



# **ROL DE LOS ARN NO CODIFICANTES PEQUEÑOS EN LA PATOGENICIDAD DE *SALMONELLA ENTERICA***

**REVISIÓN NARRATIVA**

**Cabrera, Natalia<sup>1</sup>. Calvar, María Eugenia<sup>1</sup>. Cancela, María Bettania<sup>1</sup>. Corrales, Sara<sup>1</sup>.  
Olmos, Agustina<sup>1</sup>. Ponce de León, José Miguel<sup>1</sup>, Iriarte, Andrés<sup>2</sup>.**

1. Estudiante de Metodología Científica II, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay.
2. Profesor Agregado del Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay.

**Departamento de Desarrollo Biotecnológico.**

**Grupo 44**

## Índice

<b>Objetivo General</b>	<b>3</b>
<b>Objetivos Específicos</b>	<b>3</b>
<b>Metodología de búsqueda</b>	<b>3</b>
<b>Resumen</b>	<b>4</b>
<b>Abstract</b>	<b>5</b>
<b>Introducción</b>	<b>6</b>
<b>ARN no codificantes pequeños (ARNncp)</b>	<b>7</b>
<b>Enterobacterias</b>	<b>13</b>
<b>Rol de los ARNs pequeños en la patogenicidad</b>	<b>14</b>
<b>Salmonelosis</b>	<b>15</b>
<b>Virulencia</b>	<b>17</b>
<b>Conclusión</b>	<b>20</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>21</b>
<b>Referencias bibliográficas</b>	<b>22</b>

## **Objetivo General**

Revisar el estado actual de conocimiento sobre los ARNncp que pueden contribuir de forma significativa en el proceso de patogenicidad en *Salmonella*.

## **Objetivos Específicos**

Adquirir conocimientos sobre los ARN no codificantes, por ejemplo, la metodología empleada para su detección, sus características moleculares, sus funciones y su rol en la patogenicidad bacteriana. También revisar investigaciones que estudien los ARN no codificantes pequeños en diferentes enterobacterias.

## **Metodología de búsqueda**

El tema de la presente revisión bibliográfica fue seleccionado a partir de los intereses de los integrantes. Como estrategia de búsqueda bibliográfica, se plantea realizar una revisión narrativa como diseño de estudio de interés. La bibliografía fue recabada a partir de bases de datos como PubMed, Cochrane, portal Timbó y portal SciELO. La búsqueda se estableció en un criterio temporal que va de Noviembre 2022 a 2015, e incluye también los primeros hallazgos sobre el tema. En la misma se usaron palabras claves como: *Salmonella*, *RNAs*, *small RNA non coding*, *Enterobacteriaceae*, *Salmonellosis*, así como también comandos Booleanos (*small RNA non coding AND Salmonella*, *RNAs AND Enterobacteriaceae*). Se tuvieron en cuenta las revisiones tanto en español como en inglés, priorizando éste último.

En la selección de los artículos para el desarrollo de esta revisión, se priorizó la bibliografía más reciente para luego ir a la más antigua y se jerarquizó según los abstracts para luego poder leer los más relevantes. Posteriormente se realizó un resumen de los resultados de la bibliografía encontrada, la discusión de la información y relevancia de la misma, así como también se identificaron los datos contradictorios, las hipótesis convergentes y los resultados similares.

## **ROL DE LOS ARN NO CODIFICANTES PEQUEÑOS EN LA PATOGENICIDAD DE *SALMONELLA ENTERICA*.**

**Cabrera, Natalia<sup>1</sup>. Calvar, María Eugenia<sup>1</sup>. Cancela, María Bettania<sup>1</sup>. Corrales, Sara<sup>1</sup>. Olmos, Agustina<sup>1</sup>. Ponce de León, José Miguel<sup>1</sup>, Iriarte, Andrés<sup>2</sup>.**

1. Estudiante de Metodología Científica II, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay.
2. Profesor Agregado del Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay.

### **Resumen**

La salmonelosis es una enfermedad aguda causada por enterobacterias del género *Salmonella*, siendo de gran importancia en salud pública debido a su distribución mundial, y a su vía de transmisión alimentaria, principalmente a través de productos avícolas. Esta bacteria es capaz de sobrevivir y crecer en diversos nichos ambientales. Dicha supervivencia la logra modulando la expresión génica en respuesta a señales específicas de estrés ambiental, logrando evadir eficientemente el sistema inmunológico del huésped. Estas características de virulencia que tiene *Salmonella*, se centran en sistemas de control basados en los ARN no codificantes pequeños (ARNncp), siendo estos clave en su patogenicidad. Los ARNncp tienen menos de 500 nucleótidos de longitud. Principalmente actúan luego de la transcripción sobre ARN mensajeros afectando la traducción y/o la estabilidad del mismo, incrementando o reduciendo la cantidad de producto peptídico generado. Varias proteínas contribuyen a la estabilidad y función de los ARNncp bacterianos, sobre todo la proteína de unión al ARN factor huésped Q (Hfq), teniendo esta un rol importante en la virulencia en diversas bacterias. Algunos genes de virulencia se distribuyen en grupos en sectores específicos del genoma, denominadas "islas de patogenicidad" de *Salmonella* (SPI). Las SPI-1 y SPI-2 codifican los sistemas de secreción de tipo III (T3SS), estos transportan proteínas al interior de las células huésped, y de esta forma regulan la respuesta inmunitaria pudiendo aumentar su patogenicidad. Para realizar este proceso, es necesario IsrM, un ARNncp codificado en SPI-1, clave en la invasión y replicación bacteriana. Entender cómo funcionan los ARNncp es necesario para comprender completamente el fenotipo de estos patógenos y su virulencia. Por lo cual, la presente revisión reúne los datos bibliográficos relevantes encontrados sobre el rol de los ARNncp en la patogenicidad de *Salmonella enterica*.

## **Abstract**

Salmonellosis is an acute disease caused by enterobacteria of the genus *Salmonella*, having great importance in public health due to its worldwide distribution and its food transmission route, mainly through poultry products. This bacterium is capable of surviving and growing in diverse environmental niches. This survival is achieved by modulating gene expression in response to specific environmental stress signals, efficiently evading the host's immune system. These virulence characteristics of *Salmonella* focus on control systems based on small non-coding RNAs (sncRNAs), which are key to its pathogenicity. The sncRNAs are less than 500 nucleotides long. They mainly act after transcription on messenger RNA by affecting translation and/or stability of the messenger RNA, increasing or reducing the amount of peptide product generated. Several proteins contribute to the stability and function of bacterial sncRNAs, especially the RNA-binding protein host factor Q (Hfq), which plays an important role in virulence in several bacteria. Some virulence genes are distributed in clusters in specific sectors of the genome, called *Salmonella* pathogenicity islands (SPI). SPI-1 and SPI-2 encode type III secretion systems (T3SS), which transport proteins into host cells, thus regulating the immune response and increasing their pathogenicity. To carry out this process, IsrM, a sncRNA encoded in SPI-1, which is key in bacterial invasion and replication, is required.

Understanding how sncRNAs function is necessary to fully understand the phenotype of these pathogens and their virulence. Therefore, the present review brings together the relevant literature data found on the role of sncRNAs in the pathogenicity of *Salmonella enterica*.

