

Ilhas de patogenicidade de *Salmonella enterica*: uma revisão

Salmonella enterica pathogenicity islands: a review

RIALA6/1458

Tanise Pacheco FORTES¹, Michel Quevedo FAGUNDES², Flávia Aleixo VASCONCELLOS³, Cláudio Dias TIMM¹, Éverton Fagonde da SILVA^{1*}

*Endereço para a correspondência: ¹Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Campus Universitário Capão do Leão, Prédio 1, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS. E-mail: efsilva@ufpel.edu.br

²Centro de Desenvolvimento Tecnológico, UFPEL

³Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, UFPEL

Recebido: 31.08.2011 - Aceito para publicação: 03.06.2012

RESUMO

Salmonella é um bom modelo bacteriano para o estudo das interações entre hospedeiro e agente patogênico. Embora muitos de seus fatores de virulência tenham sido caracterizados, os mecanismos de especificidade aos hospedeiros com o desfecho na doença não estão elucidados. As ilhas de patogenicidade (PAI) são elementos genéticos dos cromossomos de um amplo número de agentes patogênicos. Nas salmonelas, muitos dos fatores de virulência são codificados por genes presentes nas PAI, as quais são referidos como ilhas de patogenicidade da *Salmonella* (SPI). Nesta revisão, são sumarizados os relatos na literatura específica dos últimos vinte anos sobre o papel das SPI na patogenia da doença e como elas influenciam nos mecanismos envolvidos na invasão e colonização das bactérias patogênicas no hospedeiro.

Palavras-chave. *Salmonella enterica*, ilhas genômicas, salmoneloses.

ABSTRACT

Salmonella is a suitable bacterial model for conducting the study on the host-pathogen interactions. Although many virulence factors have been characterized, the host specificities mechanisms with disease outcome have not been fully elucidated yet. Pathogenic islands (PAI) are the genetic elements on the chromosomes of a large number of pathogens. In *Salmonella*, many of the virulence factors are encoded by genes on PAI, which are known as *Salmonella* pathogenicity islands (SPI). This review summarizes the reported investigations in the last twenty years regarding to the role of SPI in the disease pathogenesis, and their effects on the pathogen invasion and colonization mechanisms in the host.

Keywords. *Salmonella enterica*, genomic islands, salmonellosis.

INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Salmonella* são consideradas a principal causa de doença transmitida por alimentos no mundo. As salmonelas são geralmente transmitidas para os humanos por meio do consumo de alimentos de origem animal contaminados, principalmente a carne, aves, ovos e leite¹. A estimativa feita pela Food and Drug Administration² é de que ocorram de 2 a 4 milhões de casos de salmonelose anualmente nos Estados Unidos.

Sorovares de *Salmonella* são patógenos intracelulares capazes de causar doenças em aves e mamíferos³. Duas características marcantes na patogenia da salmonelose são a invasão do hospedeiro e a proliferação intracelular, as quais estão diretamente ligadas a genes localizados nas ilhas de patogenicidade (PAI), elementos genéticos móveis que contribuem para rápidas mudanças no potencial de virulência⁴.

Assim como outros patógenos bacterianos, *Salmonella* abriga *clusters* de genes de virulência, os quais foram adquiridos por meio de transferência genética horizontal⁵. Estes genes de virulência encontram-se reunidos em ilhas genômicas (GI), consideradas “saltos quânticos” na evolução bacteriana, podendo prover bases moleculares para o entendimento da patogênese da doença⁵. Além disso, acredita-se que os genes pertencentes aos plasmídios de virulência, operons de fímbrias, pseudogenes, fagos lisogênicos e ilhas de patogenicidade são importantes para conferir especificidade ao hospedeiro⁶.

Nesta revisão, resumimos a literatura dos últimos vinte anos com respeito ao papel das SPI na patogênese da doença e, como elas influenciam os mecanismos envolvidos na invasão e colonização dos patógenos no hospedeiro.

Ilhas de patogenicidade

As ilhas de patogenicidade são um tipo particular de ilha genômica encontradas nas salmonelas e outros patógenos. Elas estão presentes somente em bactérias patogênicas e carregam um ou mais genes de virulência⁷. A elucidação da função e da distribuição destes genes presentes nas SPI nos sorovares de *Salmonella* pode prover um entendimento da evolução dos sorovares patogênicos e o papel das SPI na diferença de patogênese e epidemiologia entre os sorovares³.

As SPI codificam genes envolvidos na adesão de células do hospedeiro, invasão, sobrevivência dentro

da célula, mecanismos de defesa do sistema imune e, ao menos em parte, na especificidade ao hospedeiro⁸⁻¹¹. Além disso, as SPI também são reconhecidas por contribuírem com a evolução genômica por transferência horizontal de genes em muitos patógenos bacterianos. Evidências indicam que elementos equivalentes em espécies não patogênicas, as ilhas genômicas, são importantes na evolução destas bactérias, influenciando traços como resistência a antibióticos, simbiose e adaptação em geral¹².

Ilha de patogenicidade da *Salmonella* - 1 (SPI-1)

A ilha de patogenicidade 1 de *Salmonella* (SPI-1) é uma região de 40 Kb que forma uma inserção específica no cromossomo⁸. Os genes presentes nesta região foram identificados originalmente em cepas mutantes deficientes na invasão da célula hospedeira. Diferente da maioria das SPI, esta não está associada com genes de tRNA, uma das características que definem uma SPI⁸.

