

MECANISMOS DE LESIÓN INDUCIDOS POR BACTERIAS PATÓGENAS INTRACELULARES

Aparte de las bacterias que producen acción patógena mediada por toxinas existen otras que infectan el interior de la célula eucariótica. Los investigadores dedicados a estudiar este fenómeno han remarcado dos aspectos de importancia: **1: los mecanismos de entrada de esas bacterias a las células y 2: la forma en que pueden sobrevivir en el interior celular.**

El primer concepto médico de importancia es que las bacterias que sobreviven en el interior de células (por ejemplo de un macrófago), si bien tienen dificultades metabólicas para conseguir sus nutrientes, también han desarrollado mecanismos de evasión contra los que tiene la célula para eliminarlas. **Más aún, cuando una bacteria está dentro de células eucarióticas es mucho más resistente a la acción de los antibióticos, es inmune a la acción de los anticuerpos circulantes (que no entrarán a la célula) y a los linfocitos NK o CD8+, con lo cual, por regla, establecen infecciones crónicas, difíciles de erradicar.**

Frecuentemente los estudios de estas bacterias intracelulares se desarrollaron en células epiteliales o en otras derivadas del endotelio vascular; es decir, en células no fagocíticas. Esto permitió caracterizar a los factores exclusivamente bacterianos involucrados en la invasión intracelular, ya que los fenómenos de fagocitosis están ausentes en esos cultivos celulares eucarióticos. Hay dos mecanismos básicos que determinan el ingreso de una bacteria patógena a una célula eucariótica no fagocítica:

- 1. La unión de adhesinas bacterianas a receptores celulares eucarióticos y**
- 2. la “inoculación” de proteínas bacterianas efectoras dentro del citosol de la célula eucariótica.**

La contraparte de la célula eucariótica parasitada está en cambios dinámicos en su citoesqueleto y en tráfico de vesículas intracitoplásmicas, ambos involucrados en este complejo mecanismo de interacción entre una bacteria y una célula huésped eucariótica no fagocítica.

Entrada de bacterias patógenas en células fagocíticas “profesionales”

Las células fagocíticas “profesionales” (células dendríticas, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares neutrófilos) forman parte de la respuesta inmune “innata”. Algunas bacterias han evolucionado no sólo para sobrevivir dentro de esas células potencialmente hostiles sino también para proliferar dentro de ellas. Entre ellas están las pertenecientes a los géneros *Brucella*, *Legionella*, *Mycobacterium* y *Salmonella*. El problema metodológico de estudiar el ingreso y la supervivencia de estas bacterias en células fagocíticas “profesionales” está en que, en estos modelos experimentales, las bacterias pueden usar sus propios mecanismos de invasión, que son independientes de aquellos de “opsonización” por los cuales entrarían a las células fagocíticas “profesionales” en condiciones normales. Para resolver este problema, numerosos estudios fueron hechos con bacterias muertas u opsonizadas y comparados con otros hechos con bacterias vivas y virulentas, para determinar cuáles receptores y

cascadas de transducción de señales eran activadas por cada una en las células eucarióticas. De esa forma se demostró que **muchas bacterias intracelulares interfieren con los mecanismos de transducción de señales en macrófagos**, para poder sobrevivir dentro de ellos.

Brucella spp sobrevive dentro de macrófagos y monocitos. Si está opsonizada entra a la célula por la vía del Complemento y por su interacción con la fracción Fc de las inmunoglobulinas. Si no está opsonizada, en cambio, el ingreso ocurrirá a través de receptores de fibronectina o de lectinas. Dependiendo de la forma de entrada variará el destino de las bacterias: si entran a través de la opsonización serán destruidas. Si entran por otros mecanismos no mediados por la respuesta inmune podría ser que no fueran lisadas. En este sentido, por ejemplo, *Mycobacterium spp* se asocia al receptor 3 del Complemento (CR-3), un miembro de la superfamilia de las Integrinas formado por el heterodímero C11b/CD18 y *Coxiella burnetii* también usa al CR-3 como receptor pero en este caso para inhibir la fagocitosis provocando la redistribución de CR-3 más allá de las extensiones de los pseudópodos de la célula eucariótica.

La invasión de células eucarióticas no fagocíticas

Hay 2 mecanismos: el del “**cierre relámpago**” y el del “**gatillo**”. En el mecanismo del “cierre” (también conocido como “entrada mediada por receptor”), la bacteria está firmemente unida a la membrana de la célula huésped mediante sus adhesinas, que se asocian a receptores celulares. La bacteria se va desplazando protruyendo a través de la membrana plasmática hacia el interior celular y termina en el ingreso al citoplasma. Todo esto ocurre con una movilización **mínima** de proteínas del citoesqueleto.

