bioética del Bioterio de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela para la manipulación de animales de experimentación.

Modelo asa intestinal ligada de ratón

Para estos ensayos inicialmente se prepararon inóculos bacterianos conteniendo 3x10⁹ UFC/mL de las cepas: SL-1344, LMM87, SL-1344/ Δ SPI1-R, SL-1344/ Δ SPI2-R, LMM87/ Δ SPI1, LMM87/ Δ SPI2 a partir de cultivos frescos en caldo Luria Bertani (LB).

El modelo de asa intestinal ligada de ratón se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Jones y col. 1994.⁽¹²⁾ Se utilizaron siete ratones hembra BALB/c de

Tabla 1. Cepas de *Salmonella* Typhimurium empleadas en este estudio.

<i>S. Typhimurium</i>	Características	Origen o referencia
SL-1344	Cepa de referencia y control positivo	Co. CBMSO
SL-1344/ Δ SPI1-R	Cepa derivada de <i>S. Typhimurium</i> SL-1344, mutante en SPI-1 (deleción de los genes <i>invG</i> e <i>invE</i>)	Velasco y col. 2010
SL-1344/ Δ SPI2-R	Cepa derivada de <i>S. Typhimurium</i> SL-1344, mutante en SPI-2 (deleción de los genes <i>invJ</i> e <i>invK</i>)	Velasco y col. 2010
LMM87	Cepa de origen clínico	Co. LMM
LMM87/ Δ SPI1	Cepa derivada de <i>S. Typhimurium</i> LMM87, mutante en SPI-1 (deleción de los genes <i>invG</i> e <i>invE</i>)	Velasco y col. 2010
LMM87/ Δ SPI2	Cepa derivada de <i>S. Typhimurium</i> LMM87, mutante en SPI-2 (deleción de los genes <i>invJ</i> e <i>invK</i>)	Velasco y col. 2010

Co. CBMSO: Colección Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Universidad Autónoma de Madrid, España; Co. LMM: Colección Laboratorio de Microbiología Molecular Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela; SPI: Isla de Patogenicidad de *Salmonella*.

7 a 8 semanas de edad, los cuales se mantuvieron en ayuna por 24 horas previo al ensayo, con la finalidad de vaciar el contenido intestinal. Estos ratones fueron anestesiados con 240 mg/kg de Ketamina (Fort Dodge®) vía intradérmica y comprobado el efecto anestésico, se procedió a realizar una incisión en el abdomen de aproximadamente 2 cm de longitud para exponer el intestino delgado.

El intestino fue ligado con hilos de seda en los extremos ileocecal y a 4 ó 5 cm del ciego y con una aguja calibre 25, se introdujo a la luz intestinal 200 µL del inóculo bacteriano. El intestino fue retornado a la cavidad abdominal y los ratones fueron mantenidos vivos bajo anestesia durante 1 hora.

Posteriormente, se realizó la eutanasia con una sobredosis del anestésico empleado y el asa intestinal fue retirada de inmediato para su procesamiento y análisis ultraestructural por MET. En estos ensayos se utilizaron como control positivo y negativo la inoculación de un ratón con la cepa *S. Typhimurium* SL-1344 y otro inoculado con 200 µL de caldo LB estéril, respectivamente.

Preparación de las muestras para microscopía electrónica de transmisión

La preparación de las muestras para MET se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Longa-Briceño y col. 2006.⁽⁹⁾ Se realizaron cortes cilíndricos intestinales de aproximadamente 3 cm de largo y se colocaron en una solución fijadora de glutaraldehído al 3% y formaldehído al 3%, preparada en tampón de cacodilato 0,1M a pH 6,3; durante 5 h a 4 °C. Transcurrido este tiempo, el tejido se seccionó en segmentos de 3 mm³ aproximadamente, y se colocaron en la mezcla fijadora durante 1 h.

Posteriormente, el material se lavó en una solución tampón de cacodilato y se post-fijó por 18 h con tetraóxido de osmio (OsO₄) al 1%. Cumplido el tiempo de post-fijación se lavó nuevamente con solución tampón y se continuó con el proceso de deshidratación utilizando alcohol etílico (C₂H₆O) en concentraciones ascendentes (30%, 50%, 80% y 100%) y óxido de propileno (C₃H₆O).