A principal função dos genes codificados por SPI-1 são de secreção do T3SS (*Type-3 Secretory System*). Porém, nem todos os genes localizados neste *locus* estão necessariamente relacionados com o T3SS. O *cluster* do gene *sit*, por exemplo, que codifica um sistema de captura de ferro, também está localizado em SPI-1. Historicamente, a função SPI-1 está associada à invasão de células não fagocíticas, uma característica de virulência importante de *S. enterica*. O T3SS codificado pela SPI-1 forma um apêndice na superfície celular no formato de uma agulha, o qual pode mediar a secreção de proteínas de *Salmonella* extracelular diretamente no citosol das células hospedeiras de eucariotos¹³. Estas proteínas chamadas de efetoras alteram as funções celulares do eucarioto e auxiliam na infecção, promovendo a invasão de células epiteliais não fagocíticas e a iniciação da resposta inflamatória no intestino, além de estarem envolvidas na sobrevivência e persistência da bactéria no hospedeiro¹⁴.

Uma série de proteínas efetoras codificadas por SPI-1 e genes adicionais fora de SPI-1 são translocados dessa mesma forma. Um subgrupo destas proteínas efetoras modifica vias de transdução de sinais, resultando na reorganização temporal do citoesqueleto de actina na célula hospedeira. As proteínas SptP, SopE e SopE2 interferem com a função de proteínas celulares de uma família de pequenas GTPases do hospedeiro (Cdc42, Rac-1 e Rho) que regulam a formação de filamentos de F-actina e a dinâmica do citoesqueleto¹⁵.

Estas proteínas efetoras foram associadas com disrupções das *tight junctions*, sendo que SopB, SipA, SopE e SopE2 funcionam como fatores de troca de GTP, resultando na ativação de Cdc42 e levando a formação de filamentos de actina no sítio de translocação destas proteínas efetoras¹⁵. A modificação localizada do citoesqueleto é seguida de mudanças dramáticas na superfície da célula hospedeira que se aparentam como ondulações na superfície da membrana. Como consequência, células não fagocíticas como as epiteliais, internalizam grandes partículas como bactérias por meio de macropinocitose¹⁵. Foi demonstrado que a proteína efetora SptP possui um efeito antagonista pela sua função como fator ativador de GTPase. SptP pode mediar a inativação de Cdc42 e Rac-1, resultando na terminação da polimerização de actina e ondulamento da membrana¹⁶.

A translocação de proteínas efetoras de SPI-1 dentro de macrófagos pode induzir a formação rápida de um processo apoptótico. A proteína SipB codificada pela SPI-1 está envolvida na apoptose do macrófago pela ativação da caspase-1, a qual cliva a pró-IL-1B e pró-IL-18, precursores de citocinas pró-inflamatórias, uma função similar a IpaB de *Shigella* spp.¹⁷. Isto resulta, também, na liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-8.

Outra função associada à SPI-1 é o controle da captura de *Salmonella* por células dendríticas. Um trabalho com mutantes em *invC*, gene que codifica uma ATPase envolvida na geração de energia para o T3SS, mostrou que estas células foram capturadas com maior eficiência em relação à cepa selvagem, mostrando que SPI-1 funcional controla o número de bactérias que adentram as células dendríticas. Este controle, juntamente com a modulação de citocinas pró-inflamatórias, sugere que a função de modulação da resposta imune do hospedeiro é uma função de grande importância de SPI-1¹⁷.

Já o segundo subgrupo de proteínas efetoras de SPI-1 está relacionado com sintomas de diarreia. As proteínas efetoras SopA, SopB e SopD translocadas pelo sistema T3SS de SPI-1 são necessárias para este fenótipo. SopB é uma fosfatase de inositolfosfato, e sua atividade enzimática resulta na ativação de canais de cloro e perda de fluidos e eletrólitos no lúmen intestinal¹⁸. As funções de SopA e SopD não são totalmente entendidas, mas ambos efetores contribuem para o fenótipo diarréico no modelo bovino de *S. Dublin*¹⁹.

As interações das proteínas codificadas por SPI-1 com o hospedeiro parecem variar muito conforme a cepa

e o modelo de estudo. Trabalhos com cepas mutantes em diferentes modelos animais têm demonstrado incongruências entre a função do T3SS codificado por SPI-1, que se pensava ser exclusivamente de invasão celular. Por exemplo, no modelo galináceo, estudos com *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* com diferentes mutações em SPI-1 demonstraram que as proteínas codificadas por esta ilha têm um papel importante, mas não essencial na invasão tecidual²⁰. Mutantes de SPI-1 não impediram a colonização do ceco, sendo que, no fígado e baço, a invasão foi dependente de ambas SPI-1 e SPI-2^{14,20}. Já com *S. Gallinarium*, mutações em SPI-1 tiveram pouco efeito na virulência e nenhuma alteração na sobrevivência intracelular em macrófagos. Apesar disso, a sinalização pró-inflamatória e a infiltração heterófila foi dependente de SPI-1²¹.

