

PROFESORES AL DÍA

PRINCIPALES FACTORES BACTERIANOS QUE PROMUEVEN LA COLONIZACIÓN E INVASIÓN DE LOS TEJIDOS HUMANOS

Raúl Garza Velasco¹, Jéssica Ávalos González¹, Sara M. Ugalde Matehuala¹ y Marisol López López²

¹Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM.

²Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-Xochimilco.

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de fórmulas eficaces para combatir las enfermedades infecciosas ha conducido al establecimiento de dos clases de medidas preventivas: las de índole higiénico/sanitario y las que se refieren al diseño de vacunas.

En cuanto a las primeras, éstas permiten disminuir la frecuencia de diversos padecimientos y agrupan acciones conjuntas, tales como la de cocer adecuadamente los alimentos, hervir el agua y la leche antes de ingerirlas, lavarse las manos después de ir al baño y antes de comer o de preparar alimentos, emplear preservativos durante el acto sexual, evitar el hacinamiento, no acudir a lugares cerrados muy congregados, mantener limpios los sistemas de abastecimiento acuífero, etc.

Sin embargo, dependiendo de la situación socio-económica de la población, las medidas anteriores suelen ser insuficientes, impracticables y hasta desconocidas; por tal motivo, el desarrollo de vacunas eficaces de fácil aplicación continúa representando una meta prioritaria en el campo de la salud pública.

Cabe recordar que si bien las vacunas empezaron a aparecer desde la primera mitad del siglo XX, la carencia del sustento científico necesario para su diseño, motivó que las aportaciones de la gran mayoría de ellas¹ resultaran nulas o muy limitadas; de hecho, la única que alcanzó la efectividad deseada fue la ampliamente conocida como “triple” (ya que protege a la población contra el tétanos, la tosferina y la difteria).

Es decir que, realmente, en esa época sólo se conocían los fundamentos primarios -aún vigentes- de la producción vacunal; tales bases se resumen en las siguientes aseveraciones (Griffiths, 1991):

¹ Incluidas las elaboradas contra neumonía, meningitis, cólera, fiebre tifoidea, diarrea infantil, gonorrea, sífilis y sepsis bacteriana

- Por lo general, cuando un agente infeccioso se establece por vez primera en el organismo del hospedador, transcurren hasta 2 semanas para que los anticuerpos dirigidos en su contra alcancen concentraciones protectoras.
- En contraste, un segundo contacto con el mismo agresor llega a generar respuestas inmunológicas considerables en tan sólo 1 ó 2 días.
- Por lo tanto, el papel concreto de una vacuna, es el de sustituir la primera exposición.

Evidentemente, en los años recientes se han logrado definir los requerimientos mínimos para que las vacunas cumplan estrictamente su finalidad en los seres humanos: deben inducir una respuesta inmune basta y específica, ser accesibles desde el punto de vista económico, administrarse, almacenarse y trasladarse con cierta facilidad, así como resultar muy seguras, en el sentido de no originar efectos tóxicos ni signos de las enfermedades contra las cuales se desea conferir protección.

Ante tal panorama, el estudio de los factores bacterianos de virulencia ha adquirido una importancia capital. Por citar 3 ejemplos (Deitsch, 1997; Griffiths, 1991; Keisari, 1997):

- El descubrimiento de que la adherencia representa uno de los pasos determinantes en el proceso infeccioso ha conducido a investigar si las adhesinas de los agentes causales pueden significarse como eficaces componentes vacunales; en consecuencia, tales organelos -purificados- están siendo probados como inmunógenos para prevenir el cólera y la tosferina.
- El hallazgo de que la cápsula bacteriana posee propiedades antifagocitarias ha estimulado la preparación de vacunas experimentales, integradas por polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* (agente etiológico de la neumonía neumocócica) y de *Haemophilus influenzae* (principal causante de la meningitis infantil), para tratar de establecer si los anticuerpos inducidos facilitan la erradicación de dichos microorganismos capsulados por parte de los macrófagos y neutrófilos.
- Las observaciones de que algunas especies tales como *Neisseria gonorrhoeae* pueden modificar rápidamente sus antígenos de superficie, ha prevenido a los diseñadores de vacunas sobre la necesidad de elegir correctamente los inmunógenos bacterianos; la desafortunada selección de algún componente microbiano que sufriera variaciones *in vivo*, dejaría sin utilidad a los anticuerpos inducidos por la estructura original.

En resumen, el conocimiento de las estrategias implicadas en la patogenicidad bacteriana resulta indispensable para definir con fundamento las acciones y los mecanismos asociados al combate de numerosos padecimientos ocasionados por microorganismos. El presente trabajo describe algunos de los principales factores de virulencia que promueven la invasión y/o colonización bacterianas de los tejidos humanos.

PRINCIPALES FACTORES ASOCIADOS A LA INVASIVIDAD Y COLONIZACIÓN BACTERIANAS

De acuerdo con numerosos autores, las dos propiedades que confieren patogenicidad a las bacterias son la toxigenicidad y la invasividad; en cuanto a la primera de ellas, aquélla se define como la capacidad para producir toxinas² y, por su parte, la invasividad se refiere a la facultad para penetrar, establecerse, reproducirse y diseminarse en los tejidos del hospedador (Heithoff; 1997; Quinn; 1997; Smith, 1998).

Cabe aclarar que el término invasividad también es utilizado específicamente en alusión a la capacidad de ciertas bacterias para reproducirse intracelularmente y desplazarse del citoplasma de una célula al de las otras. Para quienes sólo aceptan lo anterior, el crecimiento de microorganismos virulentos sobre/fuera de las células del hospedador requiere de otras denominaciones, tales como la de colonización -aunque ésta no permite descartar al proceso benéfico que supone el establecimiento de la flora habitual en los tejidos del hospedador-, o bien, la de invasión extracelular (Todar, 1998).

En todo caso, es indudable que numerosas bacterias patógenas que sólo se reproducen extracelularmente también invaden los tejidos y, como ocurre en el caso de las intracelulares, producen factores de virulencia que les permiten adherirse a las células y tejidos implicados, reproducirse en su tejido “blanco” y neutralizar los mecanismos de defensa del hospedador (Heithoff; 1997; Quinn; 1997; Smith, 1998).

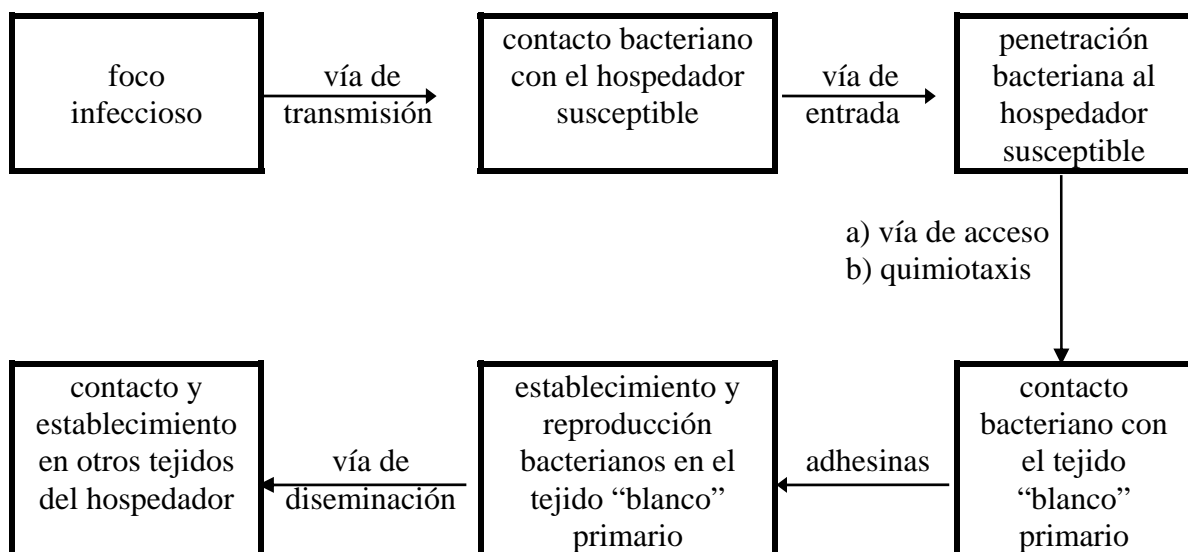
Así las cosas, tanto los invasores extracelulares como los intracelulares comparten las propiedades y mecanismos que se describen a continuación, exceptuando a los relacionados con la residencia intracelular.