Finalmente, el tejido se infiltró y se incluyó en resina epoxídica Epon 812, manteniéndose a 60°C durante 48 horas. Concluido este proceso se realizaron cortes de 90 nm de espesor y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo, para luego ser observados

bajo microscopía electrónica de transmisión (Hitachi H-7000).

Modelo de salmonelosis sistémica en ratón

El modelo de salmonelosis sistémica en ratón se realizó según la metodología descrita por Wood y col. 1998⁽¹³⁾ con algunas modificaciones, las cuales se describen a continuación. Para este ensayo se seleccionaron las cepas derivadas mutantes SL-1344/ΔSPI1-R y SL1344/ΔSPI2-R. A partir de cultivos frescos en agar LB de cada cepa, se tomó una colonia y se subcultivó en 5 mL de caldo LB, incubándose por 16 horas a 37 °C hasta obtener un crecimiento bacteriano en fase estacionaria. De este cultivo se preparó una suspensión con solución salina fisiológica (SSF) ajustada a la turbidez equivalente al Patrón N° 0.5 de MacFarland (1,5x10⁸ UFC/mL), y se tomaron 200 µL (3 x 10⁷ UFC), la cual fue introducida a los ratones por vía oral.

En este modelo se utilizaron 10 ratones hembra BALB/c de 6 a 8 semanas de edad, los cuales se mantuvieron en ayuna por 4 horas previo al ensayo. Posterior a la ingesta de la suspensión bacteriana, se les suministró agua y luego de dos horas el alimento.

La eutanasia de los ratones se realizó por dislocación cervical cuatro días posteriores a la infección y se les retiró de manera aséptica el hígado y el bazo, los cuales se homogeneizaron con 1 mL de SSF de manera independiente.⁽¹⁴⁾ Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas de cada uno de los homogeneizados y el conteo de las bacterias viables se realizó en agar selectivo y diferencial *Shigella-Salmonella* (HiMedia®, India).⁽¹⁵⁾

Se sometieron al ensayo tres ratones por cada cepa incluyendo al control positivo y los resultados se expresaron como la media del número de bacterias viables (UFC) recuperadas a partir de cada órgano ± 1 desviación estándar. En estos ensayos se utilizaron como control positivo y negativo la inoculación de un ratón con la cepa *S. Typhimurium* SL-1344 y otro inoculado con 200 µL de SSF estéril, respectivamente.

Resultados

Modelo asa intestinal ligada de ratón

Para valorar los cambios morfológicos producidos por las cepas estudiadas sobre el epitelio intestinal, fue necesario inicialmente observar los cortes de intestino correspondiente al ratón considerado como control negativo.

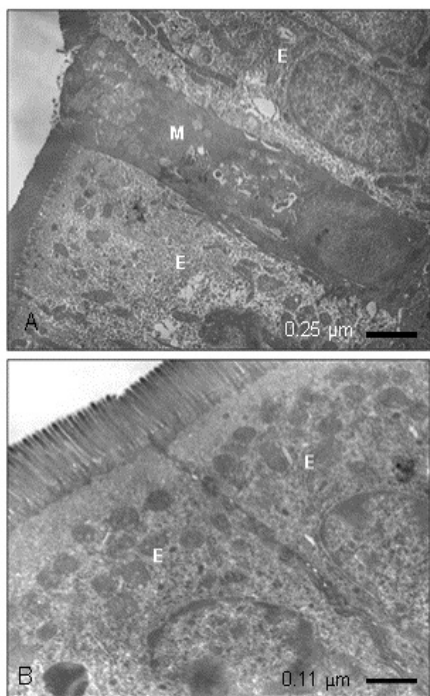


Fig. 1. Microfotografías electrónicas de transmisión de una sección de tejido intestinal a nivel de una Placa de Peyer de ratón no infectado. A) La célula M (M) se diferencia de los enterocitos (E) adyacentes por sus microvellosidades más cortas y una mayor electrodensidad. B) Enterocitos (E) de tejido normal.

En las Figuras 1A y 1B se muestran las microfotografías por MET que demuestran la estructura del epitelio intestinal sin alteraciones.