**Palabras claves:** Salmonella, ARNp, ARN pequeños no codificantes, Enterobacteriaceae, Salmonellosis.

**Key words:** Salmonella, RNAs, small RNA non coding, Enterobacteriaceae, Salmonellosis.

## Introducción

Las enfermedades infecciosas son un grupo de enfermedades causadas por microorganismos infecciosos o sus toxinas, que se transmiten de forma directa o indirecta a un huésped susceptible<sup>(1)</sup>. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) las enfermedades infecciosas se encuentran entre las principales causas de muerte en el mundo. Debido a esto, es primordial comprender mejor los procesos que guían la patogénesis y virulencia de los diferentes organismos patógenos<sup>(2)</sup>.

Una de las principales enfermedades infecciosas transmitida por bacterias, es la salmonelosis. Esta es una enfermedad aguda de gran importancia en salud pública debido a su distribución mundial, y a su vía de transmisión alimentaria<sup>(3)</sup>.

En Uruguay, la salmonelosis es una infección que no requiere denuncia obligatoria, por lo que los casos informados se deben a brotes, quedando subestimada su incidencia<sup>(4)</sup>.

Es causada por enterobacterias del género *Salmonella*. Las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* son bacilos Gram negativos, algunos tienen movilidad, no son esporulados y comparten un antígeno en común<sup>(5)</sup>. Las bacterias del género *Salmonella* son bacilos que se comportan como patógenos intracelulares facultativos<sup>(6)</sup>. Se han identificado más de 2.659 serotipos diferentes que taxonómicamente se clasifican en dos especies, *S. bongori* y *S. entérica*<sup>(7)</sup>. Dentro de esta última se identifican más de 1400 serotipos, pero se estima que únicamente 12 serotipos serían responsables de más del 70% de la salmonelosis en humanos<sup>(8)</sup>. La subespecie entérica es la más relevante en seres humanos, motivo por el cual la revisión se centra en ella. Dicha especie se subdivide en subespecies como *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. infantis*, *S. helderberg*, *S. hadar*, entre otras. Siendo los serotipos de mayor virulencia para el humano, *S. typhimurium* y *S. enteritidis*<sup>(7)</sup>.

Entre 2001 y 2007, Enteritidis fue el primer serotipo aislado en infecciones humanas a nivel mundial. En Uruguay, hasta 2004, este serotipo fue el más prevalente, siendo responsable del mayor número de casos de salmonelosis humana, superando todos los demás serotipos<sup>(9)</sup>.

A partir del año 2005, se observó un cambio en el comportamiento epidemiológico, predominando las cepas del serotipo *S. Typhimurium*, sin embargo, se detectaron varios brotes originados por serotipos como *Salmonella* Montevideo<sup>(10)</sup>. Al igual que el resto de las bacterias, *Salmonella* spp. tiene la capacidad de sobrevivir y crecer en diversos nichos ambientales<sup>(11)</sup>. Desde hace mucho tiempo se sabe que para lograr dicha supervivencia modulan la expresión génica en respuesta a señales específicas de estrés ambiental (variaciones de temperatura y

pH, disponibilidad de nutrientes, exposición a antibióticos o especies químicas reactivas) logrando evadir eficientemente el sistema inmunológico del huésped<sup>(2)</sup>.

*Salmonella* spp. presenta características particulares de virulencia y sistemas de control basados en los ARN no codificantes pequeños (ARNncp), siendo éstos clave en su patogenicidad. Los ARNncp se pueden clasificar en 5 categorías: intergénico, sense, antisense, 5'UTR y 3'UTR. Cabe destacar que a estos ARN se les ha llamado ARNnc y ARNp (por las siglas non coding y pequeños debido a que su tamaño es menor de 500 nucleótidos de longitud).

Los avances recientes en las tecnologías de secuenciación han permitido identificar gran cantidad de ARNncp de diferentes patógenos entéricos, dándose mayor importancia a esta nueva clase de reguladores de la expresión génica<sup>(12)</sup>. Entender cómo funcionan los ARNncp es necesario para comprender completamente el fenotipo de estos patógenos y su virulencia.

Motiva la elaboración de esta revisión los recientes avances sobre el rol de ARN no codificantes pequeños, el papel protagónico de estos elementos genéticos en la expresión del fenotipo invasivo de la bacteria, y la falta de revisiones actualizadas.

### **ARN no codificantes pequeños (ARNncp)**

En la última década, el advenimiento de los ARNncp en microorganismos ha revolucionado el mundo de la investigación microbiológica y con el avance de las nuevas metodologías de secuenciación se ha dado mayor importancia a esta nueva clase de reguladores de la expresión génica<sup>(7)</sup>. La primera evidencia de la existencia de los ARNncp bacterianos se publicó en 1967. Luego, se centró en cepas no patógenas de *Escherichia coli*. Pero ahora uno de los mejores modelos para estudiar la regulación mediada por ARNncp es *Salmonella*. El primer ARNncp involucrado en la virulencia de *Salmonella* se publicó en el año 2001 y fue el RprA. Años después se identificó el ARNncp más importante en este microorganismo, el GcvB, que controla la expresión de aproximadamente el 1% del genoma de *S. Typhimurium*. Por lo tanto, esto refleja la importancia biológica de los ARNncp, estableciéndose como reguladores genéticos globales<sup>(13)</sup>.

Dichas moléculas son transcritos estables, abundantes y como características generales, se originan en regiones intergénicas "vacías" de los cromosomas<sup>(14)</sup>. Tienen menos de 500 nucleótidos de longitud aunque la mayoría de los descritos se encuentran entre 100 y 250 nucleótidos. Los ARNncp se pueden clasificar en 5 categorías: intergénico (localizado en cualquiera de las dos hebras, entre dos regiones codificantes para proteína), sense (en regiones

en el mismo sentido que el gen codificante para la proteína), antisense (en la hebra complementaria), 5'UTR y 3'UTR. Principalmente actúan como ARN antisense, hibridando sobre múltiples ARN mensajeros (ARNm) blanco afectando el proceso de traducción y/o la estabilidad de su ARNm, tanto incrementando como reduciendo la cantidad de producto peptídico generado<sup>(12)</sup>.

Los ARNncp desempeñan un papel fundamental en la expresión de genes bacterianos y se reconocen como reguladores postranscripcionales clave en las bacterias. Son inducidos o reprimidos por estímulos específicos durante el estrés ambiental, coordinan el control de factores de virulencia, modulan las funciones metabólicas y las respuestas relacionadas con el estrés, la colonización, toxinas, y procesos de defensa del huésped, así como también la privación de nutrientes.<sup>(15)</sup>

Actúan después de la transcripción, uniéndose a los ARNm blanco, en función de algún grado de complementariedad. En consecuencia, pueden provocar la represión o la activación de sus dianas, aunque el primer caso es el más común<sup>(16)</sup>.

