

RESUMEN

Salmonella enterica serovar Typhimurium causa diarrea aguda en humanos luego de la infección oral. El primer obstáculo que esta bacteria enfrenta luego del ingreso es el ambiente hostil y proteolítico encontrado en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, poco se sabe todavía de cuáles son los mecanismos empleados por *Salmonella* Typhimurium para resistir las defensas proteolíticas del hospedador, permitiéndole atravesar el tracto gastrointestinal y causar la infección.

Nuestra hipótesis sostiene que *Salmonella* Typhimurium expresa inhibidores de proteasas para defenderse de las proteasas del hospedador a las que se enfrenta durante su ciclo infectivo. En esta Tesis nos centramos en las proteasas del lumen gastrointestinal (estomacales y pancreáticas), borde de cepillo de células epiteliales, lisosomales y las producidas por los leucocitos polimorfonucleares.

En el presente trabajo demostramos por primera vez que Ecotin de *Salmonella* Typhimurium es un inhibidor de proteasas y estudiamos su rol durante la infección oral de este patógeno.

Para poner a prueba nuestra hipótesis, construimos una cepa mutante de *Salmonella* Typhimurium que carece del gen *ecotin*. La cepa mutante $\Delta ecotin$ de *Salmonella* Typhimurium exhibió una menor inflamación en el modelo murino de colitis inducida por *Salmonella*. Luego, analizando la interacción de *Salmonella* Typhimurium con proteasas secretadas por el páncreas, observamos que la cepa $\Delta ecotin$ era más susceptible a la acción de pancreatina y elastasa pancreática purificada.

Salmonella se encuentra con proteasas del borde de cepillo previo a los procesos de adhesión al epitelio intestinal, en ese contexto, la ausencia de *ecotin* resultó en una disminución de la adhesión a monocapas de las líneas celulares Caco-2 y HT-29, relacionada a la actividad proteolítica de las enzimas del borde de cepillo.

La inflamación intestinal desencadenada por *Salmonella* Typhimurium luego de invadir el epitelio intestinal genera el reclutamiento de macrófagos y leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos). Por ese motivo, decidimos estudiar el rol de *Ecotin* en la interacción con dichos tipos celulares. En macrófagos, la cepa $\Delta ecotin$ mostró una susceptibilidad mayor al contenido proteolítico lisosomal y un defecto en la replicación intracelular. Además, observamos que *Ecotin* tiene un rol crucial en *Salmonella* Typhimurium contra la acción microbicida del contenido granular y trampas extracelulares de leucocitos polimorfonucleares humanos.

Así, el trabajo presentado aquí refleja la importancia de *ecotin* en *Salmonella* Typhimurium durante la infección para evadir al sistema proteolítico de defensa del hospedador. Demostramos que el gen *ecotin* permite a *Salmonella* Typhimurium ingresar por vía oral, transitar y colonizar el tracto gastrointestinal para luego desarrollar la patología.

Palabras claves: inhibidores de proteasas, *Salmonella*, *Ecotin*, infección oral, adhesión, proteasas intracelulares, leucocitos polimorfonucleares.

SUMMARY

Salmonella enterica serovar Typhimurium causes acute diarrhea in humans after oral infection. The first obstacle these bacteria face after oral entry is the harsh and proteolytic environment found in the gastrointestinal tract. However, little is known about the mechanisms involved in the capacity of *Salmonella* Typhimurium to resist the host proteolytic defenses, allowing it to travel through the gastrointestinal tract and develop the infection.

Our current hypothesis is that *Salmonella* Typhimurium expresses protease inhibitors to defend itself against the host proteases which these bacteria encounter during the infectious cycle. We focus on proteases present in the lumen of the gastrointestinal tract (stomach and produced by pancreas), brush border proteases from intestinal epithelial cells, lysosomal proteases and those proteases secreted by polymorphonuclear leukocytes.

In the present work, we demonstrate for the first time that Ecotin from *Salmonella* Typhimurium is a protease inhibitor, and we studied its role during oral infection.

We constructed a strain from *Salmonella* Typhimurium lacking the *ecotin* gene. The $\Delta ecotin$ strain from *Salmonella* Typhimurium elicited lower inflammation in a murine model of *Salmonella* induced colitis. Then, studying the interaction of *Salmonella* Typhimurium with pancreatic proteases, we observed that the $\Delta ecotin$ mutant was more susceptible to the action of pancreatin and purified pancreatic elastase.

Salmonella Typhimurium encounters intestinal brush border proteases before starting the adhesion processes to the intestinal epithelium, in such context, the absence of *ecotin* resulted in an impaired adhesion phenotype to Caco-2 and HT-29 cell line monolayers, related to the proteolytic activity of the brush border enzymes.

The intestinal inflammation triggered by *Salmonella* Typhimurium after invading the intestinal epithelium induces the recruitment of macrophages and polymorphonuclear leukocytes (neutrophils). For such reason, we decided to study the role of Ecotin in the interaction of *Salmonella* with these cell types. In macrophages, the $\Delta ecotin$ strain showed an increased susceptibility to the lysosomal proteolytic content and intracellular replication defects. We also observed that Ecotin has a key role in *Salmonella* Typhimurium against the microbicide action of the granule contents and extracellular traps from human polymorphonuclear leukocytes.

In conclusion, the work presented here highlights the importance of *ecotin* in *Salmonella* Typhimurium during the infection to evade the host defense proteolytic system. We were able to demonstrate that the *ecotin* gene allows *Salmonella* Typhimurium to enter through the oral route, travel and colonize the gastrointestinal tract to develop the associated pathology.

Key words: protease inhibitors, *Salmonella*, Ecotin, oral infection, adhesion, intracellular proteases, polymorphonuclear leukocytes.