En la Figura 2, microfotografías A, B y C, se demuestra el proceso de infección del epitelio intestinal por *S. Typhymurium* SL-1344 y/o LMM87; iniciándose con una aproximación de la cepa de *Salmonella* al epitelio (A), posteriormente se establece el contacto (B) para luego, finalmente penetrar los enterocitos produciéndose, de esta manera, los cambios morfológicos de las microvellosidades (C) tales como: rearrreglo del citoesqueleto evidenciado por la invaginación del epitelio intestinal e inicio de la penetración de *Salmonella*.

La observación de los tejidos infectados indistintamente de la cepa mutada SL1344/ Δ SPI1-R y LMM87/ Δ SPI1 reveló cambios en las microvellosidades de los enterocitos (Fig. 3A). Estas alteraciones morfológicas se evidenciaron por la pérdida de la regularidad natural del epitelio, así como la aparición de espacios libres o vacíos en la estructura epitelial y liberación de detritos epiteliales en forma de vesículas ovoidales y otras de configuración irregular. En los cortes intestinales donde se logró observar bacterias, las mismas permanecieron

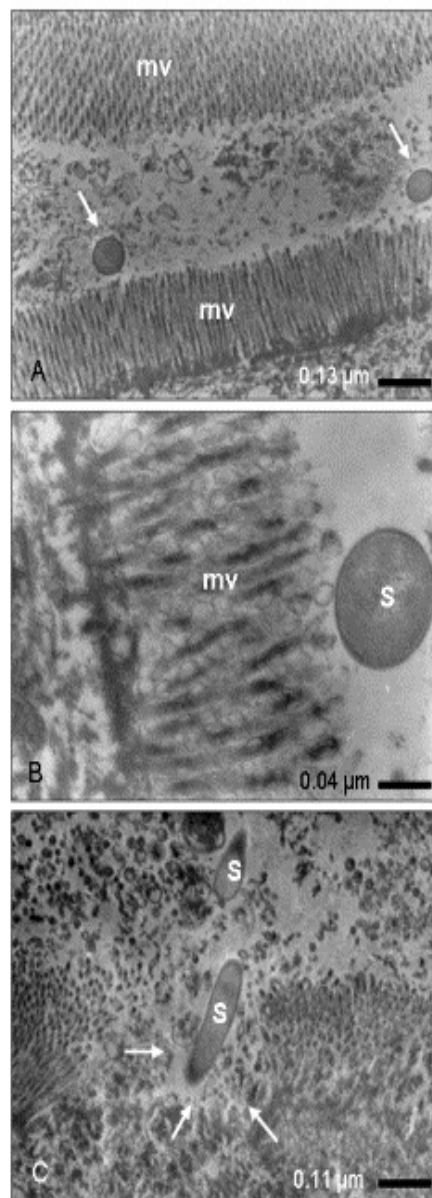


Fig. 2. Microfotografías representativas de la adherencia e invasión de células epiteliales de un asa ligada de intestino de ratón después de 60 min de infección por *S. Typhymurium* SL-1344 y/o LMM87 (cepas invasivas). A) Se observan bacterias (flechas) en la luz intestinal próximas a las microvellosidades (mv). B) *Salmonella* (S) en contacto directo con la microvellosidad. C) *Salmonella* en proceso de penetración al enterocito; se observan cambios morfológicos de las microvellosidades (mv) evidenciado por la invaginación del epitelio (flechas).

separadas del epitelio intestinal (Fig. 3B). Finalmente, las bacterias mutadas en la SPI-2 (SL1344/ Δ SPI2-R y LMM87/ Δ SPI2-R) ocasionaron modificaciones en las microvellosidades (Fig. 4A) y el rearrreglo del citoesqueleto con cambios en la estructura del enterocito, el cual adquirió forma de copa con prolongaciones