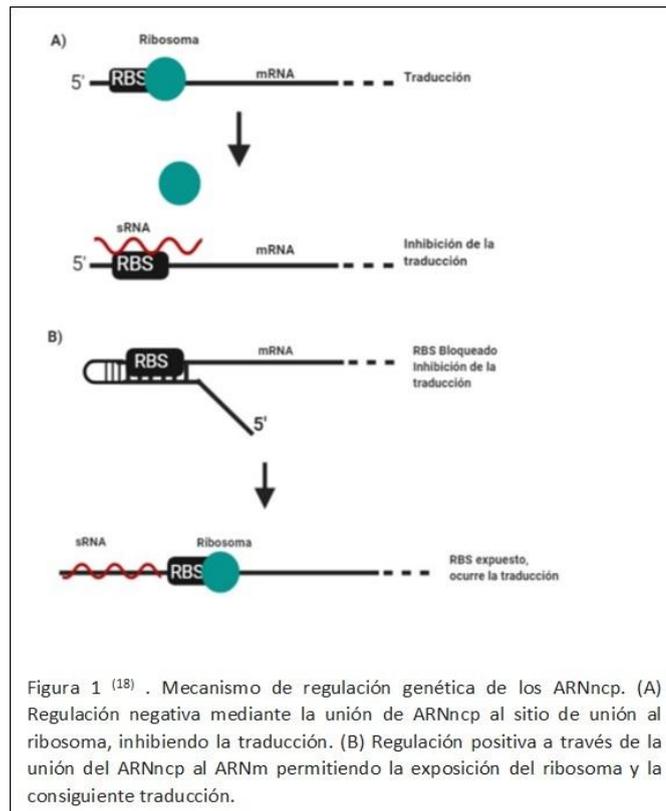
Los ARNncp están ampliamente identificados y su número crece constantemente debido a su participación en diversos contextos y funciones biológicas, incluida la proliferación, la diferenciación, el metabolismo, la respuesta al estrés y la transducción de señales. Controlan la expresión de genes bacterianos mediante el empleo de múltiples estrategias moleculares<sup>(15)</sup>.

Interactúan con su gen diana específico para ejercer efectos tanto positivos como negativos en la expresión génica. (Figura 1). En la regulación positiva, los ARNncp se unen con el ARNm diana en la región no traducida (UTR) del 5' y alteran la estructura secundaria del ARNm permitiendo el acceso al sitio de unión del ribosoma (RBS), lo que permite la traducción. Además, el ARNncp puede unirse a la 3'-UTR del ARNm diana, lo que aumenta la expresión génica y estabiliza la transcripción. En general, los ARNncp se clasifican también según su codificación en *trans*-ARN o *cis*-ARN<sup>(15)</sup>. Los *trans*-reguladores son genes que regulan la expresión de genes distantes y codifican factores de transcripción. Lo realizan mediante la interacción intermolecular entre dos moléculas distintas. En contraposición, los *cis*-reguladores son genes que regulan la transcripción de genes cercanos por medio de la interacción intramolecular entre sectores diferentes de la misma molécula<sup>(17)</sup>.

Los ARNncp codificados en *trans* son los más estudiados hasta ahora en bacterias. Estos actúan por medio del emparejamiento de bases con las transcripciones diana a través de una complementariedad imperfecta y limitada, lo que da como resultado una inestabilidad y una traducción alterada. Debido a esto, se requieren de chaperonas que faciliten y estabilicen esta

unión<sup>(7)</sup>. Presentan efectos negativos o positivos en la expresión génica; cuando la regulación es negativa se impide el acceso al ribosoma y conduce a una mayor susceptibilidad a las ARNasas, debido a que el emparejamiento de ARNncp ocurre sobre la secuencia Shine Dalgarno (SD) o en su cercanía, y/o en el sitio de inicio de la traducción del ARNm.

Por otro lado, los ARNncp codificados en *cis* se caracterizan por una región perfectamente complementaria a la transcripción diana<sup>(2)</sup>.



En la mayoría de los casos, los ARNncp dependen de proteínas chaperonas de ARN que se unen a estructuras secundarias y terciarias de moléculas de ARN. De esta forma inducen cambios estructurales que permiten su función. Varias de estas proteínas contribuyen a la estabilidad y función de los ARNncp bacterianos, sobre todo la proteína de unión al ARN factor huésped Q (Hfq) codificada por muchas especies bacterianas<sup>(2)</sup>.

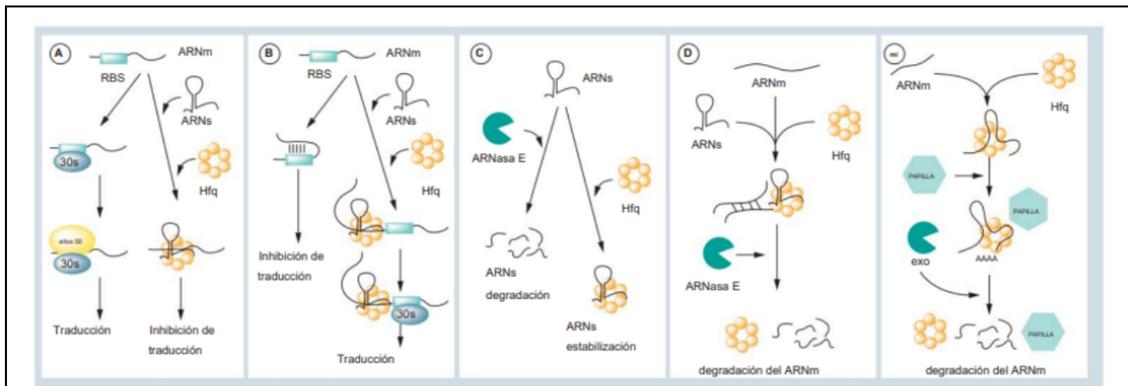


Figura 2<sup>(7)</sup>. Mecanismos en la regulación de ARNm mediada por Hfq. (A) Hfq impide el inicio de la traducción, al ayudar a un ARNnncp a unirse al ribosoma del ARNm en la región 5' y bloquear las subunidades ribosomales 30S y 50S. (B) En la región 5' no traducida, tiene lugar la formación de una estructura secundaria que obstruye la unión y posterior traducción al ribosoma. Hfq hace posible esta unión, a través de un ARNnncp específico que interactúa con la región 5'UTR del ribosoma. (C) Hfq impide la escisión del ARNnncp por ribonucleasas y la degradación exonucleolítica de 3' a 5'. (D) Hfq puede provocar la escisión de los ARNnncp y sus ARNm diana. (E) Hfq puede inducir la adenilación de los extremos 3' del ARNm, generando la escisión.

Hoy en día, la proteína chaperona Hfq es la mejor estudiada en los ARNnncp reconociéndose como el principal componente de la red reguladora postranscripcional en bacterias. Esta proteína presenta diversas funciones como la de facilitar interacciones de apareamiento de bases de los ARNnncp con sus ARNm diana (complejo ARNnncp-ARNm), así como también estabilizarlos<sup>(19)</sup>. También tiene un rol relevante en la formación del ribosoma (biogénesis ribosómica)<sup>(2)</sup>. (Figura 2).

La proteína está compuesta por tres superficies distintas que interactúan con el ARN, reconociendo regiones no estructuradas de ARNnncp y/o ARNm de manera semiespecífica. Presenta una cara proximal la cual tiene afinidad por regiones de ARN monocatenario ricas en Uracilo (U), su cara distal tiene afinidad por regiones ricas en Adenina (A). Mientras que su cara lateral o borde, al presentar carga positiva debido a los residuos de Arginina y/o Lisina, tiene afinidad por los ARN monocatenarios ricas en A/U y media en la hibridación de ARNnncp-ARNm<sup>(2)</sup>.