i. Adhesinas

De acuerdo con el diagrama 1, una vez que una bacteria contacta con su tejido “blanco”, intentará adherirse a la superficie de las células implicadas; la eventual concreción de tal objetivo resulta particularmente importante en regiones anatómicas tales como la boca, el intestino delgado y el tracto urinario, ya que las mucosas implicadas son “lavadas” por diversos fluidos que arrastran con cierta facilidad a los microorganismos “libres”. Sin embargo, aún en zonas relativamente estancadas, tales como el colon y el tracto vaginal, el movimiento Browniano puede separar de la superficie tisular a las bacterias que no logran fijarse con firmeza a las células del hospedador. A este respecto, es oportuno tomar en cuenta que la mayoría de los patógenos se puede unir de manera más o menos estable a los tejidos humanos (Dalton, 1998; Heithoff; 1997; Quinn; 1997; Smith, 1998, Todar, 1998).

² La toxigenicidad bacteriana es responsable de diversos padecimientos y, excepto en el caso de las intoxicaciones -cuyo origen tiene que ver con el hecho de que los microorganismos liberan sus toxinas en los alimentos u otros ingeribles-, depende de que el agente toxigénico se adhiera previamente a los tejidos del individuo afectado; dada su gran extensión, las temáticas asociadas a la toxigenicidad no se abordan en el presente trabajo.

Diagrama 1. El proceso infectivo (Finlay, 1997; Lipsitch, 1997).



***Pili* o fimbrias**

El mecanismo más conocido de adherencia bacteriana involucra la formación de enlaces mediados por proteínas fibrilares denominadas *pili* o fimbrias, indistintamente; un *pilus* se constituye básicamente por una secuencia ordenada de subunidades proteicas de pilina que forman una estructura cilíndrica.

Los *pili* son largos, flexibles y se extienden hacia el exterior de la superficie bacteriana para interactuar con la célula hospedadora; aunque frecuentemente se encuentran distribuidos en todo el perímetro microbiano, algunas especies sólo los presentan en una o más zonas específicas (Dalton, 1998; Hacker, 1997).

La punta de los *pili* median la adherencia bacteriana uniéndose a ciertas moléculas ubicadas sobre la superficie de las células de los tejidos; por lo general, estos receptores de las adhesinas fimbriales corresponden a carbohidratos, glicoproteínas o glicolípidos, cuya función primaria consiste en mantener unidas a las células de los tejidos, aunque también se acepta que funcionan como receptores hormonales y/o que representan señales asociadas a los mecanismos de transducción de dichas células.

La unión de los *pili* a su célula "blanco" es tan específica, que los receptores presentes en los tejidos del hospedador determinan el tipo de bacterias que colonizan la zona implicada. En algunos casos, la unión "específica" entre el carbohidrato superficial de la

célula hospedadora y el extremo distal del *pilus* depende de otras proteínas localizadas precisamente en la punta de la fibrilla; no obstante, numerosas reacciones de adhesión se basan en la participación directa de la pilina (Deitsch, 1997; Finlay, 1997; Hacker, 1997).

La secreción, el ensamble y el anclaje de cada *pilus* bacteriano representa un proceso complejo que requiere de la presencia de numerosas proteínas auxiliares. En el primero de los tres pasos mencionados, ocurre la secreción de pilina y de otras moléculas proteicas, a través de la membrana interna y en dirección hacia el espacio periplásmico; lógicamente, la secreción de las proteínas fimbriales requiere del transporte activo de dichas moléculas, desde el citoplasma (a través de las membranas externa e interna) hasta la superficie celular o el medio extracelular (Hacker, 1997; Henderson, 1998).

Cabe señalar que, a la fecha, sólo se han detectado cuatro sistemas de secreción proteica en las bacterias Gram negativas, conocidos como I, II, III y IV, todos los cuales emplean energía proveniente de la hidrólisis del ATP. A continuación se describen brevemente las principales características de cada uno (Dalton, 1998; Henderson, 1998; Meccas, 1996).

Sistema de secreción tipo I. Éste se considera “sec-independiente”, ya que no requiere de la eliminación de la “secuencia señal” (la región amino-terminal) de la proteína a secretarse, ni involucra intermediarios periplásmicos; es decir, la secreción tiene lugar mediante un proceso continuo, en el que participan tres proteínas accesorias que forman el canal transmembranal por donde atraviesa el producto; las citadas proteínas accesorias incluyen a tres ATPasas: una de membrana interna, otra de membrana externa y la de fusión membranar (cuyo radio de acción abarca desde la membrana interna hasta el espacio periplásmico).

Sistema de secreción tipo II. Se clasifica como “sec-dependiente”, ya que le es indispensable la presencia de una “secuencia señal” amino-terminal corta (conformada por aproximadamente 30 aminoácidos) en la proteína a secretarse; tal secuencia es eliminada de la molécula cuando ésta llega al periplasma -antes de cruzar la membrana externa- y el proceso global también incluye la participación de proteínas accesorias que originan canales por donde el producto puede desplazarse.

Sistema de secreción tipo III. Corresponde a un sistema “sec-independiente” especializado en la exportación de factores de virulencia hacia las células hospedadoras y, generalmente, se dispara hasta que el patógeno entra en contacto con su tejido “blanco”.

La fase de crecimiento y diversas condiciones fisicoquímicas resultan determinantes en el proceso, y las moléculas a secretarse suelen provocar alteraciones en el funcionamiento de las células hospedadoras, facilitando la sobrevivencia y el crecimiento del invasor.

Se constituye por aproximadamente veinte proteínas situadas en las membranas externa e interna, aunque otras moléculas proteicas conocidas como “carabineras” o “chaperonas” también desempeñan papeles críticos: se unen al producto en el citoplasma, a fin de estabilizarlo, de evitar su plegamiento y de impedir su asociación a otras proteínas.

Los genes que codifican para la síntesis de las proteínas que promueven la exportación se localizan en el cromosoma bacteriano e indirectamente le confieren al microorganismo una gran variedad de propiedades, entre las cuales de cuentan la capacidad para adherirse, adquirir hierro y penetrar en las células hospedadoras.

Sistema de secreción tipo IV. Tal como ocurre en el tipo II, este sistema también es “sec-dependiente”; sin embargo, difiere de aquél en cuanto a que el transporte hacia la membrana externa no requiere de proteínas accesorias, ya que el mismo producto a secretarse genera poros en las membranas por las debe cruzar para ser liberado al medio ambiente; por tal motivo, al proceso se le considera como “de autotransporte”.

Secreción proteica en las bacterias Gram positivas. En este grupo de microorganismos, la secreción de proteínas es aparentemente menos compleja; de hecho, una “secuencia señal” parece ser suficiente, aunque las moléculas encargadas de anclarse deben presentar diversas secuencias repetidas y, a continuación, un grupo carboxi-terminal, un hexapéptido, una extensión hidrofóbica de aproximadamente veinte aminoácidos y una “cola” cargada positivamente (Dunny, 1997).