No modelo porcino, foi demonstrado que a invasão de células epiteliais e a indução da inflamação no intestino são dependentes de SPI-1, mas a invasão nas tonsilas é independente de SPI-1²². Em células fagocíticas, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* mutantes em SPI-1 tiveram sua habilidade em invadir macrófagos drasticamente diminuída, com um aumento significativo da expressão de citocinas pró-inflamatórias, mostrando que SPI-1 é necessária não somente para invasão de macrófagos, mas para supressão da expressão prematura de citocinas pró-inflamatórias²³. Em modelo bovino, mutantes em SPI-1 apresentaram uma patologia nas alças ileais semelhantes à cepa selvagem após a infecção com *S. Typhimurium*²⁴. No modelo murino, o principal modelo de estudo de salmonelose sistêmica pela sua semelhança com a febre tifóide de humanos, foi demonstrado que a contribuição de SPI-1 na patogenia está relacionada principalmente com a sobrevivência intracelular em macrófagos²⁵ e modulação da resposta inflamatória por meio dos receptores eucariotos Nod1 e Nod2²⁶.

Quanto à invasão, a expressão de SPI-1 é importante em estágios iniciais da doença, como a invasão de células do trato epitelial, mas parece não estar diretamente envolvida em estágios mais tardios, como invasão de macrófagos hemofagocíticos²⁷. Interessantemente, foi demonstrado no modelo murino que cepas mutantes em SPI-1 e SPI-2 foram capazes de invadir e colonizar células de carcinoma de cólon, sugerindo que as proteínas codificadas por estas ilhas de patogenicidade não são essenciais para a colonização tumoral²⁸. Outro estudo demonstrava que SPI-2 era necessário para a colonização tumoral²⁹. Apesar de todas

estas evidências, em um estudo utilizando um modelo de epitélio intestinal organotípico 3D, foi demonstrado que o T3SS codificado por SPI-1 não é necessário para a invasão de células intestinais²⁹.

Cepas mutantes de *S. Typhimurium* em SPI1, SPI2 e do flagelo foram capazes de invadir diferentes tipos celulares intestinais, como enterócitos, células de Paneth e células M, mostrando que a invasão é um processo ativo de *Salmonella*, independente de T3SS. Entretanto, o T3SS de SPI-1 foi necessário para a replicação intracelular bacteriana no modelo 3D³⁰. Coletivamente, estes dados sugerem que o T3SS é dispensável para a invasão, mas é requerido para o crescimento intracelular. Estas diferenças na patogenia, juntamente com estudos filogenéticos, que demonstram que genes presentes nas ilhas de patogenicidade evoluíram diferencialmente em função e estrutura sugerem que outro papel importante das SPI é determinar a especificidade ao hospedeiro das diferentes cepas de *Salmonella*³.

A regulação da expressão de SPI-1 é um processo complexo, o qual não é inteiramente entendido. Os genes codificadores do T3SS de SPI-1 são estreitamente regulados por uma rede de reguladores transcricionais que respondem a sinais ambientais e intracelulares. Os genes de SPI-1 são reprimidos em *Salmonella* intracelular e são expressos sob condições impostas aos patógenos pelo microambiente do hospedeiro como o ambiente intestinal. Tais condições incluem níveis de oxigênio, osmolaridade, fase de crescimento, pH, presença de ácidos graxos voláteis de cadeia curta³¹.

SPI-1 codifica alguns reguladores transcricionais. HilA tem um papel de regulador principal no controle da expressão de genes da SPI-1. Este regulador ativa a expressão de genes que codificam o componente estrutural do T3SS de SPI-1, ativando também a expressão do fator transcricional tipo-AraC InvF, envolvido na regulação da expressão de HilD e HilC que interagem com uma sequência de DNA adjacente do promotor de HilA, presumidamente bloqueando a ligação de um repressor neste local, e InvF controla a expressão de genes que codificam proteínas de substrato para SPI-1³².

A regulação de SPI-1 envolve cascata de ativações transcricionais, nas quais HilD e HilC, HilA e InvF agem sequencialmente para ativar genes T3SS. Inicialmente, HilD e HilC ligam-se a diversos sítios dentro do promotor de HilA e desreprimem a transcrição de HilA. Então, HilA liga-se aos sítios de transcrição de invF e prgH, ativando sua expressão. Um regulador de captura

de ferro, Fur, modula a expressão de *hilD* por meio de sua ligação no BoxA, localizado adjacente do promotor de *hilD*³². Isto reflete o fato de que muitos sinais, tanto ambientais quanto intracelulares, afetam a expressão dos genes de SPI-1, por meio da modificação da atividade da proteína HilD. Esta cascata resulta na expressão de genes que codificam componentes do T3SS.

Ilha de patogenicidade da *Salmonella* - 2 (SPI-2)

Esta ilha de patogenicidade tem função essencial para a patogênese de *Salmonella*. O locus SPI-2 possui 40 Kb e está associado com o gene de tRNA *vallV*. No mesmo local, uma inserção de 9 Kb sem função de virulência foi detectado em *E.coli* K-12³³. SPI-2 possui uma estrutura de mosaico de pelo menos dois elementos genéticos. Uma porção de 25 Kb codifica o T3SS e tem um conteúdo de G+C de 43%. Outra porção de 15 Kb mostra uma composição de G+C similar ao *core* genômico, e genes desta porção não são necessários a função de T3SS.