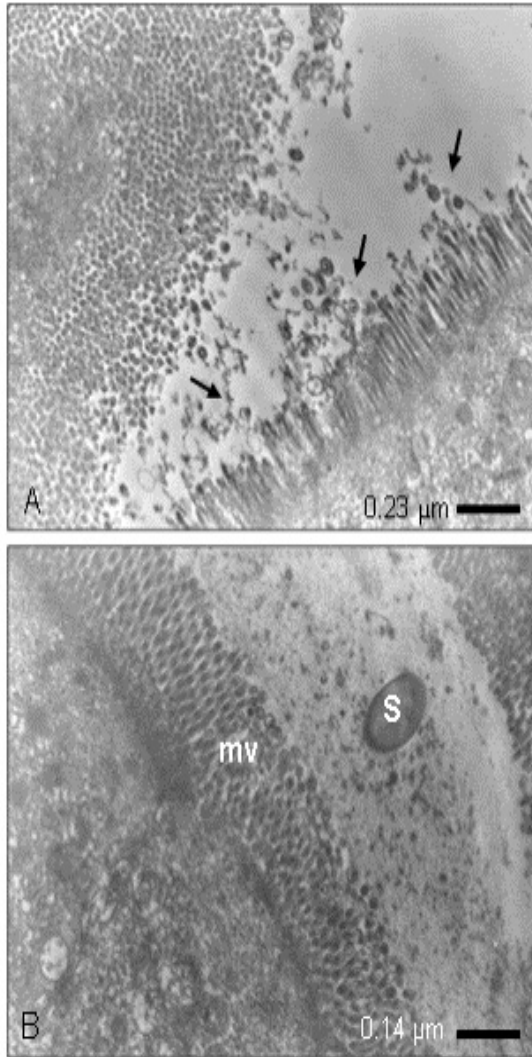


Fig. 3. Microfotografías representativas de las células epiteliales de un asa ligada de intestino de ratón después de 60 min de infección por *S. Typhymurium* mutadas en SPI-1 (SL-1344 / Δ SPI1-R y/o LMM87/ Δ SPI1). A) No se observan bacterias, sólo cambios en las microvellosidades (flechas), evidenciado por daño en la zona apical con liberación de detritos epiteliales en forma de vesículas ovoides e irregulares. B) *Salmonella* (S) se encuentra distante de la superficie de las microvellosidades (mv).

electrodensas que sugirieron la invaginación observada en los procesos de macropinocitosis (Fig. 4B).

Modelo de salmonelosis sistémica en ratón

La infección sistémica fue demostrada con la recuperación de $4,03 \times 10^6 \pm 1$ UFC y $2,5 \times 10^7 \pm 1,5$ UFC en hígado y bazo, respectivamente en ratones infectados con la cepa SL-1344. Por el contrario, no se observó desarrollo bacteriano en los cultivos de órganos homogeneizados de los ratones inoculados con las cepas