Ensamble fimbrial. Tal como se mencionó con anterioridad, una vez que se han elaborado las proteínas fimbriales, éstas son protegidas por las “carabineras” o “chaperonas”, las cuales además las transportan hacia la membrana externa. En este sitio, la proteína “C” regula el ensamble: la porción adherente es desplazada hacia el exterior y las subunidades de pilina se van incorporando a su otro extremo (el interior), empujando a la punta adherente hasta que la fibrilla adquiere la longitud adecuada; finalmente, otra proteína periplásmica señala el final del proceso y, al parecer, origina el anclaje del extremo posterior a la pared celular (Heithoff, 1997; Henderson, 1998).

La producción de fimbrias es continua y permanente, no sólo para sustituir las fibrillas que se van perdiendo durante el desplazamiento de la bacteria o después de que ha sucedido la adherencia sino, adicionalmente, para evadir la acción neutralizante de los anticuerpos anti-*pili*; en este último sentido, se ha comprobado que varias especies son capaces de elaborar subsecuentemente otras clases de fimbrias, químicamente diferentes a las originales (fenómeno conocido como “variación antigénica”), para provocar la obsolescencia de los anticuerpos “bloqueadores” inducidos por las que hayan sintetizado con anterioridad (Deitsch, 1997).

Es importante subrayar que algunos autores proponen que el verdadero papel de las adhesinas podría ser el de estabilizar el contacto bacteriano con sus células “blanco”, en tanto se forman enlaces más estables entre otras sustancias de superficie de uno y el otro protagonistas (Edwards, 1998; Lipsitch, 1997).

Los Pili P como modelos fimbriales. Algunos patógenos llegan a elaborar más de una docena de adhesinas diferentes, tomando en cuenta a las producidas por la misma clona en diferentes lapsos y a las elaboradas por diversas cepas de una misma especie; sin embargo, un considerable número de tales estructuras presenta propiedades comunes (Edwards, 1998, Lee, 1996).

Una de las características compartidas por los diferentes tipos de *pili* reside en la maquinaria molecular que se encarga de la biogénesis, el ensamble y el anclaje de cada *pilus* sobre la superficie bacteriana. A este respecto, los análisis de la denominada familia de *pili* P (*pili* asociados a pielonefritis), presente en cepas de *Escherichia coli* -y en muchos otros géneros Gram negativos-, han conducido hacia el mayor entendimiento de los procesos implicados.

En este sentido, el operón³ *pap* controla la elaboración de los *pili* P, codificando para la síntesis de las proteínas Pap, cuyas funciones son las siguientes (Edwards, 1998, Lee, 1996):

- Pap D funge como la chaperona encargada de transportar diversas subunidades del *pilus*, desde la membrana citoplásmica hasta la membrana externa de la bacteria.
- Pap C recibe las moléculas trasladadas por Pap D y las acomoda en la membrana externa.
- Pap A, la subunidad más grande del *pilus*, es anclada a la membrana externa por Pap H.
- Pap E y la porción que funge como adhesina: Pap G, forman parte de la punta del filamento fimbrial.
- Pap F y Pap K se encuentran involucradas en la síntesis de la punta de la fibra.

Si bien los diferentes *pili* bacterianos cuentan con receptores distintos en sus respectivos tejidos “blanco”, varios aspectos del operón *pap* aplican para numerosos sistemas fimbriales, e inclusive, las proteínas implicadas llegan a ser intercambiables. Por ejemplo, una gran familia de por lo menos trece chaperonas periplásmicas muy similares a Pap D median el ensamble de los *pili* K88, K99 y el producido por *Haemophilus influenzae*, entre muchos otros.

Adhesinas no fimbriales

Algunas bacterias poseen proteínas superficiales cuya estructura y proceso de ensamble difieren de los observados en los *pili*, aunque también funcionan eficazmente como determinantes de adherencia; dichas sustancias reciben genéricamente el nombre de “adhesinas no fimbriales” y su participación suele ser independiente de la ausencia o presencia de *pili*, si bien en algunas cepas podría suceder a la de estos; además, buena parte de ellas reconocen como sus receptores a ciertas proteínas superficiales en los “tejidos blanco”, en lugar de unirse a carbohidratos (Edwards, 1998; Hacker, 1997).

Dado que prácticamente todos los estudios asociados a los *pili* se han realizado en bacterias Gram negativas, aún persisten diversas dudas acerca de las estructuras de adherencia de las Gram positivas. Ciertamente, algunas especies de este último grupo también se encuentran recubiertas por proyecciones semejantes a las fimbrias; no

³ Un operón corresponde a un conjunto de genes.

obstante, dichas estructuras podrían no fungir como determinantes de adherencia; en este aspecto, se ha comprobado recientemente que: **a)** numerosas mutantes experimentales de *Streptococcus pyogenes* carecen de fibrillas constituídas por proteína M, pero su capacidad adherente no desaparece ni disminuye; y **b)** la principal adhesina de *S. pyogenes* es su proteína F no fimbrial, cuya receptora es la fibronectina presente en los eritrocitos y en muchas otras células humanas (Dunny, 1997).

Mención aparte merecen las densas capas de microorganismos que aparecen sobre las superficies colonizables; en dichas biopelículas (*biofilms*), sólo la capa más interna se encuentra unida a la superficie “blanco”, ya que las exteriores se fijan a las anteriores por medio de matrices de polisacáridos (Smith, 1998; Todar, 1998).

Las biopelículas se han observado en micrografías electrónicas del tracto intestinal, boca boca, pulmones y vagina, así como de sondas, catéteres y prótesis empleados en medicina clínica. En cuanto a los perjuicios que provocan al aparecer en estos últimos dispositivos empleados en medicina clínica, debe tomarse en cuenta que (Smith, 1998; Todar, 1998):

- Numerosos fragmentos liberados de las películas pueden ingresar a riñones y al torrente circulatorio, agravando notablemente los cuadros patológicos de los individuos implicados.
- Sus compactas estructuras suelen impedir la acción de los antibióticos y de los fagocitos, por lo que es indispensable retirar los materiales plásticos colonizados que se hayan insertado en el organismo del enfermo⁴.

Finalmente, es preciso mencionar que, aún cuando algunos patógenos carecen de adhesinas o cuando éstas no resultan complementarias de los receptores presentes en una mucosa, la eventual acumulación del moco -ya sea por síntesis excesiva del mismo o por ineficacia de los vellos y cilios- llega a promover el establecimiento y la reproducción bacterianos (Lipsitch, 1997).

ii. Movilidad y quimiotaxis

Algunas mucosas humanas, tales como las del intestino delgado y el tracto urinario, se encuentran aún más protegidas de la colonización bacteriana, ya que son irrigadas constantemente por fluídos de desplazamiento rápido. Por tal motivo, las bacterias móviles suelen contar con mejores oportunidades para entrar en contacto con las células epiteliales; de hecho, para intentar su posterior adherencia a los tejidos, los microorganismos inmóviles dependen casi exclusivamente de los segmentos curvos y de las contracciones -que provocan el traslado de los contenidos luminales- asociadas a los tractos correspondientes (Harshey, 1996).

⁴ Dada la gran cantidad de problemas intrahospitalarios generados por el desarrollo de biopelículas en las sondas, catéteres y prótesis, actualmente se realizan diversas investigaciones tendientes a encontrar otros materiales que inhiban la adhesión bacteriana.

Además, la movilidad resulta determinante para el avance bacteriano a través de la capa de mucina que recubre al epitelio de las mucosas pero, principalmente, es necesaria para que la dirección del desplazamiento dependa de las señales quimiotácticas originadas en las células “blanco” y basadas en los gradientes de concentración de los carbohidratos y aminoácidos existentes (Hacker, 1997).