SP-2 está ligada à habilidade de *Salmonella* em sobreviver nas células fagocíticas e replicar-se dentro de vesículas nas células eucarióticas. A SPI-2 foi descoberta por meio do estudo de cepas mutantes que não conseguiam proliferar sistematicamente em camundongos infectados³³, assim como por meio da triagem de regiões específicas no genoma de *Salmonella*³⁴. Cepas mutantes deficientes no T3SS que codifica SPI-2 são altamente atenuadas na sua virulência⁹ e o uso destas cepas como vacina contra a febre tifóide têm sido avaliada.

Existem vários fenótipos celulares relacionados à SPI-2. A função de T3SS codificada por SPI-2 é necessária para a proteção do patógeno nas vesículas que contêm *Salmonella* (SCV) contra os mecanismos da imunidade inata. Estudos têm mostrado que a função de SPI-2 previne a co-localização da oxidase fagocítica³⁵ e da síntese de óxido nítrico³⁶ dentro da SCV. Ambas as funções podem estar relacionadas com a modificação no tráfico da célula hospedeira³⁷. Como consequência, a *Salmonella* intracelular fica protegida de intermediários de nitrogênio e oxigênio reativos e contra a atividade antimicrobiana do peroxinitrito, o qual é gerado por reações de intermediários de nitrogênio e oxigênio reativos. Estes mecanismos de defesa representam uma adaptação específica ao ambiente intracelular, especialmente dentro de células fagocíticas.

Assim como no caso de SPI-1, o modelo animal estudado mostra diferenças importantes na função de SPI-2. Em camundongos, a virulência de *S. Enteritidis* é exclusivamente dependente de SPI-2. Por meio de estudos com cepas mutantes, foi demonstrado que mutantes de SPI-2 não são capazes de replicar-se em macrófagos²⁵, modulam a intensidade da inflamação tecidual juntamente com SPI-1²⁶ e causam depleção de células NK no baço e no sangue³⁸. Já em bovinos e galináceos, mutantes em diferentes locus de SPI-2 causaram a atenuação da virulência de *Salmonella*²⁴.

A expressão dos genes T3SS de SPI-2 é induzida em *Salmonella* intracelular e a expressão é controlada positivamente pelo sistema de dois componentes SsrAB⁴ e negativamente pela interação Ella^{Ntr}-SsrB, que controla os níveis basais de expressão de SPI-2³⁹. A proteína efetora SifA, codificada por um locus fora de SPI-2, é translocada pelo T3SS codificado em SPI-2, e esta proteína é necessária para manter a integridade da membrana fagocítica da SCV durante a proliferação intracelular. Diversas proteínas codificadas em SPI-2 são secretadas e translocadas nas células hospedeiras⁴. Para a SpiC, codificada por SPI-2, foi demonstrada funções de translocação e interferência no tráfico intracelular³⁷. Entretanto, também há evidência de que SpiC é um componente funcional do T3SS³⁷.

O locus SPI-2 é estável e parece ser conservado entre vários sorovares de *S. Enterica*. A SPI-1 está presente em *S. Enterica* assim como em *S. bongori*, enquanto a SPI-2 foi somente detectada em *S. Enterica*, sugerindo uma recente aquisição^{33,34}. A aquisição de SPI-2 é considerada um passo evolucionário em direção à colonização sistêmica de hospedeiros de sangue quente. Uma característica comum de ambas, SPI-1 e SPI-2, é que somente um subgrupo de proteínas efetoras que são translocadas é codificado por genes dentro da ilha de patogenicidade. De fato, a maioria dos efetores é codificada em *loci* distintos espalhados por meio do cromossomo⁴⁰.

Muitos destes *loci* estão associados com genes de bacteriófagos. Tanto SPI-1 quanto SPI-2 evoluíram em regiões estáveis do genoma de *Salmonella*, e estes *loci* codificam um T3SS e um pequeno número de proteínas efetoras. A maior parte das proteínas efetoras é codificada por genes localizados fora de SPI-1 e SPI-2. A associação frequente de *loci* efetores com bacteriófagos indica que estes genes efetores codificam um *pool* de fatores de virulência altamente dinâmico e móvel⁴¹. A combinação

de genes efetores em diferentes sorovares de *Salmonella* spp. pode contribuir para a especificidade ao hospedeiro dos vários sorotipos assim como para o desenvolvimento da doença⁴¹.

Ilha de patogenicidade da *Salmonella* - 3 (SPI-3)

A organização genética e funcional de SPI-3 é diferente de SPI-1 e SPI-2. Esta SPI está inserida no gene de tRNA *SelC*, um locus que serve de local de inserção de SPI em cepas de *E. coli* patogênicas. Este locus possui cerca de 17 Kb, com uma composição de bases semelhante ao *core* genômico¹⁰. Dois fragmentos de elementos de inserção estão localizados na região central de SPI-3, e o conteúdo de G+C de genes dentro deste locus é variado. Além disso, SPI-3 mostra uma estrutura heterogênea nas diferentes subespécies de *Salmonella*¹⁰.

O principal fator de virulência codificado por SPI-3 é um sistema de transporte de alta afinidade com Magnésio (MgtCB), o qual é importante para o fenótipo de *Salmonella* intracelular. Para a replicação intracelular, a bactéria precisa adaptar-se ao ambiente microbica e pobre em nutrientes do fagossomo, o qual é limitado em purinas, pirimidinas, alguns aminoácidos e Mg²⁺. Um número grande de vias metabólicas e sistemas de transporte é necessário para a adaptação a este ambiente⁴².