Como se comentó anteriormente, los ARNnncp codificados in trans dependen de proteínas de unión para promover el emparejamiento de bases de ARNnncp-ARNm, tales como Hfq o ProQ. Esta última fue identificada en *E. coli* en el año 1999, siendo una de las proteínas fundamentales de unión a ARN en *E. coli* y *Salmonella*. Tiene efectos en las redes de regulación de ARNnncp, superponiéndose con las redes reguladoras de ARNnncp Hfq, y en la regulación post transcripcional mediada por ARNnncp<sup>(20)</sup>.

En el caso de ProQ en *Salmonella*, juega un papel central en la regulación de los factores necesarios para la patogenicidad<sup>(2)</sup>. Este mecanismo con proteínas de unión, se encuentra presente en bacterias Gram-negativas, y por el contrario suele estar ausente en bacterias Gram-positivas.

En los últimos años se han realizado diversos estudios con el objetivo de demostrar el rol de Hfq en la regulación de ARNncp en bacterias Gram-positivas, confirmando que los ARNncp dependientes de Hfq son muy bajos, encontrándose únicamente en *Listeria monocytogenes*, el ARN A de unión a Hfq en *Listeria* (LhrA).

El mecanismo regulador que utiliza LhrA se destaca por asemejarse a los ARNncp de unión a Hfq en Gram-negativas. En este caso, LhrA inhibe la traducción de algunos genes a través de la unión de bases en regiones cercanas al ribosoma, con la consiguiente degradación del ARNm. Por otro lado, el rol del Hfq es relevante ya que actúa emparejando al LhrA y sus ARNm diana, y a su vez protege a LhrA de la degradación. Como contrapartida, ya que la mayoría de las bacterias Gram-positivas no codifican Hfq, se sugiere la existencia de otras familias de proteínas de unión a ARN que promuevan la regulación génica. Según recientes investigaciones, se planteó la posibilidad de que la proteína CsrA actúe como chaperona en el apareamiento de bases de ARNncp. Esta proteína es un homodímero de unión a ARN específico, que representa un regulador postranscripcional global, controlando el metabolismo de los carbohidratos, la formación de biopelículas, la motilidad, la detección de quórum, y en algunos casos llegando a inhibir el inicio de la traducción o antagónicamente induciendo la misma<sup>(20)</sup>.

Como se mencionó anteriormente, la identificación de gran cantidad de ARNncp se ha logrado gracias a la tecnología de secuenciación. La genómica se ha visto revolucionada con la incorporación de tecnologías de nueva generación que permiten la secuenciación de genomas extensos en poco tiempo. La incorporación de estas tecnologías en el año 2005, logró un cambio en el paradigma, ya que previamente resultaba más costoso y engorroso este proceso. La secuenciación masiva permite la identificación de todos los genes y proteínas que los organismos puedan expresar. En este punto es donde radica la importancia de las tecnologías de nueva generación (NGS por sus siglas en inglés, Next Generation Sequencing). El método que tuvo mayor relevancia en el área, fue la secuenciación automática de Sanger, la cual fue la primera en secuenciar el genoma bacteriano de *Haemophilus influenzae*, y la primera en realizar la secuenciación completa del genoma humano. A pesar de esto, algunas limitaciones

en esta tecnología generaron la necesidad de desarrollar otros métodos de secuenciación, es por esto que surgen las NGS. La primera NGS en ser utilizada fue entre el año 2004 y 2005, siendo la tecnología 454, conocida como pirosecuenciación. Posteriormente, surge *Illumina* en 2006, *SOLiD* en 2007, e *Ion Torrent* en el año 2010.

La mayor ventaja que presentan las NGS es poder producir gran cantidad de datos de forma económica, con secuenciadores masivos que permiten leer en paralelo millones de segmentos del material genético en una sola corrida del equipo, en comparación con la secuenciación automática Sanger que puede hacerlo con menor cantidad de segmentos y de menor longitud. Esto deriva en una mayor cobertura del genoma. La aplicación inicial de esta tecnología, fue la secuenciación completa de genomas, incluyendo la resecuenciación o secuenciación de novo. Actualmente, las NGS se utilizan en la secuenciación de ARN en diferentes bacterias patógenas, incluyendo *Salmonella* y su relación con la resistencia a antibióticos<sup>(21)</sup>.

La secuenciación de ARN se ha convertido en un método de rutina para el análisis de la expresión génica en patógenos bacterianos. El análisis dual, es decir de la secuenciación del patógeno y el huésped, ha permitido evidenciar las funciones de los ARNncp durante la infección y correlacionar la actividad de los genes bacterianos con las respuestas específicas del huésped. De esta forma, la secuenciación ha permitido comprender mejor la estructura de la transcripción de las bacterias, y contribuir a un mayor conocimiento de las funciones de los ARNncp en la regulación génica, así como también su rol en las interacciones huésped-patógeno. Esto resulta importante para entender cómo, cuándo y por qué la regulación mediada por ARNncp es esencial para los patógenos bacterianos<sup>(22)</sup>.

Los determinantes genéticos influyen en la adaptación a un determinado huésped o la capacidad de causar infecciones invasivas, por lo que es pertinente de un estudio exhaustivo, en los últimos años a través de diferentes metodologías (genómica, transcriptómica y proteómica) y en modelos de ratones “humanizados”, se obtuvieron indicios sobre el rol de la genética bacteriana en la virulencia<sup>(23)</sup>.

Existe una base de datos principal llamada Rfam, donde se pueden encontrar colecciones de familias o información individual de ARNncp dado por estas técnicas de secuenciación, estructuras secundarias de consenso y modelos de covarianza, junto con anotaciones del genoma. Esto es posible porque emplea formas matemáticas y diferentes software, facilitando la búsqueda de ARNncp encontrados hasta el momento<sup>(24)</sup>.

## **Enterobacterias**

La familia *Enterobacteriaceae* está compuesta por bacilos Gram-negativos, pueden ser inmóviles o móviles con flagelos, no forman esporas y comparten un antígeno común enterobacteriano. Desde el punto de vista nutricional, no son exigentes; fermentan la glucosa, reducen nitratos y son catalasa-positivos/oxidasa-negativos.

Su crecimiento puede ser rápido en forma aerobia o anaerobia, en varios medios no selectivos. No presentan actividad del citocromo oxidasa, lo cual hace que se diferencie de otros bacilos por medio de una sencilla prueba, además se utiliza para diferenciar a las enterobacterias de otros bacilos Gram-negativos fermentadores y no fermentadores. La capacidad de fermentar la lactosa se utiliza para distinguir a las cepas fermentadoras de lactosa de las cepas que no la fermentan o lo hacen lentamente. Para esto se toma en cuenta el aspecto de las bacterias en los medios de cultivo, diferenciándose así los miembros más frecuentes de la familia *Enterobacteriaceae*.

Otra característica distintiva entre los patógenos entéricos y los comensales, es la resistencia a las sales biliares, ya que los microorganismos comensales pueden ser neutralizados por estas. También tienen diferentes aspectos, ya sea mucoide debido a la presencia de importantes cápsulas, o recubiertas por un biofilm viscoso difusible o suelto.