El flagelo bacteriano representa una eficaz máquina de propulsión que guía al patógeno; por lo regular, un sistema flagelar plenamente funcional presenta dos componentes principales: una estructura susceptible de ser observada al microscopio, que incluye un filamento helicoidal rígido, regulado desde la base por un dispositivo rotatorio complejo, y un control integrado por una red bioquímica que transmite la información química y física -proveniente del medio externo-; las señales bioquímicas generadas por dicha red influyen en la dirección de la rotación flagelar y, por lo tanto, en la conducta migratoria de la bacteria (Hacker, 1997; Harshey, 1996).

La movilidad a través de flagelos es la más estudiada por los investigadores, quienes han comprobado debidamente que aquélla es aún más relevante cuando la bacteria se encuentra en nichos externos al cuerpo humano, como los existentes en los ríos y los lagos; sin embargo, es claro que existen otras clases de movilidad bacteriana, incluyendo a la de las espiroquetas *Treponema pallidum*, *Borrelia recurrentis*, etc., que se desplazan atravesando piel y mucosas girando sobre su propio eje (como sacacorchos) y el simple movimiento Browniano que permite a *Staphylococcus*, *Streptococcus* y otros géneros -supuestamente inmóviles- trasladarse dentro de los diversos tractos hasta lograr su contacto con los tejidos “blanco”. Asimismo, de acuerdo con lo que se ha mencionado con anterioridad, las bacterias intracelulares no flageladas, entre las que destaca *Shigella*, adquieren la propiedad de trasladarse tanto intracelularmente como de una a otra células, cuando quedan unidas al extremo de las fibras de actina situadas en la superficie de estas últimas (Hacker, 1997; Pollard, 1995).

iii. Exoenzimas hidrolíticas

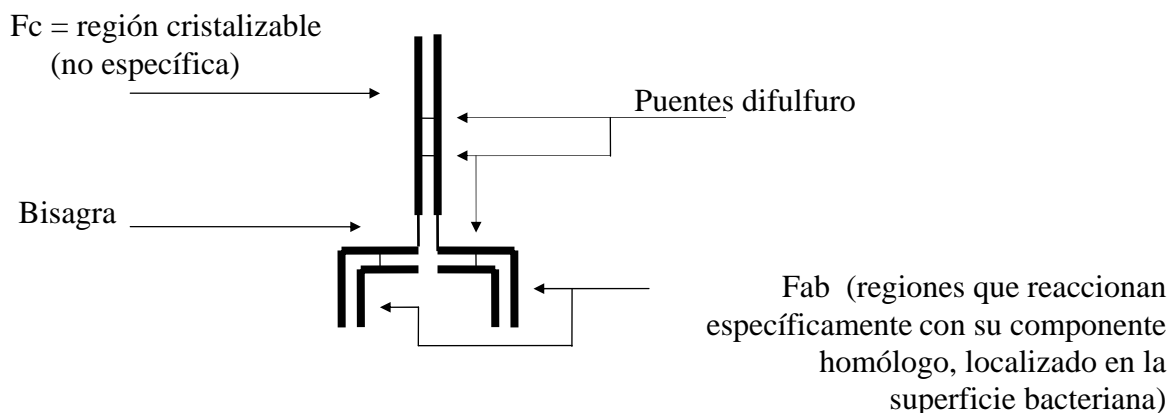
Las bacterias patógenas suelen liberar numerosas enzimas hidrolíticas las cuales degradan sustancias que, habiéndose elaborado por el hospedador para su propio beneficio, terminan siendo utilizadas por el agente invasor -para lograr su establecimiento, reproducción y/o diseminación-; de hecho, algunas no se clasifican como exotoxinas sólo por un mero formulismo, ya que indudablemente dañan células y/o tejidos eucariotes.

Entre las hidrolasas bacterianas que lesionan al hospedador destacan las hialuronidasas, elastasas y colagenasas, las cuales destruyen la matriz extracelular que une a las células de una gran cantidad de tejidos; ambos tipos de enzimas, junto con las fibrinolisinias, se consideran “factores de diseminación”; no obstante, también existen otras que ocasionan la muerte de los fagocitos (como las DNAsas, fosfatasas y la leucocidina), las que interfieren la acción de los antibióticos (β -lactamasas, acetil-transferasas y otras) y las que degradan a los anticuerpos de la clase IgAs (Lantz, 1997, Marcotte, 1998; Smith, 1998).

iv. IgA hidrolasas

Las especies bacterianas que pretenden colonizar las superficies mucosas enfrentan el riesgo de quedar inmobilizadas en la capa de mucina, cuyo poder atrapador reside en su consistencia pero, principalmente, en su contenido de anticuerpos de la clase IgA secretoria⁵ (IgAs); estas moléculas diméricas se encuentran fijadas a la mucina por su fracción Fc, por lo que sus Fab libres funcionan como elementos “pegajosos” a los que, previa reacción inmunoespecífica, se fijan los microorganismos vía sus determinantes antigénicos (consultar la figura 1).

Figura 1. Esquema simplificado de un anticuerpo⁶ (Casadevall, 1998).



En este sentido, la estrategia bacteriana correspondiente consiste en producir IgA hidrolasa, que escinde a la inmunoglobulina -a nivel de la bisagra-, con lo cual la célula bacteriana implicada se puede separar de la mucina, junto con los fragmentos del anticuerpo que se han adsorbido a su superficie y dejando el Fc ligado al moco. *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae* figuran entre las especies que sintetizan IgA hidrolasa con mayor regularidad. Es preciso mencionar que este tipo de enzimas sólo exhibe su capacidad hidrolítica sobre el isotipo IgA1, pero éste es el que predomina en casi todas las superficies mucosas (Lamm, 1998; Marcotte, 1998).

v. Agentes quelantes de hierro

⁵ Los anticuerpos se dividen en 5 clases: IgA, IgG, IgM, IgE e IgD, siendo las 3 primeras las que participan más consistentemente en la defensa del organismo del hospedador; la IgA predomina en las mucosas y, las 2 siguientes, en la sangre, en la linfa y en los órganos internos.

⁶ Los anticuerpos son proteínas (inmunoglobulinas) integradas por dos cadenas pesadas (H) y dos ligeras (L), unidas entre sí por puentes disulfuro.

Como es sabido, el hierro representa un elemento indispensable para el crecimiento bacteriano, pero sus concentraciones son particularmente bajas dentro del organismo humano, en donde prácticamente casi todo se encuentra ligado a transferrina, ferritina, lactoferrina y hemina.

De acuerdo con ello, la sobrevivencia bacteriana depende de la capacidad de cada especie para captar hierro libre o enlazado a otras moléculas; en este aspecto, se han detectado tres posibles mecanismos: uno implica la síntesis de sideróforos o “proteínas extracelulares de batalla” que, además de unirse al metal, cuentan con receptores propios en la célula del microorganismo; en el segundo, otros receptores superficiales de hierro fijan a este último, aunque se encuentre ligado a sideróforos sintetizados y liberados por otras especies microbianas, e inclusive, a transferrina o a lactoferrina; finalmente, el tercero parece involucrar la producción de exotoxinas que destruyen a las células del hospedador -incluidos los eritrocitos- para que éstas liberen sus reservas del metal: varios estudios efectuados *in vitro* han evidenciado que este tipo de toxinas sólo se llega a sintetizar cuando el microorganismo desarrolla en medios carentes de hierro (Ellison, 1994).

Lógicamente, una vez que el metal se fija a la célula bacteriana, aquél debe ser desligado de la molécula a la que se había unido; sin embargo, los procedimientos relacionados a dicha elución aún permanecen sin conocerse.