Cepas mutantes deficientes no sistema MgtCB são incapazes de proliferação intracelular e virulência sistêmica. Os sistemas MgtB e MgtC estão localizados na membrana citoplasmática. Enquanto MgtB é um transportador de Magnésio⁴³, a função de MgtC ainda não é clara. Outro suposto fator de virulência é o gene *misL*, que codifica um suposto T5SS com similaridade ao *VirG* de *Shigella flexneri* e a adesina AIDA-1 de EPEC¹⁰. O papel de *misL* e outros genes codificados dentro da SPI-3 ainda não foi elucidado, tendo sido sugerido que diferenças genômicas e funcionais entre SPI-3 entre sorovares podem ter implicações na especificidade de funções no hospedeiro⁴⁴.

Ilha de patogenicidade da *Salmonella* - 4 (SPI-4)

A SPI-4 foi inicialmente identificada usando uma abordagem para procurar segmentos de DNA que estavam presentes em *Salmonella* Typhimurium, mas ausentes em *E. coli* K-12 e poderiam constituir SPI⁴⁵. SPI-4 é uma inserção de 27 Kb e está localizada adjacente ao gene *ssb* tRNA-like³³. Como SPI-3, SPI-4 possui estrutura em mosaico. As fases de leitura aberta (ORF, *open*

reading frame) possuem baixo conteúdo G+C quando comparado ao cromossomo de *Salmonella*, enquanto as regiões intergênicas possuem alto conteúdo G+C⁴⁶.

O papel de SPI-4 na virulência de *Salmonella* ainda não foi completamente esclarecido, mas muitos fatores de virulência estão presentes, como o T1SS e ORFs similares a toxinas RTX³³. Genes da SPI-4 são necessários para a fase intestinal da doença pela codificação de adesinas não fimbriais²⁰. SPI-4 codifica um T1SS para a adesina não fimbrial SiiE, que media o contato íntimo da bactéria com os microvilosidades da membrana apical. SiiE é necessária para adesão da *Salmonella* às células epiteliais polarizadas¹¹.

O estabelecimento de contato próximo é um pré-requisito para subsequente invasão mediada pela translocação de proteínas efetoras comandada pelo T3SS codificado pela SPI-1⁴⁷. A adesão às células epiteliais mediada por SPI-4 pode ser um requerimento funcional para a subsequente translocação de proteínas efetoras mediada por SPI-1, resultando em inflamação e respostas inflamatórias¹¹. Sem a adesão mediada pela secreção de SiiE, *Salmonella* é quase incapaz de ativar a remodelação do citoesqueleto celular mediada pela SPI-1 levando à absorção do patógeno¹¹.

Ilha de patogenicidade da *Salmonella* – 5 (SPI-5)

SPI-5 é um pequeno locus de 7,6 Kb que está inserido adjacente ao tRNA *serT*. SPI-5 codifica proteínas efetoras para os T3SS codificados por SPI-1 e SPI-2. SopB é translocado pelo T3SS codificado pela SPI-1 e a expressão de *sopB* é controlada por HilA, o regulador de transcrição central de SPI-1³³. SopB é uma inositol fosfatase cuja atividade produz 1,4,5,6-tetraquifosfato inositol, uma molécula sinalizadora que promove a secreção de cloreto, associada ao influxo de fluido e aos sintomas de diarreia⁴⁶. Em contraste, PipB é um efetor translocado pelo T3SS codificado por SPI-2 sob o controle do sistema SsrAB³³.

SPI-5 possui estrutura de mosaico. O gene *sopB* está presente em *Salmonella bongori* e em todas as subespécies de *Salmonella enterica*. Ainda existe uma diferença na composição básica de diferentes porções de SPI-5, suportando a hipótese de aquisição independente de dois elementos no tRNA *serT*³³. Como observado para outras proteínas efetoras, a presença de genes codificando proteínas efetoras se correlaciona com a presença de SPI codificando T3SS cognatos³³. SPI-5

parece estar associada com enteropatogênese: mutações em *Salmonella* Dublin *pipD* (proteína codificada pela SPI), *sopB* (proteína exterior de *Salmonella*), *pipB* ou *pipA* tem efeito mínimo nas infecções sistêmicas em ratos, mas mostra marcadas respostas secretórias em modelos bovinos⁴⁶. Em contraste, PipB é o efetor translocado pelo T3SS codificado pela SPI-2 sob o controle do sistema SsrAB³³.

Ilha de patogenicidade da *Salmonella* - 6 (SPI-6) ou *Salmonella Chromosomal Island* (SCI)

Um locus de 59 Kb no genoma do sorovar Typhi foi chamado SPI-6 e subsequentemente SCI para o sorovar Typhimurium. SPI-6 está inserida adjacente ao gene *aspV* tRNA e contém o gene *saf* para fimbrias, *pagN* que codifica uma invasina e muitos genes de função desconhecida³³. O locus SCI foi detectado em *Salmonella enterica* subespécie I, e a presença de porções de SCI no locus *aspV* tRNA de isolados das subespécies IIIb, IV e VII foi tomada como uma indicação para a estrutura em mosaico desta SPI. Existe uma sintonia parcial entre SPI-6 e a PAI OI#7 de *E. coli* enteroemorrágica, que também está associada ao gene *aspV* tRNA. Outros homólogos de SPI-6 foram identificados nas sequência genômicas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Yersinia pestis*, mas a função destes homólogos nestes patógenos não é conhecida³³. Apesar de SPI-6 codificar muitos genes de virulência, o papel dessa ilha de *Salmonella* em animais ainda não foi elucidado⁴⁵.