El principal antígeno de la pared celular es el lipopolisacárido (LPS) termoestable y se compone del polisacárido O somático más externo, un polisacárido central compartido por todas las enterobacterias y el lípido A. Para clasificar los miembros de las Enterobacterias es importante el polisacárido central, para la clasificación epidemiológica de las cepas dentro de una especie se utiliza el polisacárido O, y como factor de virulencia está el componente lipídico A, responsable de la actividad de la endotoxina.

Para clasificar epidemiológicamente a las enterobacterias se utilizan tres grupos importantes de antígenos, estos son: polisacáridos O somáticos, antígenos K de la cápsula y las proteínas H de los flagelos bacterianos.

La mayoría de las enterobacterias son móviles ya que cuentan con flagelos y a su vez algunas presentan fimbrias o pili. Estas últimas pueden ser fimbrias comunes que se codifican por el cromosoma y le dan la capacidad a la bacteria de adherirse a los receptores específicos de la célula huésped, o pueden ser pili sexuales codificados por plásmidos que facilitan la transferencia genética interbacteriana.

La expresión de estos componentes estructurales, está mediada por redes reguladoras de ARNncp<sup>(5)</sup>.

## **Rol de los ARNs pequeños en la patogenicidad**

### **Generalidades de la patogenicidad bacteriana**

Se puede clasificar la interacción de las bacterias y el huésped en tres grupos, por un lado están los patógenos primarios que tienen el potencial de desarrollar la enfermedad en un huésped inmunocompetente, luego están los patógenos oportunistas que infectan a un huésped inmunocomprometido, y por último se encuentran las bacterias que no suelen causar enfermedad.

Tanto las condiciones inmunológicas como fisiológicas del huésped determinan la susceptibilidad a la infección, así como también la patogenicidad y virulencia por parte de la bacteria<sup>(19)</sup>. Por patogenicidad se entiende como la capacidad de las bacterias en colonizar, consumir nutrientes y evadir la respuesta inmune del huésped. Mientras que la virulencia bacteriana, hace referencia al grado de patogenicidad, la cual dependerá de la cuantía de patógenos en la colonia bacteriana, su vía de entrada y los factores de virulencia<sup>(2)</sup>. Estos últimos son necesarios para invadir al huésped, evadir al sistema inmune y así causar la enfermedad.

Por ejemplo, como se comentó anteriormente, el regulador postranscripcional Hfq tiene un rol importante en la virulencia de varias bacterias<sup>(19)</sup>. Se ha observado que cuando hay una mutación de Hfq estará comprometido el crecimiento bacteriano, por ende la supervivencia en el huésped<sup>(2)</sup>.

En la siguiente sección de esta revisión, se nombrarán cuatro procesos específicos relacionados con la virulencia que implican a la regulación de Hfq y ARNncp:

- **Regulación Hfq-ARNncp en la homeostasis del hierro:**

El hierro es un cofactor indispensable para los organismos vivos, donde algunos ARNncp son importantes mediadores en la homeostasis del mismo. Uno de estos es RyhB, descubierto por primera vez en *E. coli*, evidenciándose posteriormente en otras enterobacterias como *Salmonella*. Este ARNncp depende de Hfq para su actividad, se expresa frente a una disminución de hierro con el objetivo de inhibir la traducción de proteínas que lo contienen para ahorrarlo<sup>(2)</sup>.

- **Regulación del ARN-Hfq en la expresión de proteínas de la membrana externa (OMP) en bacterias entéricas:**

Las bacterias gram negativas presentan en su estructura numerosas proteínas de membrana externa (OMP)<sup>(2)</sup>. Estas son esenciales para el mantenimiento de la integridad de la membrana y la permeabilidad selectiva, ya que juegan un rol importante en el transporte de nutrientes y

solutos, siendo vitales para la supervivencia bacteriana. Las OMP generalmente son reguladas por señales ambientales y desempeñan un papel fundamental en la patogénesis bacteriana al facilitar la capacidad de adaptación de la bacteria a diversos entornos<sup>(18)</sup>. En bacterias patógenas actúan como mediadores en la adhesión, señalización celular y sirven para evadir la respuesta inmune del huésped. Frente a una desestabilización de la membrana, ya sea por una inadecuada biogénesis de las OMP, o por la ausencia de Hfq, se van a generar perturbaciones en la membrana haciendo que se active sigma E ( $\sigma E$ ), que es una proteína reguladora de respuesta al estrés<sup>(2)</sup>.

- **Regulación del ARN-Hfq de la formación de biopelículas:**

Las biopelículas representan un mecanismo importante para la supervivencia bacteriana durante las infecciones crónicas, ya que brindan protección a los patógenos al evadir la respuesta inmune del huésped. Debido en parte a su papel en la composición de la membrana, los ARNncp y Hfq afectan la formación de biopelículas en múltiples patógenos entéricos, incluido *Salmonella*<sup>(2)</sup>.

- **Regulación de Hfq y ARNncp en la detección de quórum:**

También se ha demostrado que los ARNncp dependientes de Hfq regulan la comunicación entre células, a través de la detección de **quórum sensing (QS)**, en muchas especies bacterianas<sup>(2)</sup>. El QS es una herramienta de comunicación de célula a célula que controla diferentes procesos. Se profundizará más adelante sobre el mismo<sup>(7)</sup>.

### **Salmonelosis**

La salmonelosis es una infección bacteriana que provoca una enfermedad aguda, de distribución mundial, transmitida por los alimentos, causada por el género *Salmonella*<sup>(13)</sup>. Siendo ésta la bacteria responsable de la mayoría de los fallecimientos relacionados a toxiinfecciones alimentarias<sup>(25)</sup>. Debido a esto y el gran impacto económico que genera, es de gran importancia en la salud pública. En cuanto al género *Salmonella*, está compuesto por 2.659 serotipos diferentes, pertenece a las bacterias gram negativas, son anaerobias facultativas, con flagelos que le brindan motilidad. Su estilo de vida es cíclico, combinando la colonización en el huésped, con la supervivencia en el exterior, haciéndola fácilmente adaptable a diferentes entornos para poder sobrevivir<sup>(7)</sup>.

La salmonelosis, epidemiológicamente se puede manifestar como casos esporádicos o brotes con cantidad variable de personas afectadas, teniendo una susceptibilidad universal.

Globalmente se estiman más de 90 millones de casos anuales de salmonelosis humana causadas por *Salmonella* no tifoidea, que generan aproximadamente 155.000 muertes<sup>(26)</sup>.

Los alimentos involucrados en los brotes, la gran mayoría corresponden a derivados de huevo como mayonesa y carne de aves.

En cuanto a la vigilancia de *Salmonella* en Uruguay, no es de denuncia obligatoria, salvo cuando hay un brote o sospecha del mismo. En este caso se debe reportar al Departamento de Laboratorios en el Ministerio de Salud Pública (MSP), a fin de que se proceda a realizar los estudios de identificación bacteriana, serotipificación, identificación del alimento involucrado, número de personas expuestas, número de afectados, entre otros<sup>(4)</sup>. En el período de 1998-2011 *Salmonella* es el principal agente causal de toxiinfecciones alimentarias, causando más del 50% de los brotes registrados por el Ministerio de Salud Pública<sup>(27)</sup>.