Por otra parte, debe tomarse en cuenta que diversos trabajos tendientes a determinar la trascendencia de los sideróforos bacterianos, han mostrado que en especies mutantes carentes de los genes asociados a su elaboración, la virulencia no disminuye, o bien, esto último llega a ser imperceptible; esta clase de hallazgos sólo reafirma que las bacterias patógenas cuentan con varias estrategias para captar hierro y que, cuando alguna llega a ser anulada, las restantes cumplen su compartido objetivo (Ellison, 1994).

vi. Evasión de la acción de fagocitos, anticuerpos y el complemento

• La acción anticomplementaria y antifagocitaria de la cápsula bacteriana

Las cápsulas corresponden a redes poco compactas de polímeros que recubren la superficie de diversas bacterias. En su gran mayoría, las más estudiadas están constituidas por polisacáridos, aunque también las hay conformadas por péptidos, proteínas o glucoproteínas y, por lo general, su papel consiste en proteger al microorganismo de la respuesta inflamatoria del hospedero (Hacker, 1997; Kotwal, 1997).

En cuanto a las acciones anticomplementarias de las cápsulas, es conveniente recordar que, en el humano y en los animales superiores, el sistema del complemento se constituye por varias proteínas (incluyendo a la C1, C2, C3,..., C8 y C9) que se activan en forma de cascada hasta generar una molécula lítica denominada “complejo de ataque a la

membrana” (MAC); esta última promueve la destrucción de las células microbianas, lesionando sus estructuras superficiales (Sakamoto, 1998).

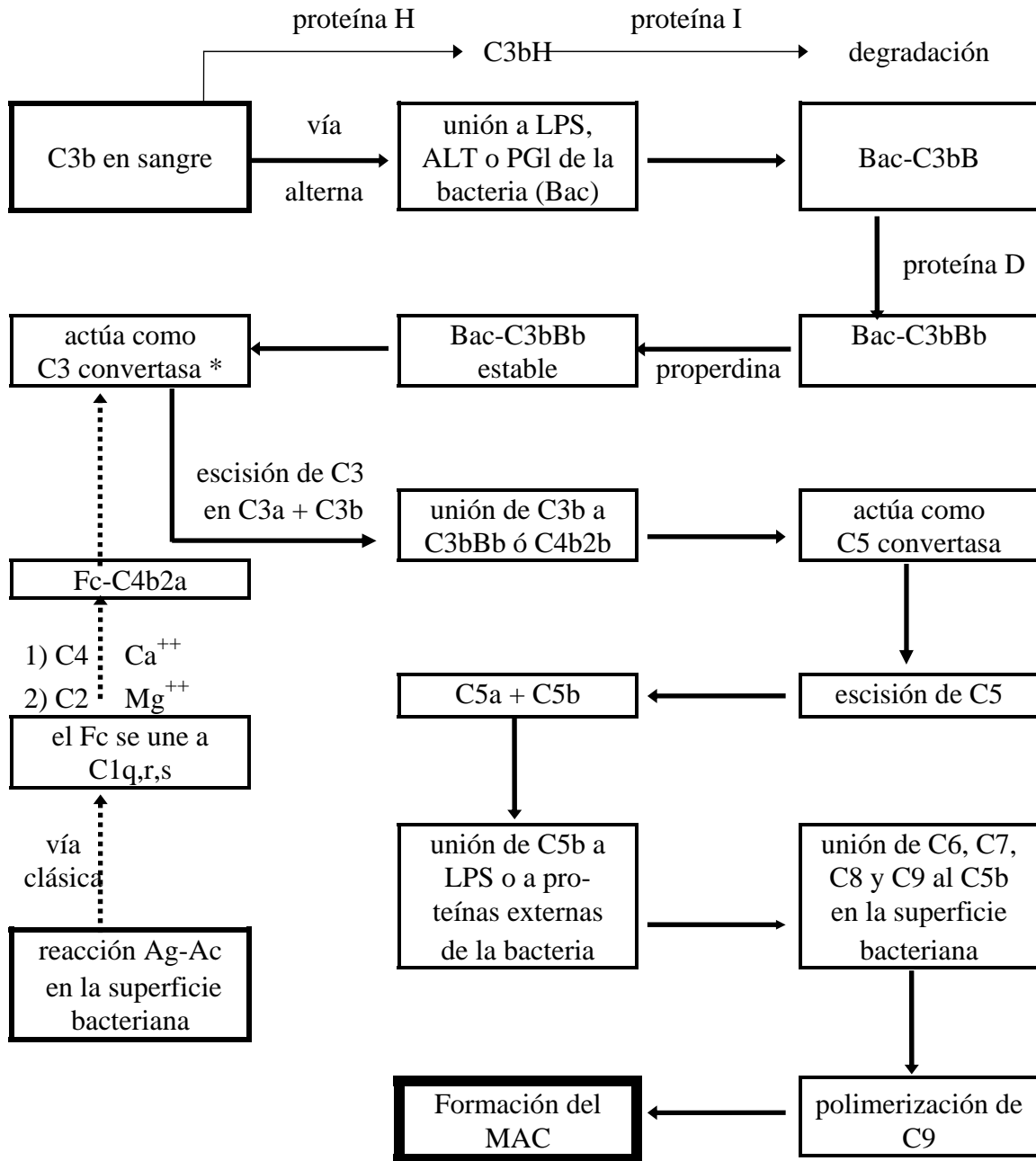
La activación de este sistema se concreta a través de dos vías diferentes: la “alterna”, que se considera inespecífica debido a que ocurre cuando el péptido C3b previamente unido a la membrana externa de cualquier microorganismo reacciona secuencialmente con las proteínas séricas B, D y properdina; en cuanto a la segunda, recibe el nombre de “clásica”, y se dispara como consecuencia de la reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac). Ambas vías incluyen la síntesis de sus respectivas C3 convertasas y, a partir de los siguientes pasos, siguen un camino común que conduce a la formación del MAC (consultar el diagrama 2).

Diversos estudios han mostrado que las cápsulas bacterianas neutralizan la acción lítica del complemento, de las siguientes maneras (Sakamoto, 1998):

- Limitan la vía alterna, impidiendo la libre difusión de C3b y de las proteínas B, D y properdina -hacia la superficie bacteriana-, indispensables todas ellas para la formación y estabilización de la C3 convertasa (C3bBb). En otras palabras, aunque cierta cantidad de C3b y de las proteínas mencionadas puedan alcanzar la cubierta bacteriana, la escasa formación de la C3 convertasa limitará que la cascada activadora se manifieste plenamente; en este aspecto, es oportuno tomar en cuenta que, a menor integración de C3bBb, se producirá menor cantidad de C5b y, con ello, la síntesis del MAC sobre la superficie bacteriana resultará proporcionalmente menor. Evidentemente, el proceso mencionado protege en forma relativa al invasor, pero no llega a nulificar la formación del MAC, por lo que no es posible asegurar que las bacterias capsuladas son resistentes a la acción bactericida del suero.
- Algunas muestran una gran afinidad por la proteína H, por lo que ésta suele alcanzar niveles elevados en el material capsular; en este contexto, cabe recordar que cuando H reacciona con C3b, este péptido es secuencialmente degradado por la proteína sérica I; tal es el mecanismo anticomplementario (y antifagocitario) adicional de las cápsulas ricas en ácido siálico.

Por otra parte, la comprensión de las propiedades antifagocitarias de las estructuras capsulares requiere de recordar que la fagocitosis representa uno de los principales mecanismos de defensa con que cuenta el hospedador: los fagocitos profesionales (los neutrófilos y la serie monocito-macrófago) poseen la capacidad para desplazarse por quimiotaxis hasta los tejidos en los que se ubica el agente invasor, para: a) englobarlo; (mediante la emisión de pseudópodos fagocitarios y la previa reacción entre las superficies de ambos protagonistas); b) encerrarlo en sus fagosomas; y c) provocar su muerte a través de las hidrolasas, el H₂O₂ y los iones superóxido (O₂⁻) contenidos dentro de los lisosomas (Keisari, 1997; Lantz, 1997).