Ilha de Patogenicidade da *Salmonella* - 7 (SPI-7) ou *Major Pathogenicity Island* (MPI)

SPI-7 possui 133 Kb de tamanho e está inserida adjacente ao tRNA *pheu*³³. SPI-7 é um locus específico para os sorovares Typhi, Dublin e Paratyphi C³³ e sua estrutura em forma de mosaico compreende regiões implicadas na virulência⁴⁸. Um importante fator de virulência codificado pela SPI-7 é o antígeno Vi, um exopolissacarídeo capsular. O fago *sopE* que codifica a proteína efetora SopE do T3SS-SPI1 está presente em SPI7. Outro fator de virulência é o pilus IVB codificado pelo grupo de genes *pil*³³.

A organização genômica de SPI-7 é bastante complexa e indica que este locus é composto de diferentes elementos adquiridos horizontalmente. A presença dos genes *pil*, *tra* e *sam* indica que SPI-7 se originou de um plasmídeo conjugativo ou transposon conjugativo.

Pickard et al.⁴⁹ demonstraram que uma porção de SPI-7 está presente em outras bactérias como *Pseudomonas aeruginosa* SG17M. Além disso, a perda do fenótipo capsular Vi pode ser observada em isolados do sorovar Typhi, sugerindo instabilidade do *locus* SPI-7, o qual não está presente nos sorotipos que causam diarreia inflamatória³³.

Ilha de Patogenicidade da *Salmonella* – 8 (SPI-8)

Esta ilha foi identificada durante o sequenciamento do genoma do sorovar Typhi CT18 e é um segmento de DNA com 6,8 Kb⁴⁵. O *locus* está localizado adjacente ao gene *pheV* tRNA e os fatores de virulência são bacteriocinas. A presença de um gene codificando uma integrase indica a mobilidade deste elemento³³. SPI8 parece ser específica para o sorovar Typhi, mas sua distribuição ainda não foi investigada em detalhes³³.

Ilha de patogenicidade da *Salmonella* – 9 (SPI-9)

SPI-9 possui organização similar à SPI-4 e codifica quatro genes, três deles homólogos àqueles requeridos para o T1SS⁴⁵. Os fatores de virulência codificados pelo SPI-9 são um T1SS e uma grande proteína RTX-like³³. Este *locus* também está presente no cromossomo do sorovar Typhimurium. Partes de SPI-9 e do genoma bacteriófago adjacente também estão presentes em sequências genômicas incompletas de outros sorovares e de *Salmonella bongori*, indicando uma distribuição conservada desta ilha³³.

Ilha de patogenicidade da *Salmonella* - 10 (SPI-10)

SPI-10 é uma grande inserção de 32,8 Kb localizada no tRNA *leuX*. Os fatores de virulência codificados por SPI-10 são fímbrias Sef³³. A distribuição das fímbrias Sef é restrita a um subconjunto de sorovares, como Typhi e Enteritidis, e é considerada como um fator que determina a especificidade ao hospedeiro⁴⁵.

Ilha genômica de *Salmonella* -1 (SGI-1)

O surgimento de cepas resistentes atualmente é um grande problema associado com as infecções por *Salmonella*. A caracterização dos fatores de resistência desses isolados levou à identificação de uma ilha genômica em cepas multirresistentes de *Salmonella enterica* sorovares Typhimurium DT 104, Paratyphi B

e Agona³³. Esse locus chamado de ilha genômica 1 da *Salmonella* (SGI-1) é uma ilha genômica de 43 Kb que tem 44 ORF, muitas com homologias a genes conhecidos e outros com funções desconhecidas.

Os genes de resistência a antibióticos estão localizados em um segmento de 13 Kb da SGI-1⁵⁰. Na SGI-1, genes que conferem o fenótipo de penta-resistência (i.e., resistência a tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina e sulfonamidas) estão localizados na região de resistência a multidrogas, composta por dois integrons. Além disso, um retrofago oculto foi identificado em SGI-1. Em contraste a resistência a antibióticos adquirida por plasmídeos, a SGI-1 cromossomal parece ser estável na ausência de pressão seletiva³³.

A presença de SGI-1 em *Salmonella* Typhimurium DT104 pode ser associada com o surgimento mundial e epidêmico de cepas multirresistentes. Genes associados com a mobilidade de DNA, como transposases, integrases e excisionases, com sequências similares a genes transposon foram detectados na SGI-1. Variantes da SGI-1 foram identificados em outros sorovares nas mesmas localizações cromossômicas, indicando transferência horizontal e recombinação sítio-específica³³.