Al no ser una infección de denuncia obligatoria, lleva a pensar que está subidentificada en nuestro país. Aun así, el MSP recomienda a los diferentes centros de salud que se le envíen los aislamientos de *Salmonella* de donde se encuentren. En Montevideo, se encuentra el centro de *Salmonella* ubicado en el Instituto de Higiene, que junto al Departamento de Laboratorio del MSP, son los receptores de aislamientos clínicos de *Salmonella*. A este centro llegan aislamientos sospechosos de *Salmonella* de diferentes centros de salud, tanto públicos como privados, donde se confirman bioquímicamente y se les determina el serotipo.

Actualmente en Uruguay no se cuenta con datos epidemiológicos actualizados. Aún así, se conocen datos entre los años 2005 y 2013 donde se aislaron un total de 1.480 casos de salmonelosis, siendo este número obtenido únicamente del registro de ambos centros y teniendo en cuenta que no todos los casos son informados<sup>(4)</sup>.

La patogénesis de la Salmonelosis depende del serotipo infectante, del huésped susceptible y de la respuesta inmune generada por éste. Los serotipos se clasifican en, serotipos de "hospedador restringido", estos están exclusivamente adaptados a un determinado hospedero. Los que infectan preferentemente a una especie son denominados "adaptados a hospedero". Por último, los que pueden infectar a varios hospederos, son "ubícuos". *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* corresponden a esta última clasificación. Los serotipos ubícuos son responsables de causar una enfermedad no sistémica, presentándose como una gastroenteritis aguda autolimitada<sup>(28)</sup>. Tiene un período de incubación de 12 a 72 horas, y sus manifestaciones clínicas son fiebre, náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea durante una semana aproximadamente. En cuanto a la gravedad, puede ir desde un leve malestar a una

deshidratación grave. La manifestación sistémica de esta enfermedad, es causada por serotipos restringidos o que logran una adaptación en el huésped. Se asocian a infección sistémica que puede producir focos extra-intestinales, se conoce como fiebre entérica o fiebres tifoidea y paratifoidea. Presentándose con una incubación de entre 3 y 56 días con síntomas de fiebre, cefalea, dolor abdominal, constipación, hemorragias por úlceras y perforación del intestino causando peritonitis<sup>(4)</sup>.

En Uruguay, el Laboratorio de Bromatología de la Intendencia de Montevideo realiza análisis de rutina para detectar *Salmonella* spp. en alimentos. El método utilizado es la técnica molecular de PCR que detecta el material genético de *Salmonella* de forma más rápida que otras técnicas, pero sin informar la viabilidad de la bacteria. Para identificarla viable en la muestra, se emplea el aislamiento bacteriológico<sup>(29)</sup>.

La subespecie *enterica* serovar Typhimurium es un patógeno muy resistente capaz de adaptarse a una variedad de condiciones que se encuentran durante la patogénesis<sup>(16)</sup>. Durante la producción de alimentos, la bacteria logra resistir condiciones adversas como el calor, la desecación, la falta de nutrientes o los biocidas. Debido a esto es que el control de este enteropatógeno continúa siendo un desafío para la industria alimentaria<sup>(7)</sup>.

### **Virulencia**

Los patógenos deben enfrentarse a estos ambientes hostiles, por ello han desarrollado una variedad de estrategias para sobrevivir y replicarse dentro de las células eucariotas, estableciendo mecanismos para manipular la maquinaria de la célula huésped para su propio beneficio<sup>(15)</sup>. Por ejemplo, cuando se ingiere el alimento contaminado por la bacteria, ésta debe enfrentarse a un aumento de la temperatura, seguido al pH ácido del estómago. Luego en el intestino, el microorganismo está sujeto a un aumento de la osmolaridad, una disminución de oxígeno, la bilis alcalina y la competencia con la microbiota intestinal. Al ingresar y proliferar dentro de las células fagocíticas y no fagocíticas, resiste los mecanismos de defensa intracelular, como por ejemplo péptidos antimicrobianos, evita la fusión vacuola-lisosoma, altera el entorno del fagolisosoma y la producción de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno. Por lo tanto, en respuesta a estas condiciones estresantes, debe modular rápidamente su perfil transcripcional<sup>(13)</sup>. Este patógeno posee redes reguladoras complejas que coordinan factores de virulencia con la capacidad de infectar diferentes tipos

celulares. Una parte importante de esa red son los sistemas de control basados en ARN, que permiten a los patógenos ajustar la respuesta utilizando ARNncp<sup>(12)</sup>.

Los genes de virulencia están distribuidos ya sea, dispersos en el núcleo del genoma o en grupos en sectores específicos del genoma, denominadas "islas de patogenicidad" (IP). Estas islas se encuentran generalmente en bacterias patógenas y se adquieren durante la evolución bacteriana mediante transferencia horizontal de genes. Se han identificado en *Salmonella*, numerosos ARNncp que están codificados por genes dentro de las IP<sup>(30)</sup>.

Como se comentó anteriormente en esta revisión, *Salmonella* invade células epiteliales intestinales y en la infección sistémica se replica en los fagocitos. Durante la invasión del huésped actúan los genes de invasión localizados en la Isla de patogenicidad de *Salmonella* 1 (por sus siglas en inglés SPI-1), mientras que la proliferación intracelular está dada por la acción de la SPI-2, que contiene los genes necesarios para la supervivencia y replicación intracelular.

Los sistemas de secreción de tipo III (T3SS), son codificados por SPI-1 y SPI-2, y se especializan en transportar proteínas efectoras al citosol de las células huésped. La estructura del T3SS es similar a una jeringa que atraviesa la membrana interna y externa de la envoltura bacteriana, llegando a penetrar las membranas de la célula huésped, permitiendo inyectar proteínas bacterianas en el citoplasma<sup>(31)</sup>. A través de este sistema, *Salmonella* puede regular la respuesta inmunitaria en la célula huésped, aumentando su patogenicidad, mediante diferentes mecanismos como por ejemplo: citotoxicidad, remodelación e interferencia en el citoesqueleto, alteración de la permeabilidad de la membrana, distorsión en el tráfico celular, logrando afectar el sistema inmune. Además, este sistema juega un rol importante en la supresión de la producción de citoquinas inflamatorias al momento de la fagocitosis, que ayuda a la supervivencia del patógeno y a la replicación de estos en los macrófagos en las etapas finales de la infección<sup>(19)</sup>.