Diagrama 2. Principales eventos asociados a la activación del complemento (Sakamoto, 1998).



CLAVES: LPS = lipopolisacáridos; ALT = ácidos lipoteicoicos; Pgl = peptidoglicano; * = la activación del complemento por las vías clásica y alterna es compartida a partir de la formación de sus respectivas C3 convertasas; MAC = complejo de ataque a la membrana.

Cabe subrayar que la fagocitosis adquiere mayor eficacia cuando participan las opsoninas (sustancias que la facilitan y promueven) y que, de éstas, el organismo del hospedador elabora al menos dos clases: el péptido C3b, cuya acción es inespecífica porque reconoce a cualquier microorganismo, y los anticuerpos IgG; ambas opsoninas potencian la fagocitosis, dado que pueden unirse muy estrechamente a la superficie del invasor y,

además, cuentan con numerosos receptores localizados en la membrana de neutrófilos y macrófagos (Keisari, 1997; Kotwal, 1997).

No obstante, ciertos agentes causales evitan la fagocitosis sintetizando cápsulas que impiden la reacción entre sus componentes superficiales y los de los fagocitos, o bien, elaborándolas con polisacáridos muy semejantes a los generados por su hospedero; a este respecto, *Streptococcus pyogenes* la produce de ácido hialurónico (un carbohidrato que funge como elemento de unión entre las células de diversos tejidos humanos) y *Neisseria meningitidis* la elabora de ácido siálico (un componente común de las glicoproteínas superficiales de las células eucariotes); obviamente, este tipo de cápsulas no son inmunogénicas, ya que se integran por sustancias reconocidas como propias por el organismo del hospedador (Heithoff, 1997; Kotwal, 1997).

- **Otras estrategias para evitar al complemento y a los fagocitos**

Uno de los principales “blancos” del complemento en las bacterias Gram negativas es el lipopolisacárido (LPS), ya que éste actúa como receptor de C3b y de C5b; en este sentido, dos tipos de ajuste bacteriano en el LPS afectan la interacción entre éste y los componentes del complemento: en el primero, el ácido siálico que forma parte del LPS (antígeno O) limita la síntesis de la C3b convertasa, tal como lo hacen las cápsulas bacterianas; en cuanto al segundo, ocurre un incremento en la longitud de las cadenas laterales del antígeno O, ocasionando que el MAC se forme lejos de la membrana externa bacteriana y no pueda ejercer su acción lítica; en tal contexto, los microorganismos que no son destruidos por el MAC son clasificados como resistentes séricos y, entre ellos, destacan varios géneros Gram negativos que causan infecciones sistémicas (Sakamoto, 1998; Todar, 1998).

Otras estrategias bacterianas antifagocitarias están encaminadas a impedir la migración de los fagocitos hacia el sitio en donde se encuentran las bacterias, o bien, a limitar su efectividad. En este aspecto, se ha detectado una enzima que degrada específicamente a C5a, un eficaz quimioatrayente de macrófagos, la cual predomina en cocos Gram positivos tales como *Streptococcus pyogenes*. Adicionalmente, algunos patógenos producen proteínas tóxicas, denominadas genéricamente “agresinas”, que afectan la acción fagocitaria, ya sea: **a)** provocando la muerte de los fagocitos; **b)** impidiendo la fusión fagosoma-lisosoma; o **c)** reduciendo la intensidad del poder oxidativo del contenido lisosomal (Keisari, 1997).

En resumen, ciertos agentes causales han desarrollado la capacidad para sobrevivir dentro de los polimorfonucleares, monocitos y macrófagos, por lo que representan un serio peligro para la salud humana; los recursos más efectivos del hospedero contra las bacterias que pueden sobrevivir dentro de los fagocitos comunes, son las células T citotóxicas y los macrófagos activados.

- **Evasión de la acción de los anticuerpos**

Los anticuerpos presentan una región constante (compartida con otros, independientemente del antígeno con el cual reaccionan) y una región variable, en donde reside su especificidad. Con respecto a su origen, son producidos y liberados por las células plasmáticas las cuales, a su vez, corresponden a linfocitos B maduros (Kotwal, 1997).

Cuando un agente microbiano penetra al organismo del hospedador, se expone a entrar en contacto con macrófagos o con una parte de los linfocitos B que es capaz de sintetizar anticuerpos dirigidos contra alguna de sus determinantes antigénicas. En tal contexto, el microorganismo es inactivado y procesado, y sus epítomos son trasladados hasta la superficie de dichas células⁷ -merced al desplazamiento de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC)⁸-, para ser presentados a los linfocitos T cooperadores.

Como consecuencia de los eventos anteriores, los linfocitos T cooperadores se dividen y liberan linfocinas que amplían la información sobre las determinantes antigénicas del agente invasor, activando específicamente a las clonas de linfocitos B que producen anticuerpos contra alguno de los epítomos implicados.

Finalmente, una porción de dicha clona permanecerá como “células de memoria” que podrán iniciar el proceso -junto con otros macrófagos- en episodios futuros y, la restante, evolucionará a células plasmáticas formadoras del anticuerpo requerido.

Es conveniente precisar que los anticuerpos de la clase IgG pueden actuar como opsoninas, neutralizan toxinas y activan el complemento; los IgM sólo hacen esto último y, los IgA, incrementan la adhesividad de la mucina; por ello, las dos primeras predominan en los tejidos, la sangre, la linfa y otros líquidos internos, mientras la tercera sólo abunda en los epitelios mucosos y en la leche materna (Kotwal, 1997).

Por otro lado, algunas bacterias patógenas son capaces de evadir la acción de los anticuerpos, a través de diversos mecanismos; entre los más conocidos, se cuentan: **a)** la modificación de la estructura de importantes proteínas superficiales, incluidas las de la membrana externa y las que constituyen sus *pili* (variación antigénica); **b)** la síntesis de sustancias de envoltura que semejan a otras localizadas en los tejidos del hospedador (como en el caso de las cápsulas conformadas por los ácidos siálico o hialurónico); y **c)** El recubrimiento microbiano con proteínas producidas por el organismo al cual colonizan (Deitsch, 1997; Finlay, 1997; Heithoff, 1997).

⁷ Por tal razón, macrófagos y linfocitos B se consideran “células presentadoras de antígeno”; los epítomos microbianos de naturaleza polisacárida, lipopolisacárida o predominantemente lipídica sólo son presentados por los linfocitos B.

⁸ El MHC de clase II soporta epítomos pertenecientes a parásitos extracelulares y el MHC de clase I realiza la misma función cuando se trata de patógenos capaces de reproducirse intracelularmente; en este último caso, también participan linfocitos T citotóxicos que destruyen a las células hospedadoras en cuyo interior se reproduce o replica el invasor.

En esta última categoría, los ejemplos más claros incluyen a la fibronectina pero, sobre todo, a los anticuerpos que son adsorbidos por su fracción Fc a la superficie bacteriana, sobre la cual existen receptores alternos para ellos, tales como la proteína A de *Staphylococcus aureus* y la G de *Streptococcus pyogenes*; evidentemente, dicha forma de unión entre el microorganismo y las inmunoglobulinas resulta inútil, tanto para la opsonización como para la activación del complemento pero, además, dependiendo de la concentración de las segundas, impide el reconocimiento de los antígenos superficiales del agente patógeno por parte de los linfocitos B, limitando el importante papel de estos como “células presentadoras de antígeno” (Deitsch, 1997).