Independente da origem de SGI-1, o possível mecanismo para criação das variações na resistência é por recombinação homóloga entre segmentos idênticos de DNA⁴⁵. O gene *floR* (responsável pela resistência a cloranfenicol/florfenicol) é relacionado ao gene de resistência ao cloranfenicol (*cmlA*) conhecido por estar localizado em um plasmídeo conjugativo de *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, esse gene contém um conteúdo diferente de G+C do que aquele no cromossomo de *Salmonella*, indicando que eles podem ter sido adquiridos horizontalmente⁵⁰.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste artigo de revisão, destacamos os principais avanços no conhecimento das ilhas de patogenicidade das salmonelas (SPI) nos últimos vinte anos. A análise criteriosa dos dados disponíveis sugere que as SPI são requeridas, individualmente ou de forma sinérgica, para a colonização de órgãos humanos e animais, por apresentarem importantes fatores de virulência na patogênese da doença. Não há consenso sobre o real papel ou a forma exata da participação das ilhas

de patogenicidade na patogênese das infecções por *Salmonella* spp. Estudos adicionais devem ser realizados com os antígenos das SPI, com o intuito de testar a sua capacidade de conferir proteção em modelo animal, no diagnóstico e como alvos para epidemiologia molecular durante a investigação de surtos.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro e pela concessão das bolsas de estudo aos três primeiros autores (T.P.F, M.Q.F, F.A.V.).

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Health topics Salmonella. [Acesso 2011 ago 30]. Disponível em: [http://www.who.int/topics/salmonella/en/].
2. Food and Drug Administration (FDA). *Salmonella* spp. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook, 2009. [acesso 2011 ago 20]. Disponível em: [http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm069966].
3. Eswarappa SM, Janice J, Nagarajan AG, Balasundaram SV, Karnam G, Dixit NM, et al. Differentially Evolved Genes of *Salmonella* Pathogenicity Islands: Insights into the Mechanism of Host Specificity in *Salmonella*. *PLoS ONE*. 2008;3:e3829.
4. Kuhle V, Hensel M. Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *Cell Molec Life Sci*. 2004;61(22):2812-26.
5. Fluit AC. Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*? *FEMS Immun Med Microbiol*. 2005;43:1-11.
6. Amavisit P, Lightfoot D, Browning GF, Markham PF. Variation between pathogenic serovars within *Salmonella* Pathogenicity Islands. *J Bacteriol*. 2003;185(12):3624-35.
7. Rabsh WHL, Andrews RA, Kingsley RP, Prager R, Tschape H, Adams LG, et al. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infect Immun*. 2002;70:2249-55.
8. Mills DM, Bajaj V, Lee CA. A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella* Typhimurium invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Mol Microbiol*. 1995;15:749-59.
9. Shea JE, Hensel M, Gleeson C, Holden DW. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella* Typhimurium. *PNAS*. 1996;93:2593-7.
10. Blanc-Potard AB, Solomon F, Kayser J, Groisman EA. The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella Enterica*. *J Bacteriol*. 1999;181:998-1004.
11. Gerlach RG, Jackel D, Stecher B, Wagner C, Lupas A. *Salmonella* Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesion and the cognate type 1 secretion system. *Cell Microbiol*. 2007;9:1834-50.
12. Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Rev Microbiol*. 2004;2:414-24.
13. Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Lara TM, Sukhan A, et al. Supramolecular structure of the *Salmonella* Typhimurium type III protein secretion system. *Science*. 1998;280:602-5.
14. Dieye Y, Ameiss K, Mellata M, Curtis III R. The *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI) 1 contributes more than SPI2 to the colonization of the chicken by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *BMC Microbiol*. 2009;9:3.
15. Hardt WD, Chen LM, Schuebel KE, Bustelo XR, Galan JE. *S. Typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell*. 1998;93:815-26.
16. Fu Y, Galan JE. A *Salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature*. 1999;401:293-7.
17. Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S, Zychlinsky A. The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *PNAS*. 1999;96:2396-401.
18. Norris FA, Wilson MP, Wallis TS, Galyov EE, Majerus PW. SopB, a protein required for virulence of *Salmonella* Dublin, is an inositol phosphate phosphatase. *PNAS*. 1998;95:14057-9.
19. Jones MA, Wood MW, Mullan PB, Watson PR, Wallis TS, Galyov EE. Secreted effector proteins of *Salmonella* Dublin act in concert to induce enteritis. *Infect Immun*. 1998;66:5799-804.
20. Rychlik I, Karasova D, Sebkova A, Volf J, Sisak F, Havlickova H, et al. Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis for chickens. *BMC Microbiol*. 2009;9:268.
21. Jones MA, Wigley P, Page KL, Hulme SD, Barrow PA. *Salmonella enterica* Serovar Gallinarum Requires the *Salmonella* Pathogenicity Island 2 Type III Secretion System but Not the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Type III Secretion System for Virulence in Chickens. *Infect Immun*. 2001;69:5471-6.
22. Boyen F, Pasmans F, Immerseel FV, Morgan E, Adriaensen C, Hernalsteens J, et al. *Salmonella* Typhimurium SPI-1 genes promote intestinal but not tonsillar colonization in pigs. *Microb Infect*. 2006;8:2899-907.
23. Pavlova B, Volfi J, Ondrackova P, Matiasovic J, Stepanova H, Crhanova M, et al. SPI-1-encoded type III secretion system of *Salmonella enterica* is required for the suppression of porcine alveolar macrophage cytokine expression. *Vet Res*. 2011;42:16.
24. Coombes BK, Coburn BA, Potter AA, Gomis S, Mirakhur K, Li Y, et al. Analysis of the Contribution of *Salmonella* Pathogenicity Islands 1 and 2 to Enteric Disease Progression Using a Novel Bovine Ileal Loop Model and a Murine Model of Infectious Enterocolitis. *Infect Immun*. 2005;73:7161-9.
25. Silva-Herzog E, Detweiler CS. *Salmonella enterica* Replication in Hemophagocytic Macrophages Requires Two Type Three Secretion Systems. *Infect Immun*. 2010;78:3369-77.
26. Geddes K, Rubino S, Streutker C, Cho JH, Magalhães JG, Bourhis LL, et al. Nod1 and Nod2 Regulation of Inflammation in the *Salmonella* Colitis Model. *Infect Immun*. 2010;78:5107-15.
27. Aiastui A, Pucciarelli MG, Portillo FG. *Salmonella* Enterica Serovar Typhimurium Invades Fibroblasts by Multiple Routes Differing from the Entry into Epithelial Cells. *Infect Immun*. 2010;78:2700-13.

28. Crull K, Bumann D, Weiss S. Influence of infection route and virulence factors on colonization of solid tumors by *Salmonella* Enterica serovar Typhimurium. *FEMS Immun Med Microbiol*. 2011;62:75-83.
29. Pawelek JM, Sodi S, Chakraborty AK, Platt JT, Miller S, Holden DW, et al. *Salmonella* pathogenicity island-2 and anticancer activity in mice. *Cancer Gene Ther*. 2002;9:813-8.
30. Radtke AL, Wilson JW, Sarker S, Nickerson CA. Analysis of Interactions of *Salmonella* Type Three Secretion Mutants with 3-D Intestinal Epithelial Cells. *PLoS ONE*. 2010;5:e15750.
31. Durant JA, Corrier DE, Ricke SC. Short-chain volatile fatty acids modulate the expression of the *hilA* and *invF* genes of *Salmonella* Typhimurium. *J Food Protect*. 2000;3:573-8.
32. Saini S, Ellermeier JR, Slauch JM, Rao CV. The Role of Coupled Positive Feedback in the Expression of the SPI1 Type Three Secretion System in *Salmonella*. *PLoS Path*. 2010;6:e1001025.
33. Hensel M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol*. 2004;294:95-102.
34. Ochman H, Soncini FC, Solomon F, Groisman EA. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *PNAS*. 1996;93:7800-4.
35. Vazquez-Torres A, Xu Y, Jones-Carson J, Holden DH, Lucia SM, Dinauer MC, et al. *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science*. 2000;287:1655-8.
36. Chakravorty D, Hansen-Wester I, Hensel M. *Salmonella* pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular *Salmonella* from reactive nitrogen intermediates. *J Exp Med*. 2002;195:1155-66.
37. Uchiya K, Barbieri MA, Funato K, Shah AH, Stahl PD, Groisman EA. A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. *EMBO J*. 1999;18:3924-33.
38. Karasova D, Sebkova A, Havlickova H, Sisak F, Volf J, Faldyna M, et al. Influence of 5 major *Salmonella* pathogenicity islands on NK cell depletion in mice infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *BMC Microbiol*. 2010;10:75.
39. Choi J, Shin D, Yoon H, Kim J, Lee C, Kim M, et al. *Salmonella* pathogenicity island 2 expression negatively controlled by EIIANtr-SsrB interaction is required for *Salmonella* virulence. *Proc Nat Acad*. 2010;107:20506-11.
40. Miao EA, Miller SI. A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by *Salmonella* Typhimurium. *PNAS*. 2000;97:7539-44.
41. Figueroa-Bossi N, Uzzau S, Maloriol D, Bossi L. Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Mol Microbiol*. 2001;39:260-71.
42. Garcia-del Portillo F, Foster JW, Maguire ME, Finlay BB. Characterization of the micro-environment of *Salmonella* Typhimurium-containing vacuoles within MDCK epithelial cells. *Mol Microbiol*. 1992;6:3289-97.
43. Snavelly MD, Miller CG, Maguire ME. The *mgtB* Mg²⁺transport locus of *Salmonella* Typhimurium encodes a P-type ATPase. *J Biol Chem*. 1991;266:815-23.
44. Retamal P, Castillo-Ruiz M, Villagra NA, Morgado J, Mora GC. Modified Intracellular-Associated Phenotypes in a Recombinant *Salmonella* Typhi Expressing S. Typhimurium SPI-3 Sequences. *PLoS ONE*. 2010;5:e9394.
45. Morgan E. *Salmonella* Pathogenicity Islands. In: Rhen M, Maskell D, Mastroeni P, Threlfall J. *Salmonella* Molecular Biology and Pathogenesis. Horizon Bioscience; 2007; 67-87.
46. Marcus SL, Brummel JH, Pfeifer CG, Finlay BB. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microb Infect*. 2000;2:145-56.
47. Wagner C, Polke M, Gerlach RG, Linke D, Stierhof Y, Schwarz H, et al. Functional dissection of SiiE, a giant non-fimbrial adhesion of *Salmonella enterica*. *Cell Microbiol*. 2011;13:1286-301.
48. Schmidt H, Hensel M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17(1):14-56.
49. Pickard D, Wain J, Baker S, Line A, Chohan S, Fookes M, et al. Composition, Acquisition, and Distribution of the Vi Exopolysaccharide-Encoding *Salmonella enterica* Pathogenicity Island SPI7. *J Bacteriol*. 2003;185(17):5055-65.
50. Mulvey MR, Boyd DA, Olson BD, Cloeckert A. The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microb Infect*. 2006;8:1915-22.