Para realizar este proceso, es necesario IsrM, un ARNncp codificado en SPI-1 compuesto por 329 nucleótidos de longitud. Su importancia en *Salmonella* radica en la invasión de células epiteliales, la replicación intracelular en los macrófagos y aumenta su virulencia, expresándose en condiciones similares a las de una infección en el íleon, por el pH bajo. Una de sus funciones es inhibir la traducción de HlE que regula negativamente a la SPI-1, codificado por el núcleo del genoma; esto se da cuando se une a la región Shine-Dalgarno para transcribirse. Por otro lado, hay otros reguladores transcripcionales que son positivos como HlD e HlA, este último es activador central de SPI-1. IsrM va a disminuir la expresión de HlE, lo que va a generar un aumento de la transcripción de los reguladores HlD e HlA, y al ser estos reguladores positivos

aumentan la expresión de SPI-1. Resultando en un aumento de la virulencia y la invasión bacteriana a las células epiteliales. Otro blanco de IsrM es SopA, una ubiquitina ligasa E3, expresada en condiciones inductoras de SPI-1 y en las últimas etapas de la infección. Se puede decir que SopA tiene varias funciones, actuando en la invasión bacteriana y en los pasos posteriores para la patogenicidad. Interacciona en la estimulación de la inflamación intestinal y en la respuesta inmune innata del huésped ya que se dirige a dos ligasas de ubiquitina E3. Este proceso va a facilitar la colonización e invasión intestinal, sin embargo, pone en peligro la supervivencia intracelular al desencadenar la respuesta inmunitaria. Debido a esto, la activación de SopA tiene que ser en momentos precisos, para eso se encuentra el regulador global, IsrM. En caso de que se presente un defecto en IsrM, no se dará la invasión bacteriana de forma efectiva, ni la supervivencia de la bacteria en los macrófagos<sup>(30)</sup>.

Otro mecanismo de patogenicidad que interviene en la adhesión a las células epiteliales de las criptas, es el operon Pef de *Salmonella*. Este codifica las fimbrias Pef, participa en la inducción de respuestas proinflamatorias y en la formación de biopelículas. En este operón están las codificaciones para la subunidad de las fimbrias PefA, la proteína PefC que se necesita para el ensamble de las fimbrias y PefD para la chaperona peri citoplasmática para PefA. PefB es el encargado de comandar la transcripción de este operón. Recientemente se ha caracterizado como en la región 5'UTR que codifica para la fimbria tipo 1 en *Salmonella*, coopera con 2 ARNncp, CsrB y CsrC. que actúan "secuestrando" a la proteína CsrA inhibiendo su expresión. La misma es necesaria para estabilizar el ARNm, sin embargo se vio que in vivo, este proceso es dependiente de las condiciones del medio. A su vez, también en *S. Typhimurium* es conocido que la nucleoproteína H-NS reprime la transcripción de genes en enterobacterias, se demostró que suprime de manera considerable a PefB, encargado de conducir la transcripción del operón, lo que genera una disminución de la adhesión y por tanto, la patogenicidad<sup>(32)</sup>.

Es poco conocido el papel de los ARNncp en la regulación del quorum sensing (QS) de *Salmonella*, como se comentó anteriormente, es un mecanismo importante de comunicación de las bacterias, entre su propia especie, y otras, así como también con el huésped. Esto se da mediante autoinductores (moléculas difusibles) para que actúen en conjunto. Así, las bacterias van a generar estrategias específicas a partir de la detección de modificaciones en el entorno, con el fin de adaptarse al estrés ambiental en un momento dado<sup>(7)</sup>.

La detección del quórum es utilizada por las bacterias para diferentes propósitos: mejorar el acceso a nutrientes o a nichos ambientales, mejorar las respuestas defensivas contra el huésped y contra microorganismos competidores, en la bioluminiscencia, en la diferenciación

celular para desarrollar biopelículas y esporulación, así como en la supervivencia en entornos de crecimiento restrictivo<sup>(7)</sup>.

Durante el crecimiento bacteriano, se secretan los autoinductores, estas son moléculas de detección del quórum, las cuales se acumulan en el medio. La acumulación puede traducir una alta densidad de población bacteriana o una población de baja densidad pero que estuvo por mucho tiempo liberando dichas moléculas. Cuando la concentración de moléculas de detección del quórum supera el nivel umbral, son detectadas por factores de transcripción que desencadenan alteraciones en la expresión génica de las células receptoras. Para la comunicación de célula a célula existen diferentes compuestos de señalización como: el autoinductor 1 (AI-1), son derivados de ácidos grasos N-acil homoserina lactonas, estos son producidos y empleados por las Bacterias Gram negativas, para comunicarse entre especies. Luego se encuentra el autoinductor 2 (AI-2) que son diésteres de borato de furanosilo, en este caso son producidas por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, sirviendo como señales universales en la comunicación entre especies e intraespecies. Por último, el autoinductor 3 (AI-3), se encarga de la comunicación cruzada con sistemas de señalización de epinefrina en células huésped<sup>(7)</sup>.

### **Conclusión**

Dado que la salmonelosis es una toxiinfección alimentaria aguda de gran importancia en salud pública debido a la morbilidad y los altos costos económicos en salud y en la industria alimentaria que conlleva, es de relevancia entender sus mecanismos de patogenicidad a fin de controlar el crecimiento bacteriano y sus brotes epidémicos. Los avances en genómica han evidenciado el rol que tienen en *Salmonella* las distintas redes de regulación basadas en ARNncp que son clave en la patogenicidad y virulencia. Por ende uno de los grandes desafíos de la microbiología es continuar descifrando estas redes y sus funciones. La regulación que ejercen los ARNncp puede ser positiva, al estimular la traducción o negativa al unirse al sitio de unión del ribosoma e inhibir la traducción de proteínas. Los ARNncp que se clasifican como ARN-trans, están involucrados en la transcripción a través de una interacción intermolecular teniendo una complementariedad imperfecta y limitada, resultando en una inestabilidad y traducción alterada. Es por esto que se destaca la importante función que tienen las proteínas Hfq, considerándose el principal elemento en la regulación postranscripcional bacteriana, facilitando la formación del complejo ARNncp-ARNm, estabilizando su unión y la consiguiente expresión de genes de las islas de patogenicidad en *Salmonella*. Los ARN de la SPI-1 actúan en

la invasión y los de la SPI-2 durante la proliferación bacteriana, siendo responsables de la supervivencia y virulencia de las bacterias. Si bien se ha avanzado considerablemente en los conocimientos de ésta área, los autores de este trabajo consideran relevante que se formulen nuevas hipótesis en la comunidad científica en pos del interés médico.

### **Agradecimientos**

Se agradece al Departamento de Desarrollo Biotecnológico por ser el promotor de esta monografía, en especial al orientador, Prof. Agdo. Dr. Andrés Iriarte. Los autores de este trabajo deben realizar una mención especial al Prof. Adj. Dr. German Traglia, ya que sus aportes han sido de gran importancia para este trabajo.