Diferente a lo anterior, el mecanismo de “gatillo” implica **dramáticos rearreglos** del citoesqueleto. Estos consisten en la extensión de membranas en la forma de **filopodia** y **lamelopodia** en el sitio de contacto entre la bacteria y la superficie celular. Esta actividad de las membranas es conocida como “ondeado de membranas” (o, en inglés, *membrane ruffling*) y depende de la actividad de pequeñas GTPasas de la subfamilia Rho.

La diferencia fundamental entre ambos mecanismos es que el del “cierre relámpago” es promovido “desde afuera” a través de la activación de receptores celulares por parte de las bacterias, mientras que el segundo (el del “gatillo”) es activado “desde adentro” de la célula eucariótica a través de la acción de proteínas efectoras bacterianas que son “inyectadas” a la célula por uno de los mecanismos de secreción (el del tipo III).

El mecanismo de invasión por medio de un “cierre relámpago”

Conceptualmente consiste en que una adhesina bacteriana se une a un receptor ubicado en la superficie de la célula eucariótica. Ese receptor está involucrado en la adhesión intercelular y/o en la regulación de proteínas reguladoras que modulan la dinámica del citoesqueleto. Estas proteínas frecuentemente están conectadas con las cascadas de señalización intracelular disparadas por la fosforilación en tirosina y que llevan al re-arreglo de las fibras de actina o la reorganización de la membrana

plasmática celular. Los casos más estudiados son los de las bacterias de los géneros *Listeria*, *Yersinia* y *Helicobacter*.

En el caso de *Listeria monocytogenes*, su entrada a células eucarióticas no fagocíticas está mediada por las Internalinas A y B. La Internalina A se combina con el receptor celular, que es la E-Cadherina que normalmente interviene en la formación de uniones intercelulares estrechas. En la normalidad, la E-Cadherina interactúa con la alfa y la beta Catenina que a su vez hacen que las fibras de actina estén estabilizadas a nivel de las uniones intercelulares. *Listeria*, al interactuar mediante sus Internalinas con la E-Cadherina, anula este mecanismo de unión intercelular y permite el ingreso de la bacteria a la célula justamente por las zonas que biológicamente están destinadas a mantener la integridad de un epitelio a través de uniones estrechas. La Internalina B de *Listeria* actúa por otro mecanismo consistente en unirse a por lo menos 3 receptores celulares diferentes que, normalmente, a través de la cascada iniciada por la PI-3-kinasa (fosfatidil inositol 3 kinasa) activan a las GTPasas Rho remodelando las fibras de actina. Es decir, mediante este segundo mecanismo la bacteria penetra sobreestimulando a un receptor fisiológico. Tanto las bacterias del género *Yersinia* como *Helicobacter* usan mecanismos similares al descrito para poder invadir el interior de una célula eucariótica.

El mecanismo de invasión por medio de un “gatillo”

Es promovido por proteínas efectoras bacterianas que son “inyectadas” en el citosol de las células eucarióticas. Estas proteínas efectoras hacen blanco en proteínas reguladoras claves de las células huéspedes eucarióticas, lo que a su vez lleva a la alteración de cascadas de señales **que controlan la dinámica del citoesqueleto, la liberación de moléculas inmunomoduladores y la relación entre la sobrevivencia y la muerte de las células hospedadoras.**

El mecanismo de “inyección” de factores bacterianos dentro de la célula huésped es el del tipo III que, básicamente, consiste en la formación en la superficie bacteriana de un complejo supramolecular en forma de jeringa que actúa en 3 pasos: primero la secreción de proteínas “translocadoras” por parte de las bacterias, luego la unión de las mismas a la membrana plasmática celular para formar un “poro” y, por último, el contacto de la punta de la “aguja” de ese complejo similar a una jeringa con el citosol y la inyección de las proteínas bacterianas. Las bacterias que más utilizan este mecanismo pertenecen a los géneros *Salmonella* y *Shigella* y **ambas inducen rearrreglos dramáticos del citoesqueleto celular que resultan en el “ondeado” de membranas, en la macropinocitosis y, finalmente, en la entrada de la bacteria al citoplasma celular.**

Muchas de las proteínas “inyectadas” por estas bacterias a las células eucarióticas imitan la acción de las proteínas eucarióticas que activan a las GTPasas de la subfamilia Rho (Cdc42, Rac1 y Rho).