Adicionalmente, un fenómeno análogo podría señalarse a propósito de las moléculas microbianas que fungen como receptoras de la transferrina, ferritina y lactoferrina dado que, cuando éstas recubren la superficie de un invasor que requiere procurarse el aporte necesario de hierro, también lo protegen de los anticuerpos dirigidos contra sus determinantes antigénicas localizadas en la membrana externa (Kotwal, 1997).

vii. Invasión y residencia intracelulares

Algunas bacterias han desarrollado mecanismos que les permiten ingresar a las células hospedadoras, incluidos los fagocitos profesionales (neutrófilos y macrófagos); para lograr lo anterior, se adhieren íntimamente a dichas células y provocan cambios significativos en su citoesqueleto, que derivan en el englobamiento del microorganismo, a través de un proceso similar al de la fagocitosis macrofágica, en el que tienen lugar la polimerización y despolimerización de la actina, para dar lugar a los pseudópodos “fagocitarios”. En este sentido, las proteínas bacterianas que estimulan el fenómeno suelen denominarse “invasinas” o “factores de invasión” (Casadevall, 1998; Keisari, 1997; Lee, 1996; Quinn, 1997).

Esta clase de ingreso o internalización en las células hospedadoras diferentes de los fagocitos profesionales puede o no involucrar la formación de estructuras análogas a los fagosomas; en el primer caso, la bacteria pasa directamente al citoplasma de la célula invadida y, en el segundo, requiere de la síntesis de alguna exoproteína que destruye la membrana que la envuelve o forma poros en ella (Kotwal, 1997; Ojcius, 1996; Pollard, 1995).

En todo caso, un microorganismo capaz de sobrevivir y reproducirse en el interior de las células hospedadoras obtiene importantes beneficios, tales como el de contar con alta concentración de nutrimentos y el de estar protegido contra la acción de los anticuerpos, el complemento y diversos antibióticos. Cabe subrayar que, al liberarse de los fagosomas de los fagocitos profesionales, el agente invasor también evade los efectos antimicrobianos del contenido lisosomal, el cual se vierte sobre dichos fagosomas después de que ocurre la fusión fagolisosomal (Keisari, 1997).

La actina presente en las células hospedadoras no sólo actúa a favor de las bacterias cuando éstas pretenden ingresar en las primeras; de hecho, un extremo de dicha proteína

suele quedar ligado al agente invasor, propulsándolo dentro del citoplasma y hacia las células adyacentes del tejido implicado; ello, desde luego, incrementa la invasividad y diseminación de los géneros *Shigella*, *Listeria* y otros patógenos (Pollard, 1995).

Desafortunadamente, el estudio de la fagocitosis forzada por bacterias es de alto grado de dificultad, ya que no puede llevarse a cabo en órganos o animales de experimentación: requiere realizarse en cultivos de células provenientes de mamíferos. No obstante, se han podido observar algunos fenómenos interesantes posteriores a la invasión celular, entre los que destaca el papel de las “integrinas”; éstas corresponden a proteínas de superficie de las células hospedadoras que reconocen a las “invasinas” bacterianas y, previa reacción con ellas, estimulan el ingreso del agente invasor, su eventual liberación de los fagosomas, e inclusive, su eficaz desplazamiento entre las células del tejido afectado, incluidas las que se ubican más internamente -en la submucosa y la lámina propia- y las denominadas “células M” (Keisari, 1997).

Estas últimas actúan como fagocitos naturales que trasladan a las bacterias englobadas hacia el tejido linfoide, en donde los macrófagos las inactivan y presentan sus estructuras antigénicas a los linfocitos T, para dar origen a la respuesta inmune. Sin embargo, cuando se trata de agentes invasores capaces de sobrevivir dentro de los macrófagos, dicho sistema sólo puede fungir como medio para su diseminación linfático-hematógena.

Paradigmas de invasión intracelular

Entre los modelos de invasión intracelular estudiados a mayor profundidad destacan los relacionados con *Y. pseudotuberculosis* y *Y. enterocolitica*. En ambos casos, las invasinas implicadas se unen estrechamente a una familia de integrinas (conocidas como $\beta 1$); éstas corresponden a moléculas enlazadas a proteínas de la matriz extracelular tales como la fibronectina, que se localizan en la superficie lateral de las células epiteliales. Una vez concretada su reacción con las integrinas, las invasinas median el englobamiento bacteriano de manera similar a como se cierra un “zipper”; de hecho, las invasinas de *Yersinia* reproducidas genéticamente en cepas de *E. coli* no invasivas, promueven el englobamiento de estas últimas, provocando rearrreglos sencillos y temporales en el citoesqueleto hospedador (Finlay, 1997).

Ail y YadA son dos invasinas detectadas en las especies enteropatógenas de *Yersinia*; la primera se relaciona principalmente con la adherencia a las células epiteliales y confiere al microorganismo resistencia a la acción bactericida del suero, aunque también pertenece a una familia de proteínas de membrana externa que regulan diferentes funciones de virulencia

Por su parte, YadA está codificada por un plásmido de virulencia y por sí sola actúa como un poderoso promotor de la adhesión y la entrada bacterianas al interior de la célula; sin embargo -extrañamente-, las cepas que expresan ambas invasinas y también cuentan con un complemento completo de plásmidos de virulencia, paralizan los mecanismos fagocitarios normales, permaneciendo en forma extracelular aunque firmemente adheridas a la superficie de la célula hospedadora. Es decir, la proteína Yad A puede

transformar su papel de invasina al de una simple adhesina y, al parecer, muestra mayor avidez por los macrófagos que por las células epiteliales (Finlay, 1997).

De cualquier manera, la unión de las invasinas a las integrinas $\beta 1$ representa un paso clave en el proceso que distingue a *Yersinia* y depende de la secreción de otros factores de virulencia plasmídicos y de la subsecuente translocación de varias proteínas bacterianas al interior del citoplasma de la célula eucariote, con la manifiesta complicidad de estas últimas.

Contrastando con lo antes mencionado, la invasión asociada a *S. typhimurium* sí genera una severa deformación en la superficie de las células epiteliales, poco después de la reacción entre invasinas e integrinas. La superficie de la célula eucariote se proyecta hacia fuera (a partir del punto de adherencia bacteriana) con plegamientos de la membrana que facilitan la macropinocitosis; a continuación, se rearrreglan los filamentos de actina y otras proteínas de las células “blanco”, fenómenos inducidos por diversas señales que incluyen la presencia de calcio y el flujo de fosfato de inositol. La invasión por *Salmonella* es rápida y la bacteria aparece dentro de una vacuola unida a la membrana durante los minutos siguientes; no obstante, la definición de la secuencia de eventos que acompañan al proceso ha resultado complicada, ya que no se ha logrado aclarar cuáles de las modificaciones detectadas en las células infectadas son primarias o secundarias. *S. typhimurium* provoca un flujo de Ca^{++} en los cultivos de células epiteliales, lo cual no ocurre cuando se trata de cepas con mutaciones artificiales en los genes de invasión; además, los quelantes intracelulares de Ca^{++} (pero no los extracelulares) bloquean la entrada del microorganismo a las células epiteliales (Scherer, 1997).

Finalmente, la penetración de *Shigella* a las células epiteliales se parece a la observada en *Salmonella*: también se lleva a cabo la polimerización de actina y miosina, que origina el plegamiento de la membrana celular en la vecindad del lugar de invasión bacteriana y los filamentos de actina producen la formación de pseudópodos y el englobamiento de los microorganismos, los cuales terminan internalizados dentro de una vacuola. *S. flexneri* también fosforila a la tirosina constituyente de una proteína del citoesqueleto de la célula del hospedador: la cortactina, a través de una cinasa y, a diferencia de lo que se observa en *Salmonella*, requiere de la participación de una GTPasa para concretar la polimerización de la actina de las células HeLa.