## Referencias bibliográficas

1. MeSH Browser [Internet]. [citado 2022 jul 1]. Available from: <https://meshb.nlm.nih.gov/record/ui?ui=D003141>
2. Djapgne L, Oglesby AG. Impacts of Small RNAs and Their Chaperones on Bacterial Pathogenicity. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 jul 12;11:561.
3. Katsuya-Gaviria K, Paris G, Dendooven T, Bandyra KJ. Bacterial RNA chaperones and chaperone-like riboregulators: behind the scenes of RNA-mediated regulation of cellular metabolism. <https://doi.org/10.1080/1547628620222048565> [Internet]. 2022 [citado 2022 May 25];19(1):419-36. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=krgb20>
4. Berriolo S, Desiderio M, Rodríguez M. Infecciones Invasivas por Salmonella No Tifoidea en el mundo y su situación en Uruguay. 2014 [citado 2022 set 25]; Available from: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/32716>
5. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 27 Enteriobacteriaceae. In: *Microbiología Médica*. 7ma ed. Barcelona: Elsevier; 2014. p. 258-60.
6. Salmonella - MeSH - NCBI [Internet]. [cited 2022 jul 16]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68012475>
7. Sholpan A, Lamas A, Cepeda A, Franco CM. Salmonella spp. quorum sensing: an overview from environmental persistence to host cell invasion. *AIMS Microbiol* [Internet]. 2021 [citado 2022 jun 30];7(2):238-56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34250377/>
8. Anjum MF, Marooney C, Fookes M, Baker S, Dougan G, Ivens A, et al. Identification of Core and Variable Components of the Salmonella enterica Subspecies I Genome by Microarray †. *Infect Immun* [Internet]. 2005 [citado 2022 jun 9];73(12):7894-905. Available from: <http://iai.asm.org/.7894>
9. Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, et al. The global burden of nontyphoidal salmonella gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2010 mar 15 [citado 2022 jun 18];50(6):882-9. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/50/6/882/419872>
10. Brote multiestatal de infecciones por Salmonella Montevideo asociado a germinados crudos | Salmonella | CDC [Internet]. [citado 2022 ago 31]. Available from: [https://www.cdc.gov/salmonella/montevideo-01-18/index\\_esp.html](https://www.cdc.gov/salmonella/montevideo-01-18/index_esp.html)

11. Antoine L, Bahena-Ceron R, Devi Bunwaree H, Gobry M, Loegler V, Romby P, et al. RNA Modifications in Pathogenic Bacteria: Impact on Host Adaptation and Virulence. *Genes* 2021, Vol 12, Page 1125 [Internet]. 2021 jul 24 [citado 2022 ago 1];12(8):1125. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4425/12/8/1125/htm>
12. Heroven AK, Nuss AM, Dersch P. RNA-based mechanisms of virulence control in Enterobacteriaceae. 2017 [cited 2022 jun 8]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/15476286.2016.1201617>
13. Djapgne L, Oglesby AG. Impacts of Small RNAs and Their Chaperones on Bacterial Pathogenicity. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 jul 12;11:561.
14. Barnhill EC, Crucello A, Houserova D, King VM, Amin S v., Roberts JT, et al. Characterization of novel small RNAs (sRNAs) contributing to the desiccation response of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. <https://doi.org/10.1080/1547628620191653680> [Internet]. 2019 nov 2 [citado 2022 set 15];16(11):1643-57. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15476286.2019.1653680>
15. Morrot A, Filardy A, Hsiao A, Liu ZF, Z-f L, Ahmed W, et al. Small Non-Coding RNAs: New insights in Modulation of Host immune Response by intracellular Bacterial Pathogens. 2016 [cited 2022 May 25];7. Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
16. Ryan D, Mukherjee M, Suar M. The expanding targetome of small RNAs in *Salmonella* Typhimurium. *Biochimie*. 2017 Jun 1;137:69–77.
17. Jung I, Schmitt A, Diao Y, Lee AJ, Liu T, Yang D, et al. A compendium of promoter-centered long-range chromatin interactions in the human genome. *Nature Genetics* 2019 51:10 [Internet]. 2019 sep 9 [citado 2022 jul 29];51(10):1442-9. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41588-019-0494-8>
18. Montt Cartes F. Detección de la expresión de RNAs no codificantes de *Salmonella* Typhimurium en líneas celulares, utilizando como herramienta el sistema CRISPR/Cas13a. 2021 [citado 2022 nov 13]; Available from: <https://repositorio.unab.cl/xmlui/handle/ria/19488>
19. Feliciano JR, Grilo AM, Guerreiro SI, Sousa SA, Leitão JH. Hfq: a multifaceted RNA chaperone involved in virulence. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.15.128> [Internet]. 2015 dic 18 [citado 2022 jul 27];11(1):137-51. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.15.128>

20. Jørgensen MG, Pettersen JS, Kallipolitis BH. sRNA-mediated control in bacteria: An increasing diversity of regulatory mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2020 may 1;1863(5):194504.
21. Secuenciación y ensamblaje de novo de genomas bacterianos: una alternativa para el estudio de nuevos patógenos [Internet]. [citado 2022 oct 9]. Available from: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-570X2015000200008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2015000200008)
22. Saliba AE, C Santos S, Vogel J. New RNA-seq approaches for the study of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol*. 2017 feb 1;35:78-87.
23. Pullinger GD, Dziva F, Charleston B, Wallis TS, Stevens MP. Identification of *Salmonella enterica* Serovar Dublin-Specific Sequences by Subtractive Hybridization and Analysis of Their Role in Intestinal Colonization and Systemic Translocation in Cattle. *Infect Immun* [Internet]. 2008 nov [citado 2022 ago 19];76(11):5310. Available from: </pmc/articles/PMC2573319/>
24. About Rfam — Rfam Help documentation [Internet]. [citado 2022 ago 13]. Available from: <https://docs.rfam.org/en/latest/about-rfam.html>
25. Ternhag A, Törner A, Ekdahl K, Giesecke J. *Salmonella*-associated Deaths, Sweden, 1997–2003. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2006 [citado 2022 jul 13];12(2):337. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3373115/>
26. Adak GK, Long SM, O’Brien SJ. Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. *Gut* [Internet]. 2002 dic 1 [citado 2022 jul 13];51(6):832-41. Available from: <https://gut.bmj.com/content/51/6/832>
27. Anjum MF, Marooney C, Fookes M, Baker S, Dougan G, Ivens A, et al. Identification of Core and Variable Components of the *Salmonella enterica* Subspecies I Genome by Microarray †. *Infect Immun* [Internet]. 2005 [citado 2022 jun 7];73(12):7894-905. Available from: <http://iai.asm.org/.7894>
28. Uzzau S, Brown DJ, Wallis T, Rubino S, Leori G, Bernard S, et al. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol Infect* [Internet]. 2000 [citado 2022 jul 13];125(2):229-55. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/epidemiology-and-infection/article/host-adapted-serotypes-of-salmonella-enterica/CEE8B1A4E77CDD2D5A9F433084EFF837>
29. Salud D. Intendencia de Montevideo Desarrollo Social. [citado 2022 oct 15]; Available from: <http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmuno2/ca074.htm>

30. Zhao X, Zhang Y, Huang X. Pathogenicity-island-encoded regulatory RNAs regulate bacterial virulence and pathogenesis. *Microb Pathog*. 2018 dic 1;125:196-204.
31. Gong H, Vu GP, Bai Y, Chan E, Wu R, Yang E, et al. A Salmonella Small Non-Coding RNA Facilitates Bacterial Invasion and Intracellular Replication by Modulating the Expression of Virulence Factors. *PLoS Pathog* [Internet]. 2011 sep [citado 2022 ago 5];7(9):e1002120. Available from: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002120>
32. Hurtado-Escobar GA, Grépinet O, Raymond P, Abed N, Velge P, Virlogeux-Payant I. H-NS is the major repressor of Salmonella Typhimurium Pef fimbriae expression. *Virulence* [Internet]. 2019 ene 1 [citado 2022 set 13];10(1):849-67. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/21505594.2019.1682752>