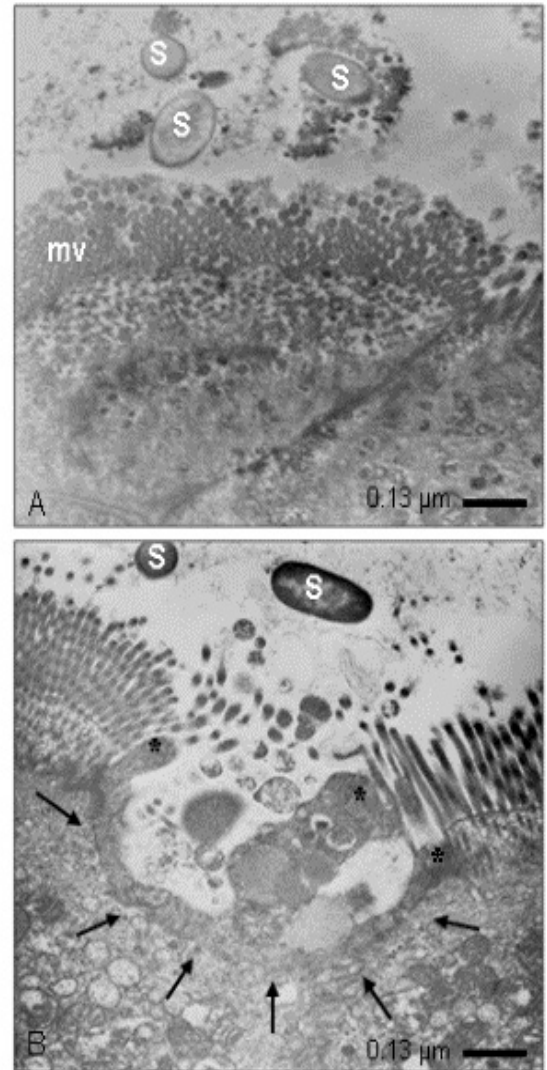


Fig. 4. Microfotografías representativas de las células epiteliales de un asa ligada de intestino de ratón después de 60 min de infección por *S. Typhymurium* mutadas en SPI-2 (SL-1344 / Δ SPI2-R y/o LMM87/ Δ SPI2). A) Se observan bacterias (S) muy próximas a las microvellosidades (mv) con cambios morfológicos de estas. B) Muestra que *Salmonella* induce cambios evidentes en la superficie del enterocito, la cual cambia su regularidad superficial (flechas), y emite prolongaciones electrodensas (asteriscos).

mutantes de SL-1344/ Δ SPI1-R y SL1344/ Δ SPI2-R (Tabla 2).

Discusión

La comprensión de los mecanismos de virulencia de patógenos bacterianos que colonizan el tracto intestinal, así como la respuesta del hospedero a este nivel, es esencial para el desarrollo de medidas preventivas y nuevos agentes terapéuticos.

Tabla 2. Contaje de bacterias viables cuatro días post-infección en el modelo de salmonelosis sistémica en ratones BALB/c.

<i>S. Typhimurium</i>	Ratón inoculado con	Inóculo inicial (UFC/mL)	Contaje post-infección (UFC/mL)	
			Hígado	Bazo
SL-1344	Cepa invasiva	3 x 10 ⁷ ± 1	4,03 x 10 ⁶ ± 1	2,5 x 10 ⁷ ± 1,5
SL-1344 /ΔSPI1-R	Cepa mutada en SPI-1	3 x 10 ⁷ ± 1	0	0
SL-1344/ΔSPI2-R	Cepa mutada en SPI-2	3 x 10 ⁷ ± 1	0	0
Inóculo sin bacterias	Caldo LB	0	0	0

SPI: Isla de patogenicidad de *Salmonella*, media ± 1 desviación estándar. UFC: Unidades formadoras de colonia. LB: Luria Bertani.

En tal sentido, se han descrito diversos modelos animales para evaluar la interacción de *Salmonella*-hospedero, el modelo de asa intestinal ligada de ratón y la observación de los tejidos por MET realizado en este estudio, permitió evaluar la pérdida de la capacidad invasiva en las cepas de *S. Typhimurium* mutadas en la SPI-1 con delección de los genes *invG/invE*, al observar sólo un ligero daño en el epitelio intestinal del ratón, con formación de vesículas ovaladas en la zona apical de las microvellosidades (Fig. 3A), lo cual pudiera atribuirse al resto de los factores de virulencia descritos en este microorganismo que en este estudio no fueron alterados.^(1, 5)

En el caso de las cepas de *S. Typhimurium* mutadas en la SPI-2 mostraron la capacidad de adherirse al epitelio intestinal e inducir el rearrreglo del citoesqueleto para promover la fagocitosis característica de *Salmonella* (Fig. 4B), como primer paso en la invasión de las células del hospedero, ya que la SPI-1 permaneció intacta. Estos resultados confirman la importancia de los genes *inv* de la SPI-1 que codifican el SST3 indispensable para el proceso de invasión de células eucariotas.

En este caso la proteína InvG participa en la formación del anillo externo de la base del complejo aguja y la proteína InvE permite el correcto ensamblaje del SST3. De esta manera, el SST3 interviene en la regulación del proceso de secreción, disparando los eventos intracelulares que permiten la invasión.⁽¹⁵⁻²⁰⁾

El segundo modelo animal evaluado en este estudio, salmonelosis sistémica en ratón, permitió determinar la capacidad de diseminación de *S. Typhimurium* desde el epitelio intestinal hasta otros órganos como hígado y bazo, evaluando de esta forma el efecto biológico de las mutaciones en la SPI-1 y SPI-2. Las cepas mutadas en las SPI-1 y SPI-2 perdieron la capacidad de producir salmonelosis sistémica en el ratón, esto fue evidenciado por la observación de cultivos negativos de los órganos homogeneizados (hígado y bazo) 4 días post-infección. Estos resultados se correlacionan con el estudio realizado

por Coburn y col. 2005 (19), quienes inocularon ratones vía oral con *S. Typhimurium* SL-1344 y células mutantes en los genes *invA* (SPI-1) y *ssaR* (SPI-2) derivadas de esta cepa, los resultados revelaron translocación bacteriana intestinal y diseminación a hígado y bazo, y enfermedad sistémica fatal solo en el ratón infectado con la cepa invasiva.