Sin embargo, los componentes bacterianos necesarios en la invasión por *Shigella* incluyen un sistema complejo involucrado en el transporte y liberación de tres proteínas esenciales: IpaB, IpaC e IpaD -consideradas efectoras-, de las cuales se ha comprobado que la segunda estimula el escape microbiano de la vacuola endocítica (Finlay, 1997; Pollard, 1995); dicha liberación no tiene lugar en *Salmonella*, ya que este último género permanece dentro del fagosoma durante su vida intracelular (Ojcius, 1996; Scherer, 1997).

COMENTARIOS FINALES

El estudio de los factores bacterianos de virulencia tiene como su principal objetivo la búsqueda de nuevas herramientas terapéuticas y preventivas contra numerosas enfermedades infecciosas.

De hecho, hoy en día resultaría insustentable la idea original de elaborar vacunas constituídas por células bacterianas completas e inactivadas⁹; las siguientes son algunas razones que fundamentan esta afirmación:

- La aplicación de los productos vacunales pretende garantizar la neutralización inmunológica de los factores de patogenicidad. Por lo tanto, es preciso tomar en cuenta que el sistema inmunológico de los individuos responde contra los diversos componentes microbianos, en función de las respectivas inmunogenicidades de estos últimos y no de la virulencia o intrascendencia de cada uno.
- Los factores de patogenicidad son sintetizados por los microorganismos, obedeciendo a ciertas señales fisicoquímicas -generadas dentro del hospedador- que regulan la expresión de los genes involucrados; en tal contexto, es necesario considerar que los cultivos microbianos obtenidos *in vitro* pueden carecer de los inmunógenos más significativos, si el crecimiento no se lleva a cabo en los medios apropiados y bajo las condiciones requeridas.
- Las vacunas constituídas por bacterias completas provocan efectos colaterales con mayor frecuencia, dado que la pared celular microbiana contiene lipopolisacáridos u otras sustancias tóxicas; tal es la desventaja de la tradicional vacuna pertussis (empleada contra la tosferina), por lo cual recientemente se ha diseñado una nueva versión, integrada por una adhesina y un toxoide asociados al agente causal.
- A diferencia de las proteínas, los polisacáridos no son buenos inmunógenos, aunque también suelen representar importantes factores de patogenicidad en diversas especies. En estos casos, es conveniente intentar que el sistema inmune los procese como si se tratara de estructuras proteicas, separándolos y uniéndolos artificialmente a alguna proteína que funja como “acarreadora”; cabe mencionar que esta clase de productos se conocen como vacunas conjugadas y que, hasta ahora, destaca por su aparente éxito la que se elaboró recientemente para brindar protección contra la meningitis ocasionada por su principal agente etiológico: *Haemophilus influenzae* tipo b.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Casadevall A.: Antibody-mediated protection against intracellular pathogens, **Trends Microbiol**, 1998; 6(3): 102-106.

⁹ Se dice que una bacteria ha sido inactivada, cuando se ha provocado su muerte a través de algún método físico o químico (por ejemplo, exponiendo el cultivo correspondiente a temperaturas de 62°C o a la acción de agentes químicos tales como el formaldehído) que haya permitido la preservación de la mayor parte de su estructura antigénica).

2. Dalton H.M. and March P.E.: Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling, **Curr Opin Biotechnol**, 1998; 9(3): 252-255.
3. Deitsch K.W., Moxon E.R. and Wellem's T.E.: Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal, and fungal infections, **Microbiol Mol Biol Rev**, 1997; 61(3): 281-293.
4. Dunny G.M. and Leonard B.A.: Cell-cell communication in gram-positive bacteria, **Annu Rev Microbiol**, 1997; 51: 527-564.
5. Edwards R.A. and Puente J.L.: Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis, **Trends Microbiol**, 1998; 6(7): 282-287.
6. Ellison R.T.: The effects of lactoferrin on gram-negative bacteria, **Adv Exp Med Biol**, 1994; 357: 71-90.
7. Finlay B.B. and Falkow S.: Common themes in microbial pathogenicity revisited, **Microbiol Mol Biol Rev**, 1997; 61(2): 136-169.
8. Griffiths E.: Environmental regulation of bacterial virulence-implications for vaccine design and production, **Tibtech**, 1991; 9: 309-315.
9. Hacker J, Blum-Oehler G., Mühldorfer Y. and Tschäpe H.: Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution, **Mol Microbiol**, 1997; 23(6): 1089-1097.
10. Harshey Rasika M y Toguchi Adam.: Spinning tails: homologies among bacterial flagellar systems, **Trends Microbiol**, 1996; 4(6): 226-231.
11. Heithoff D.M., Conner C.P. and Mahan M.J.: Dissecting the biology of a pathogen during infection, **Trends Microbiol**, 1997; 5(12): 509-513.
12. Henderson I.R., Navarro G.F. and Nataro J.P.: The great escape: structure and function of the autotransporter proteins, **Trends Microbiol**, 1998; 6(9): 370-377.
13. Keisari Y., Kabha K., Nissimov L., Schlepper-Schafer J. and Ofek Y.: Phagocyte-bacteria interactions, **Adv Dent Res**, 1997; 11(1): 43-49.
14. Kotwal G.J.: Microorganisms and their interaction with the immune system, **J Leukoc Biol**, 1997; 62(4): 415-429.
15. Lamm M.E.: Current concepts in mucosal immunity. IV. How epithelial transport of IgA antibodies relates to host defense, **Am J Physiol**, 1998; 274(4): 614-617.
16. Lantz M.S.: Are bacterial proteases important virulence factors?, **J Periodontal Res**, 1997; 32(1 Pt 2): 126-132.

17. Lee C.A.: Pathogenicity islands and the evolution of bacterial pathogens, **Infect Agents Dis**, 1996; 5(1): 1-7.
18. Lipsitch M. and Moxon R.E.: Virulence and transmissibility of pathogens: what is the relationship?, **Trends Microbiol**, 1997; 5(1): 31-37.
19. Marcotte H. and Lavoie M.C.: Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A, **Microbiol Mol Biol Rev**, 1998; 62(1): 71-109.
20. Mecsas J. and Strauss E.J.: Molecular Mechanisms of Bacterial Virulence: Type III Secretion and Pathogenicity Islands, **Emerg Infect Dis**, 1996; 2(4): 270-288.
21. Ojcius D.M., Gachelin G. and Dautry-Varsat A.: Presentation of antigens derived from microorganisms residing in host-cell vacuoles, **Trends Microbiol**, 1996; 4(2): 53-59.
22. Pollard T.D.: Actin cytoskeleton. Missin link for intracellular bacterial motility?, **Curr Biol**, 1995; 5(8): 837-840.
23. Quinn F.D., Newman G.W. and King C.H.: In search of virulence factors of human bacterial disease, **Trends Microbiol**, 1997; 5(1): 20-26.
24. Sakamoto M., Fujisawa Y. and Nishioka K.: Physiologic role of the complement system in host defense, disease and malnutrition, **Nutrition**, 1998; 14(4): 391-398.
25. Scherer C.A., Hantman M.J. and Miller S.I.: *Salmonella* invasion and delivery of protein effectors to mammalian cell cytoplasm, **Trends Microbiol**, 1997; 5(4): 127-129.
26. Smith H.: What happens to bacterial pathogens in vivo?, **Trends Microbiol**, 1998; 6(6): 239-243.
27. Todar K.: Mechanisms of Bacterial Pathogenicity, **Bacteriology at UW-Madison**, 1998; 1-16.