Por ejemplo, para invadir células no fagocíticas, las bacterias del género *Salmonella* usan el mecanismo de secreción del tipo III codificado en la “isla de patogenicidad 1” de su genoma. Recordemos que una “isla de patogenicidad” forma parte del concepto de “islas genómicas”. Es decir que son segmentos discretos del DNA presente en el cromosoma bacteriano, que difieren aún entre cepas estrechamente relacionadas de bacterias de la misma especie y que también contienen al conjunto de genes necesarios para escindir el fragmento entero, así como los genes implicados en la transmisión de ese fragmento a otra bacteria y en su integración al genoma de la

bacteria nueva. *Salmonella* le “inyecta” a la célula eucariótica la proteína denominada SigD/SopB. Esta proteína es una fosfatasa, es decir que tiene una capacidad enzimática de desfosforilar a una proteína. En este caso el blanco es la fosfatidil-inositol-fosfatasa celular, lo que lleva a una marcada disminución del fosfatidil-inositol difosfato. Este compuesto está normalmente unido a la cara interna de la membrana plasmática celular, en aquellos lugares donde esa membrana forma invaginaciones; y la pérdida de este compuesto lleva a que la membrana plasmática celular pierda su unión con las fibras de actina que forman la “corteza exterior” de las células, con lo que la bacteria puede invadir. Otros mecanismos están involucrados en este fenómeno, pero exceden a los objetivos didácticos de este curso. Baste con expresar que esos mecanismos permiten la formación de grandes fagosomas y que también implican la degradación de filamentos intermedios como son los compuestos por citoqueratinas. Como dato interesante, una vez dentro de la célula eucariótica, *Salmonella* media la reparación de la dinámica normal del citoesqueleto, liberando, una vez más, factores propios. Es decir, la bacteria tuvo la estrategia de perjudicar a la célula para poder entrar y, luego de alcanzado ese objetivo, reconstruyó el metabolismo celular normal, al menos en cuanto al citoesqueleto se refiere.

Shigella actúa de manera similar a *Salmonella* pero, aparte, desestabiliza a los microtúbulos por unión a la Tubulina, lo que aumenta el “ondeo” de la membrana plasmática celular –esencial para el ingreso de la bacteria- y también actúa sobre la Vinculina, que es una proteína de anclaje entre la membrana plasmática y la Actina, despolimerizando a esta última. Además, se ha reportado que favorece la reubicación de c-sarc (una proteína-quinasa de Tirosina codificada por el proto-oncogén celular src) que normalmente inhibe la expresión de GTPasas. La migración de este compuesto ocurre después de que *Shigella* indujo el aumento de la actividad de GTPasas celulares.

Sobrevida bacteriana intracelular

Normalmente, cuando una célula fagocita partículas de latex o bacterias no patógenas, utiliza el mecanismo del tráfico de vesículas que comienza con el fagosoma. El proceso de maduración del fagosoma está mediado por receptores del tipo Toll (TLRs) que, a su vez, gatillan a proteínas celulares involucradas en el tráfico vesicular. Como consecuencia de esto los fagosomas van madurando y fusionándose con los endosomas tempranos, los endosomas tardíos y los lisosomas. No es esto lo que ocurre cuando la fagocitada es una bacteria patógena con capacidad de sobrevida intracelular. En este caso, el microorganismo utiliza dos mecanismos para sobrevivir:

- 1. Una vez fagocitados, bloquear los mecanismos de maduración de endosomas y lisosomas y**
- 2. Provocar una rápida lisis de la membrana del fagosoma y pasar al citosol.**

Supresión de la maduración del fagosoma

Este mecanismo es empleado por bacterias de los géneros *Salmonella* y *Mycobacterium*, que suprimen la maduración del fagosoma en estadios específicos de la ruta fago-lisosómica. En células epiteliales y en macrófagos, la vacuola que contiene a *Salmonella* adquiere transitoriamente los marcadores moleculares de los endosomas tempranos, tales como el receptor de transferrina. A esto le sigue la adquisición de glicoproteínas lisosomales (Lgps) pero NO de enzimas lisosomales. Esas Lgps provienen de vacuolas que rodean a la vacuola que contiene la bacteria. Dentro de esta estructura las Lgps forman un intrincado retículo filamentoso. Esos endosomas no se unirán al lisosoma activo (que contiene por ejemplo Catapsina D) y tanto el mecanismo de control de la maduración del endosoma como el de interrupción de su unión con el lisosoma está mediado por uno de los mecanismos de secreción del tipo III de *Salmonella*. Aquí se ha sobresimplificado la descripción de este mecanismo que, en realidad, es mucho más complejo.