Los resultados de este estudio permiten sugerir el modelo de asa intestinal ligada de ratón y observación de los tejidos por MET para la comprensión de la fisiopatología de la enfermedad diarreica aguda, mediante la observación de los eventos que implican la adherencia bacteriana y posterior invasión del epitelio intestinal por patógenos entéricos. Por otra parte, el modelo de salmonelosis sistémica en ratón permitió evaluar la capacidad de diseminación de un agente bacteriano a partir del epitelio intestinal a otros órganos y tejidos como el bazo y el hígado, mecanismo de virulencia con gran relevancia en algunos patógenos que facilitaría el estudio de su fisiopatología.

Conclusiones

Los modelos experimentales de infección *in vivo* empleando ratones BALB/c en este estudio, permitieron verificar la importancia que tienen los genes *invG/invE* de la SPI-1 y *ssaJ/ssaK* de la SPI-2 en la patogenia de la infección ocasionada por *Salmonella*, al observar la pérdida de la capacidad de invasión y diseminación de las mutantes de *S. Typhimurium* (ΔSPI-1 y ΔSPI-2).

Los resultados obtenidos en este estudio confirman la eficacia de este modelo animal para reproducir la enfermedad, el análisis ultraestructural por MET facilitó la observación en los tejidos de las lesiones compatibles con la salmonelosis.

Se sugieren estos modelos *in vivo* para evaluar mutantes de genes implicados en la patogenia de *Salmonella*, ya que representan una herramienta importante para

investigar y comprender la interacción *Salmonella*-hospedero.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el proyecto ALFA Bacterialnet (Contrato N° II-531-FC-FA-FCD-FI), Fundación para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología (FUNDACITE) Mérida, Venezuela (Contrato N° CF-07-10 y N° CF-09-04); el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHTA) de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela (Códigos N° FA-419-07-07-B y CVI-ADG-FA-02-97) y el Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), España (proyecto BFU2006-04574/BMC).

Referencias

- Morgan E. *Salmonella* pathogenicity islands. En: Rhen M, Maskell D, Mastroeni P, Threlfall J. *Salmonella* molecular biology and pathogenesis. London UK: Horizon Bioscience; 2007. p. 67-88.
- Ramos-Morales F. Impact of *Salmonella* enteric type III secretion system effectors on the eukaryotic host cell. *ISNR Cell Biol* 2012; 2012. Disponible en: <https://doi.org/10.5402/2012/787934> (Consultado en línea: 13 de febrero de 2016).
- Romero A, Saraceni P, Merino S, Figueras A, Tomás J, Beatriz Novoa B. The animal model determines the results of *Aeromonas* virulence factors. *Front Microbiol* 2016;7(1574). Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01574> (Consultado en línea: 12 de abril de 2017).
- Swearngen J. Choosing the right animal model for infectious disease research. *Animal Model Exp. Med* 2018; 1(2):100-108.
- Valdez Y, Ferreira R, Finlay B. Molecular mechanisms of *Salmonella* virulence and host resistance. *Molecular mechanisms of bacterial infection via the gut. Curr Top Microbiol Immunol* 2009;337:93-127.
- Mastroeni P, Sheppard M. *Salmonella* infections in the mouse model: host resistance factors and in vivo dynamics of bacterial spread and distribution in the tissues. *Microbes Infect* 2004;6(4):398-405.
- Silva G, López HS. Genes involucrados en la patogénesis, persistencia y excreción de *Salmonella* en modelos animales. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2012;25(1):107-122.
- Govoni G, Gros P. Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections. *Inflamm Res* 1998; 47(7): 277-84.
- Longa-Briceño A, Peña-Contreras Z, Dávila-Vera D, Mendoza-Briceño R, Palacios-Prü E. Effects of *Aeromonas caviae* co-cultured in mouse small intestine. *Interciencia* 2006;31(6):446-50.
- Ledón T, Rodríguez S, Matos M, Ancheta O, Benchimol M, Reinol F, Fando R. An approach for better visualization of capsular material of *Vibrio cholera* O139 strains. *Acta Microscopica* 2012;21(1):1-8.
- Velasco J, Araque M, Ayala J. Construcción de mutantes de *Salmonella* enterica por inactivación de los genes *invG/invE* y *ssaJ/ssaK* de las islas de patogenicidad 1 y 2. *Rev Colomb Biotecnol* 2010;12(2):55-66.
- Jones B, Ghorri N, Falkow S. *Salmonella* typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* 1994;180:15-23.
- Wood M, Jones M, Watson P, Hedges S, Wallis T, Galyov E. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Mol Microbiol* 1998;29(3):883-91.
- Netea M, Joosten L, Keuter M, Wagener F, Stalenoef A, Meer J, et al. Circulating lipoproteins are a crucial component of host defense against invasive *Salmonella* typhimurium infection. *PLoS ONE* 2009; 4(1):e4237. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004237>
- Liu T, König R, Sha J, Agar S, Tseng C, Klimpel G, et al. Immunological responses against *Salmonella* enteric serovar Typhimurium Braun lipoprotein and lipid A mutant strains in Swiss-Webster mice: Potential use as live-attenuated vaccines. *Microb Pathog* 2008;44(3):224-37.
- Kaniga K, Bossio J, Galán J. The *S. typhimurium* invasion genes *invF* and *invG* encode homologues of the AraC and PulD family of proteins. *Mol Microbiol* 1994;13(4):555-568.
- Clark M, Reed K, Lodge J, Stephen J, Hirst B, Jepson M. Invasion of murine intestinal M cells by *Salmonella* typhimurium *inv* mutants severely deficient for invasion of cultured cells. *Infect Immun* 1996;64 (10):4363-4368.
- Crago A, Koronakis V. *Salmonella* InvG forms a ring-like multimer that requires the InvH lipoprotein for outer membrane localization. *Mol Microbiol* 1998;30(1):47-56.
- Coburn B, Li Y, Owen D, Vallance B, Finlay B. *Salmonella* enteric serovar Typhimurium pathogenicity island 2 is necessary for complete virulence in a mouse model of infectious enterocolitis. *Infect Immun* 2005;73(6):3219-27.
- Galán J, Wolf-Watz H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nat Rev Microbiol* 2006;444(7119):567-73.

Pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium mutants in two experimental models *in vivo*

Abstract

With the aim of evaluate the pathogenesis in *Salmonella* Typhimurium strains with mutations in genes *invG/invE* of *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and genes *ssaJ/ssaK* in the SPI-2 models were evaluated ligated intestinal loop associated mouse tissues by observation by transmission electron microscopy (TEM) and the production of mouse systemic salmonellosis. For this, we used six *Salmonella* strains: *S. Typhimurium* SL-1344 (control strain) and its derived mutants: $\Delta invEG$ *S. Typhimurium* SL-1344 (mutant in SPI-1) and $\Delta ssaJK$ *S. Typhimurium* SL-1344 (mutant in SPI-2), *S. Typhimurium* (clinical isolate) and its derived mutants: $\Delta invEG$ *S. Typhimurium* and $\Delta ssaJK$ *S. Typhimurium*. TEM results allowed us to verify the morphological alterations of the intestinal epithelium in mice infected with *Salmonella* strains whose pathogenicity genes were intact. It was proven invasive power loss only in strains mutated in the SPI-1. Through systemic salmonellosis model mouse we noted the loss of the ability to spread in both mutants. In conclusion, the models allowed us to verify the importance of the *invG/invE* genes of SPI-1 and *ssaJ/ssaK* of SPI-2 in the pathogenesis of salmonellosis, using BALB/c mice as an experimental model of infection. These *in vivo* models are suggested to evaluate mutants of genes involved in the pathogenesis of *Salmonella*, since they represent an important tool for the understanding of the *Salmonella*-host interaction.

Keywords: *Salmonella*, pathogenicity islands, mutation, transmission electron microscopy, ultrastructure.

Recibido: Agosto de 2018

Aceptado: Octubre de 2018