En el caso de *Mycobacterium*, el fagosoma que la contiene carece de las GTPasas propias del endosoma tardío y tampoco tiene la ATPasa que normalmente acidifica al fagosoma, siendo esta alteración atribuida a los lipoarabinomananos de la pared celular de *Mycobacterium*. Otro mecanismo de sobrevida de *Mycobacterium* es el secuestro de la proteína celular TACO. Esta proteína es observada en lisosomas que contienen *Mycobacterium* vivas pero no en los que contienen bacterias muertas ni en los lisosomas activados. De tal forma que se sugiere que esta bacteria “secuestra” a TACO para impedir la maduración del fagosoma y su unión posterior al lisosoma.

Lisis vacuolar

Las bacterias de los géneros *Rickettsia*, *Listeria* y *Shigella* emplean este mecanismo que les permite escapar del fagosoma y pasar al citoplasma celular, abundante en nutrientes. Esto lo pueden hacer valiéndose de dos mecanismos: por un lado segregan una toxina citolítica que forma poros en la membrana del endosoma (especialmente en el caso de *Listeria*) y simultáneamente se recubren de una “cola de Actina” celular que se ubica en uno de los polos bacterianos y, mediante su contracción, literalmente propulsa a la bacteria para salir del endosoma. Una vez en el citosol, las bacterias crecen rápidamente. Para que esto ocurra necesitan incorporar hexosa-fosfato y para lograr este nutriente las bacterias sintetizan un transportador de hexosa-fosfato muy similar al que está en el interior de la célula eucariótica, logrando de esta manera conseguir el nutriente sin tener que depender de las enzimas celulares. Por último, si las bacterias mantienen la “cola de Actina”, unas permanecen en la célula infectada y otras pueden infectar a células vecinas.

Sobrevida intravacuolar

La mayor parte de las bacterias intracelulares que viven dentro de vacuolas, como se vio, tratan de evitar la fusión de las mismas con el lisosoma o escapar al citoplasma. Sin embargo hay una excepción: *Coxiella burnetii*. Esta bacteria vive dentro de una vacuola acidificada por ella misma, en un medio parecido al del lisosoma, pero

simultáneamente evita la fusión con el lisosoma verdadero porque altera la membrana del mismo.

Sobrevida en fagosomas que han sido separados de la vía endocítica

Son ejemplos de esto las bacterias de los géneros *Chlamydia*, *Legionella* y *Brucella*. El caso más extremo es el de *Chlamydia*. Esta bacteria vive en forma intracelular en un compartimiento rodeado de una membrana y denominado cuerpo de inclusión, que se translada a la región perinuclear próxima al aparato de Golgi. Este cuerpo de inclusión no interactúa con ninguno de los componentes de la vía fagosoma-endosoma-lisosoma. Se mueve intracelularmente por secuestro de la proteína motora de microtúbulos Dineína, quien lleva al cuerpo de inclusión a lo largo de los microtúbulos hasta la cercanía del aparato de Golgi. En ese punto, vesículas exocíticas del Golgi se fusionan con el cuerpo de inclusión de *Chlamydia*, en un mecanismo en el que está involucrada la secreción de un factor del tipo III por parte de la bacteria. *Legionella* hace algo similar aunque menos conocido. En el caso de *Brucella*, la infección inicial de células epiteliales o de macrófagos hace que la bacteria se encuentre dentro del endosoma temprano. Pero ese endosoma temprano que contiene a *Brucella* no evolucionará a endosoma tardío ni se unirá al lisosoma, sino que viajará hacia el retículo endoplásmico siguiendo la vía autofagocítica. De esta forma *Brucella* construye un espacio derivado del retículo endoplásmico que le permite vivir en su interior. La ausencia de fusión con los demás componentes está determinada por la liberación de un factor de secreción bacteriano del tipo III.

CONCLUSIONES

Como se ve, las bacterias intracelulares son organismos sumamente complejos y especializados, que han evolucionado a través de delicados mecanismos de interacción con la expresión de la célula eucariótica. Para su sobrevida tanto evaden los sistemas fagocíticos de las células como interfieren con el metabolismo celular normal, sea aumentando la expresión de algunas moléculas, sea disminuyéndola. En cualquier caso, dista mucho por conocerse de esta particular relación entre bacterias y células, pero sin ese conocimiento, el control farmacológico y/o inmunológico de las infecciones causadas por estos microorganismos va a ser difícil.

Este resumen de clase es una traducción y condensación del trabajo publicado por Ana Alonso y Francisco García del Portillo en la revista International Microbiology (2004) 7:181-191, y titulado "Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens". Sus contenidos fueron aumentados, reordenados y simplificados por el autor con la única finalidad de facilitar la comprensión del tema por los alumnos de la Carrera de Medicina de la Universidad de Buenos Aires. Su distribución no persigue autorías ni fines de lucro y queda prohibida su reproducción parcial o total por cualquier medio.

Prof. Dr. Norberto Sanjuan
Departamento de Microbiología
Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires