

Principales factores de virulencia de *Yersinia enterocolitica* y *Streptococcus pyogenes*

Raúl Garza-Velasco^a, Liliana Solórzano-Escobar^a e Isabel Valdés-Almaguer^a

Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM
Laboratorio de Microbiología, edificio “A”, primer piso,
Facultad de Química, Insurgentes # 3000, D.F., C.P. 04510,
Tel. 56-22-36-91, e-mail: raugarza@servidor.unam.mx

RESUMEN

Actualmente, el estudio de la patogenicidad bacteriana representa la plataforma adecuada para continuar avanzando en la prevención y tratamiento de numerosas enfermedades que afectan al ser humano aunque, con cierta regularidad, algunos hallazgos también llegan a ser determinantes para diseñar pruebas diagnósticas de índole molecular.

Y. enterocolitica y *S. pyogenes* producen una extensa gama de moléculas que permiten a dichos microorganismos colonizar diversos tejidos, promoviendo su plena adaptación a las condiciones físico-bioquímicas imperantes en los tejidos, así como la neutralización de los mecanismos de defensa de los individuos infectados. En este sentido, ambas especies representan un adecuado paradigma para explorar la temática asociada a la virulencia bacteriana dado que, adicionalmente, las investigaciones referentes a *Y. enterocolitica* han resultado muy prolíficas y *S. pyogenes* ocasiona un amplio espectro de padecimientos, algunos de las cuales dependen de su invasividad y otros de su toxigenicidad, amén de los que se fundamentan en importantes procesos autoinmunes.

Cabe subrayar que si bien el presente trabajo sólo incluye a dos especies, ello se debe exclusivamente a los motivos antes señalados y no puede ni pretende soslayar el indubitable hecho de que el tema de “patogenicidad bacteriana” abarca a muchos otros agentes etiológicos; en tal contexto, resultará muy lógico y gratificante que otros interesantes y significativos avances logrados dentro de este mismo campo, continúen apareciendo en LABORAT-acta.

Terminología clave: adherencia e invasión, neutralización de las defensas hospederas, plásmidos y profagos de virulencia, superantígenos y reactividad cruzada.

SUMMARY

Actually the study of bacterial pathogenicity represents the best platform to advance in prevention and therapy of many human diseases, but also it is very useful to elaborate new molecular diagnostic tests.

Y. enterocolitica and *S. pyogenes* produce many molecules related to the colonization of several tissues, promoting the bacterial adaptation to the host physical-biochemical conditions and the neutralization of the host defenses. In this sense, both microorganisms represent an appropriated paradigm to explore the theme of pathogenicity: the works about *Y. enterocolitica* have been prolific and *S. pyogenes* causes several diseases some of which are supported in its ability of invasion and others in its toxigenicity, besides those implicated in interesting autoimmune process.

Although the present work only deals with two species, it is clear that the theme of virulence mechanisms includes many others bacterial agents. In fact it will be logic and grateful that another advances in this area are to be reported in LABORAT-acta.

Keywords: Adherence and invasion, host defense neutralization, virulence plasmids and prophages, superantigens, immune cross-reactivity.

INTRODUCCIÓN

En los años más recientes, el estudio de los padecimientos de origen bacteriano se ha concentrado en la determinación de las moléculas que confieren patogenicidad a los agentes causales y, simultánea o secuencialmente, en la detección de los genes involucrados en la síntesis de tales factores de virulencia.

Sin embargo, aunque los mecanismos de patogenicidad resultan por sí mismos muy interesantes, las investigaciones implicadas tienen una meta aún más trascendental: establecer mejores estrategias para prevenir o tratar las principales enfermedades infecciosas, e inclusive, diseñar nuevas pruebas que le aporten una mayor celeridad y confiabilidad al diagnóstico de laboratorio.

En tal sentido, uno de los requisitos indispensables para que los hallazgos experimentales puedan traducirse en exitosas realidades, radica en incrementar la interacción entre el químico clínico y la biología molecular.

A este último respecto, el presente trabajo describe brevemente las funciones de algunos destacados factores de virulencia de dos especies bacterianas: *Yersinia enterocolitica* y *Streptococcus pyogenes*, cuya actual relevancia en el campo de la salud pública se refleja claramente en la cantidad de publicaciones que se han venido generando en torno a ellas: mientras la primera se ha constituido en uno de los mejores prototipos para estudiar los mecanismos de patogenicidad asociados a invasividad, la segunda ha adquirido una peligrosidad cada vez más lejana de la que tradicionalmente se le reconoce.

I. *Yersinia enterocolitica*

Las enfermedades intestinales debidas a *Y. enterocolitica* se asocian principalmente a la ingestión de agua o alimentos contaminados, aunque en algunos casos el microorganismo llega a transmitirse de persona a persona. La forma más severa de la yersiniosis intestinal incluye cuadros febriles y el dolor abdominal es tan intenso que llega a generar diagnósticos erróneos de apendicitis; de hecho, *Y. enterocolitica* fue descubierta como patógeno humano al observarse notables incrementos de apendicectomías asociadas a pacientes infantiles con diarrea (1).

Durante las primeras etapas de su proceso infeccioso, este agente causal muestra una clara afinidad por las placas de Peyer y atraviesa la mucosa a través de las células M; posteriormente, ingresa a los nódulos linfáticos mesentéricos, en los cuales se reproduce provocando una respuesta inflamatoria que funge como la responsable del dolor abdominal. De cualquier manera, buena parte de las patologías entéricas son localizadas y autolimitadas,

en virtud de que la respuesta del hospedador suele ser vasta y suficiente para eliminar al agente invasor (1).

Cabe señalar que este microorganismo también llega a ocasionar cuadros sistémicos en individuos inmunocomprometidos -tales como los que padecen de SIDA- y entre quienes han recibido transfusiones de sangre contaminada. En este último caso, destacan los serogrupos O:3, O:9, O:5,27 y O:1,2a,3, y la sepsis se debe a que -como también ocurre con algunos otros microorganismos-, *Y. enterocolítica* puede crecer durante el almacenamiento de la sangre a 4°C¹ (1, 2).

Además, algunos pacientes han experimentado septicemias posteriores a la administración terapéutica de hierro, lo que confirma la avidez del agente causal por dicho metal; los serogrupos implicados en estos casos son el O:8, O:13a,13b y O:20, todos ellos productores de un potente sideróforo denominado yersiniabactina (Ybt) (3).

Es oportuno señalar que, en algunas personas, las infecciones gastrointestinales originadas por *Y. enterocolítica* preceden a cuadros de artritis, miocarditis, glomerulonefritis y otras afecciones aparentemente autoinmunes, los cuales aparecen 2 a 6 semanas después de finalizados los episodios intestinales.

¹ Estudios experimentales realizados en sangre fresca completa almacenada a 4°C han mostrado que, a dicha temperatura y después de una fase *lag* de 4 días, *Y. enterocolítica* O:3 alcanza cifras cercanas a las 5 x 10⁶ UFC/mL en 21 días.

Evidentemente, entre las entidades clínicas mencionadas, la que aparece con mayor frecuencia es la “artritis reactiva” (o Síndrome de Reiter), observada más comúnmente en individuos escandinavos cuyas células presentan el Ag superficial de histocompatibilidad HLA-B27 y, al parecer, es generada por células T o anticuerpos (Acs) asociados a antígenos (Ags) bacterianos que muestran reactividad cruzada con epítomos presentes en las células del hospedero² (2).

Finalmente, una de las principales características de las cepas patógenas de esta especie, consiste en la presencia de un plásmido de 70 a 75 Kpb (miles de pares de bases), denominado pYV (de *Yersinia virulence plasmid*), cuyos productos incluyen a las proteínas YadA y Yops, esenciales en su virulencia (4).

i. Adherencia/invasión

Hasta hace algunos años se percibía un gran consenso acerca de que, una vez en el intestino y previa unión primaria a la superficie apical de las células de la mucosa, *Y. enterocolítica* promovía que estas últimas la englobaran y la liberaran por exocitosis hacia la submucosa. Tal modelo parecía razonable, ya que se había comprobado que *Y. pseudotuberculosis*, *Shigella spp* y *L. monocitogenes* se adherían a las células de mamíferos cultivadas *in vitro* y, en una segunda etapa, las forzaban a engullirlas.

Sin embargo, trabajos recientes han demostrado que dicho modelo no aplica para este microorganismo, el cual posee diversas herramientas biológicas para cruzar la mucosa intestinal. En este sentido, inicialmente fueron detectadas dos proteínas superficiales,

² Es decir, el Síndrome de Reiter no se debe a la infección bacteriana de las articulaciones.

conocidas respectivamente como invasina (Inv) y Ail (de *attachment-invasion locus*), a las que posteriormente se sumó una tercera, denominada YadA (de *Yersinia adherence*); de manera conjunta, las tres moléculas citadas podrían concretar los procesos de adherencia e invasión (5, 6).

Por lo que respecta al gen *inv*, éste fue detectado clonando fragmentos de DNA de *Y. pseudotuberculosis* en una cepa no invasiva de *E. coli*: las bacterias tratadas eran inoculadas en cultivos celulares y, una vez transcurrida la incubación correspondiente, las células hospederas se lavaban meticulosamente y eran lisadas con detergentes para que liberaran su contenido intracelular; finalmente, se procedía a efectuar la búsqueda de *E. coli* y, consecuentemente, a comprobar si ésta había adquirido el gen involucrado (1).

Por su parte, el gen *ail* también fue sometido a un proceso similar y los resultados revelaron que tanto éste como el *inv* residían en el cromosoma de *Y. enterocolitica*; más recientemente, se logró identificar al plásmido que codifica para YadA, cuya capacidad para mediar la invasión también fue ampliamente demostrada en cultivos celulares (6).

Las investigaciones llevadas a cabo en ratones han confirmado que *Y. enterocolitica* se adhiere al tejido intestinal, preferentemente al nivel de las placas de Peyer, y que después cruza la mucosa a través de las células M; éstas corresponden a fagocitos naturales presentes en la mayoría de las mucosas, que suelen englobar a diversas bacterias adherentes para conducir las hasta el tejido linfoide, en donde los macrófagos las inactivan y procesan sus estructuras antigénicas para presentarlas a los linfocitos T y dar origen a la producción de Acs de la clase IgA. Tales observaciones asumen que *Yersinia* impide su inactivación por parte de los

macrófagos y que termina empleando a las células M como su portal hacia los tejidos adyacentes y los situados en la submucosa; sin embargo, en su momento también pusieron en entredicho la función de las invasinas, cuestionamiento que desapareció al comprobarse que las integrinas, receptores de Inv y YadA, se localizan en la superficie basolateral –trasera- de las células epiteliales de la mucosa y no en la región apical de estas últimas (5, 6, 7).

Las integrinas constan de dos subunidades, conocidas como α y β , las cuales varían según los distintos tipos celulares; en este sentido, Inv y YadA sólo reconocen a las integrinas $\beta 1$, siendo que las predominantes en el intestino son las $\beta 4$ ³ (6).

Una segunda objeción hacia la trascendencia de Inv tuvo lugar al observarse que ésta se produce en mayor grado a 25°C que a 37°C⁴; no obstante, la duda se disipó al comprobarse que dicha invasina se puede detectar con relativa facilidad en las placas de Peyer de los enfermos y que el gen *inv* se expresa consistentemente a 37°C, siempre que el pH imperante sea menor de 7 (1).

Esta última afirmación es de sumo relevante, pues subraya que los medios de laboratorio no necesariamente reproducen las condiciones que los microorganismos enfrentan dentro de su hospedero; además, confirma que los sistemas regulatorios bacterianos suelen responder a diversas combinaciones de señales y no necesariamente a un único parámetro fisicoquímico.

³ El receptor de Ail aún no se ha reconocido.

⁴ Ail y YadA sí se sintetizan más eficazmente a 37°C.

Adicionalmente, se demostró que las mutantes *inv* negativas son notablemente más lentas para penetrar en las células M aunque, una vez en la submucosa, resultan igual de virulentas que las cepas originales; este hallazgo sugiere que *Inv* favorece aún más la fagocitosis bacteriana por parte de las células M las cuales, a diferencia de las células epiteliales de la mucosa, es posible que sí exhiban integrinas $\beta 1$ en su región apical (5).

Cabe destacar que *Y. enterocolitica* también posee una clase de fimbrias mucoides conocidas como Myf (de *mucoïd Yersinia fibrillae*) o PsaA (de *pH 6 adhesin*), a las cuales ciertos autores han propuesto como otra alternativa para que el microorganismo concrete su adherencia primaria a las células “blanco”; empero, ello no se ha logrado comprobar, e inclusive, existen quienes aseguran que dichas fibrillas no actúan a este nivel del proceso infectivo, arguyendo que *Yersinia pestis* –especie que también las sintetiza- no la requiere para tal efecto, habida cuenta de que las pulgas infectadas la inyectan directamente en la sangre humana (1).

Además, es posible que las Myf pudieran desempeñar alguna función bacteriana dentro del fagosoma de los fagocitos dado que, dentro de dicho compartimiento celular, el pH imperante fluctúa entre 5 y 6, precisamente la condición fisicoquímica a la que su síntesis es óptima.

ii. Interferencia de la fagocitosis

Sin lugar a dudas, una de las propiedades más relevantes de *Y. enterocolitica* consiste en los eficaces y particulares mecanismos con que impide la fagocitosis; en tal contexto, se han

descrito ampliamente una serie de proteínas bacterianas que participan en el proceso correspondiente, las cuales en conjunto son conocidas como Yops⁵ (7, 8, 9).

La síntesis de las Yops es dependiente del plásmido de virulencia pYV (de 70-75 kb), cuya región “core” está ocupada primordialmente por los genes *yop* y *vir*; estos últimos participan en la expresión y secreción de los primeros, por lo que la pérdida del pYV o la simple modificación de algunos de sus genes provocan que la cepa involucrada se torne avirulenta (4).

Una característica sobresaliente de algunas Yops reside en su posibilidad de ser inyectadas directamente en el citoplasma de la célula hospedera, en lugar de ser liberadas al medio extracelular; en este sentido, YopE y YopH no son tóxicas cuando se adicionan exógenamente a los cultivos celulares de mamíferos pero, en contraparte, sí ocasionan la muerte de las células eucariotes al ser emitidas por bacterias adheridas a aquéllas⁶ (9, 10).

De acuerdo con la información de que se dispone en la actualidad, las Yops se pueden clasificar en tres clases funcionales: **a)** la que abarca a proteínas que se insertan en el citoesqueleto de las células eucariotes; **b)** la que agrupa a las que interfieren las señales de transducción en las células hospederas; y **c)** la encargada de mediar el procesamiento y la excreción de las proteínas contenidas en las dos clases antes mencionadas.

⁵ El nombre de Yops surgió debido a que inicialmente se incurrió en el error de reconocerlas como simples “proteínas de membrana externa de *Yersinia*” (YOPS).

⁶ Este tipo de observaciones demuestra que la adherencia constituye un requerimiento fundamental para que *Y. enterocolitica* inyecte las Yops en sus células “blanco”.

Por lo que respecta a las Yops que se insertan en la membrana de la célula hospedera, al parecer YopE obstaculiza los rearreglos de actina que se asocian al englobamiento macrofágico del microorganismo; de hecho, después de ser inyectada al citosol eucariote, origina el desprendimiento y la muerte de las células adheridas a placas de vidrio, e inclusive, impide que los macrófagos cultivados *in vitro* ingieran a la cepa productora y manifiesten alteraciones asociadas al inicio de la apoptosis (7, 8, 11).

En cuanto a las Yops que interfieren las señales de transducción en las células hospederas, es importante tomar en cuenta que estas últimas responden a señales ambientales, estimulando la activación y desactivación de ciertas proteínas cuyos receptores fungen –a su vez- como moduladores de diversas funciones celulares; por lo general, la fosforilación de dichas proteínas funge como efectora, mientras que la desfosforilación detiene la activación del sistema correspondiente.

La fosforilación suele ocurrir en alguno de los residuos de tirosina, por lo que las tirosín-cinasas y las tirosín-fosfatasas resultan determinantes en el mencionado proceso de regulación; en tal contexto, dos de las Yops poseen actividad de proteín-cinasa o proteín-fosfatasa y, por lo tanto, pueden alterar los mecanismos de señalización de la célula hospedera. Aparentemente, este tipo de funciones parece destinarse a la neutralización de la fagocitosis, ya que altera las señales que atraen a los fagocitos hacia las regiones anatómicas infectadas y promueven el estallamiento oxidativo de su contenido lisosomal (10).

Específicamente, YopH actúa como tirosín-fosfatasa y YpkA (de proteín-cinasa de *Yersinia*) como serín-treonín-cinasa; a pesar de su distinta designación, se acepta que esta última forma

parte de las Yops, debido a que es codificada y regulada por pYV, aunque aún no se ha logrado aclarar si, como ocurre a la YopH, es inyectada directamente en las células hospederas. En todo caso, la eliminación o modificación de los genes que codifican para YpkA se traducen en la reducción de la virulencia de *Yersinia* (10).

Paralelamente, YopM inhibe la agregación plaquetaria y, por ende, la liberación de citocinas por parte de las plaquetas activadas, ya que aquélla compite con éstas por la molécula señal (α -trombina); de este modo, YopH, YpkA y YopM disminuirían en forma conjunta la intensidad de la defensa hospedera (9, 10).

Por último, las proteínas que median el procesamiento y excreción de las Yops también resultan decisivas para la virulencia de *Yersinia*, e incluyen a la YopB, YopD y Ysc (esta última, de *Yop secretion*); de hecho, su función aparenta ser la misma que la realizada por las moléculas proteicas que median el ensamble y anclaje de las subunidades de pilina o la excreción de exotoxinas en otros microorganismos: algunas Ysc comparten secuencias similares con ciertas Mxi, responsables de la excreción de las adhesinas e invasinas Ipa de *Shigella spp* (11, 12, 13).

La participación de LcrV se suma a la de las tres anteriores y también resulta determinante para la completa expresión de las Yops, si bien el gen *lcr* podría desempeñar otras funciones adicionales, ya que sus productos son liberados al medio y los Acs dirigidos contra ellos confieren protección a los modelos animales (13).

iii. Resistencia a la acción bactericida del suero

Y. enterocolitica representa uno más de los agentes etiológicos conocidos como resistentes séricos; esta característica parece ser inducible, ya que sólo se manifiesta a 37°C, y también está mediada por YadA y Ail, la primera de las cuales evidencia una gran avidez por el factor sérico H que, al reaccionar con C3b, promueve que este péptido derivado del C' sea degradado por la proteína I⁷ (2).

iv. Procuración del hierro

La sobrevivencia y proliferación de cualquier patógeno dentro de su hospedero depende en gran medida de su capacidad para procurarse nutrientes esenciales tales como el hierro. En el organismo humano, éste se encuentra casi totalmente unido a moléculas especializadas entre las que destacan la ferritina, transferrina, lactoferrina y hemoglobina; por tal motivo, los agentes bacterianos han debido desarrollar estrategias eficaces para obtener dicho metal a partir de las moléculas mencionadas.

Por lo que se refiere a *Yersinia*, diversos autores han demostrado que las cepas patógenas presentan sideróforos o “proteínas de batalla”, denominadas genéricamente Yersiniabactina (Ybt), cuya codificación reside en genes que se relacionan directamente con la virulencia. La Ybt purificada de *Y. enterocolitica* posee una masa molecular de 482 Da y sus grupos

⁷ Es oportuno recordar que los factores H e I producidos por el organismo del hospedero, tienen como función elemental la de regular la concentración de C3b, molécula cuyos principales papeles consisten en actuar como opsonina y desencadenar la activación del C' por la vía alterna.

quelantes incluyen estructuras alifáticas y aromáticas que, bajo condiciones *in vitro*, evidencian una unión relativamente débil al el hierro (3).

Cabe señalar que la actividad de los sideróforos sólo se ha detectado en cepas de alta virulencia, cuya letalidad para ratones se manifiesta en bajas dosis infectivas. En este sentido, el conjunto de genes responsables de la mortalidad murina ha recibido el nombre de “isla de alta patogenicidad” (HPI), su tamaño es de 43.4 kb y su “core” funcional consta de 12 genes, al menos 6 de los cuales (*irp1* a *irp5* e *irp9*) están involucrados en la biosíntesis de la Ybt; en concreto, *ybtA* codifica para el controlador transcripcional del regulón, *intB* para una integrasa, *irp6* e *irp7* para proteínas que participan en el transporte de la Ybt férrica a través de la membrana interna bacteriana y, finalmente, *irb8* para la señal de transducción (3).

II. *Streptococcus pyogenes*

Esta especie ocasiona al humano numerosos padecimientos, cuyo espectro abarca desde una persistente piodermatitis o la clásica faringitis recurrente, hasta afecciones más severas tales como septicemia, fiebre escarlatina, fiebre reumática y glomérulonefritis.

Sin embargo, en los últimos tres lustros, su incidencia y peligrosidad se han incrementado notablemente: en la actualidad provoca una “nueva” entidad clínica análoga al síndrome del shock tóxico -que suele cursar junto a cuadros septicémicos de muy grave pronóstico- y los casos de fiebre reumática han aumentado significativamente. Por tales razones, en los años

recientes ha surgido toda una corriente de investigación, destinada a esclarecer la renovada virulencia estreptocócica y los fenómenos epidemiológicos involucrados.

Cabe destacar que el genoma de este microorganismo, también conocido como *Streptococcus* del grupo A (GAS), corresponde a una estructura muy dinámica, que refleja complejos y trascendentales procesos evolutivos asociados a plásmidos, transposones, elementos de inserción (IS) y bacteriófagos, en los cuales se ha venido fundamentando la progresiva creación de las nuevas cepas.

Fiebre reumática. Por lo regular, la literatura convencional se refiere a la fiebre reumática y a la glomerulonefritis como “enfermedades autoinmunes provocadas por *S. pyogenes*”, subrayando que ambas aparecen debido a que las células estreptocócicas establecidas en la faringe son sometidas a un continuo proceso de lisis (producto de la inflamación) y, consecuentemente, buena parte de sus fragmentos ingresa al torrente circulatorio, en donde induce una respuesta generalizada de Acs (14).

De hecho, es costumbre que se emitan hipótesis sobre las moléculas específicas promotoras de la respuesta autoinmune, implicando a la estreptolisina O (STO) o a otras moléculas liberadas por el microorganismo entre las que, incuestionablemente, figura la proteína M.

En este sentido, es preciso señalar que los trabajos efectuados durante las décadas de los 60 y los 70 sólo lograron establecer que las secuelas autoinmunes se debían a los GAS y que, hasta los años recientes, se han podido obtener datos mejor fundamentados, basados principalmente

en el uso de Acs monoclonales. Los hallazgos más sobresalientes se mencionan a continuación (15, 16, 17):

- Los Acs del hospedero que son reconocidos por los Acs monoclonales anti-GAS, tanto de origen murino como humano, son: la miosina, treopomiosina, queratina, vimentina, laminina y N-acetil- β -D-glucosamina⁸; consecuentemente, hoy en día se acepta que las sustancias anteriores podrían resultar determinantes en las manifestaciones clínicas de la fiebre reumática.
- Los Acs monoclonales anti-miosina humana manifiestan reacciones cruzadas con epítomos ubicados en la membrana y la pared celular de los GAS, destacando las siguientes tres proteínas: **a)** la M tipoespecífica; **b)** una de 60 kDa, ubicada en la membrana celular; y **c)** otra de 67 kDa, similar estructuralmente al complejo principal de histocompatibilidad de la clase II (MHC II). Así mismo, se ha demostrado reactividad cruzada entre el carbohidrato C de *S. pyogenes*, la miosina cardíaca humana y la proteína M.

De acuerdo con lo anterior, en la actualidad se reconocen cuatro determinantes antigénicas estreptocócicas que provocarían la fiebre reumática: la proteína de 60 kDa, la de 67 kDa y la M, así como la N-acetil- β -D-glucosamina.

Evidentemente, la mayor parte de los investigadores ha venido enfocando toda su atención en la proteína M, cuya participación se ha logrado demostrar, a partir de observaciones tales como las siguientes (15, 16, 17):

- a) Los Acs monoclonales anti-miosina humana también reaccionan con péptidos presentes en la proteína M5 y, a su vez, el residuo 184 a 188 (glicina-lisina-serina-lisina-glicina) de esta última induce que los ratones produzcan Acs capaces de reaccionar con la miosina.
- b) Existe un 80 % de similitud entre el péptido NT4 de M5 y la miosina cardíaca humana. Además, mientras la secuencia involucrada se encuentra repetida cuatro veces en en la M5, aquella sólo aparece una única ocasión en la miosina; a este respecto, se ha sugerido la posibilidad de que las regiones bacterianas repetidas rebasen la tolerancia del hospedero susceptible hacia el autoantígeno y que ello desencadene el proceso autoinmune.

De cualquier manera, se concluye que las células T y los Acs anti-M reconocerían tales epítomos del hospedero y, al adsorberse en los tejidos del corazón, inducirían una respuesta inflamatoria que dañaría las válvulas cardíacas (17).

Glomérulonefritis postestreptocócica. Análogamente a lo antes comentado para la fiebre reumática, se ha logrado comprobar que el suero de pacientes con glomérulonefritis aguda presenta Acs dirigidos contra laminina, colágena y otras moléculas localizadas en la membrana basal del glomérulo; de hecho, los riñones afectados suelen contener Acs estreptocócicos, inmunoglobulinas y complemento (C') (16).

⁸ La N-acetil- β -D-glucosamina también representa el epítomo inmunodominante del carbohidrato C que caracteriza a los GAS.

Además, se ha reportado que los Acs de la membrana basal glomerular comparten epítomos con la proteína estreptocócica M12 y que el epítomo renal: isoleucina-arginina-leucina-arginina, también se ubica en la proteína M. Una de las interesantes propuestas derivadas de dichas afirmaciones se refiere a la posibilidad de que ciertos serotipos M de *S. pyogenes* generen nefritis infecciosa y que, en una segunda etapa, la reactividad cruzada entre los glomérulos y la proteína M promueva la producción de los Acs antiglomerulares; a este respecto, ya se ha logrado reproducir la nefritis en modelos animales inoculados con serotipos nefritogénicos M12 y, a partir de los riñones afectados, se ha concretado la elusión de Acs antiglomerulares capaces de reaccionar con la proteína M12 (18).

En resumen, los estudios implicados sustentan que ciertos mecanismos de mediación inmunológica provocan la glomerulonefritis aguda, aunque aún queda pendiente de esclarecerse si la nefritis es ajena a la reactividad cruzada existente entre los Acs estreptocócicos y glomerulares.

Fiebre escarlatina y síndrome del shock tóxico. La fiebre escarlatina afecta principalmente a los niños, se contagia por medio de aerosoles generados por enfermos o portadores faríngeos, y se caracteriza por la aparición de fiebre y rash difuso en la piel. Esta afección alcanzó su máxima relevancia durante el siglo XIX, merced a los numerosos y severos brotes epidémicos europeos; posteriormente, en la primera mitad del siglo XX, conservó su importante frecuencia, aunque su gravedad se redujo gradualmente hasta ser catalogada como una patología de bajo peligro; finalmente, el empleo de la penicilina originó su casi total desaparición (14).

Sin embargo, en 1978 hizo su aparición una nueva enfermedad, denominada síndrome del shock tóxico (SST), la cual era ocasionada por ciertas cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de la toxina TSST-1; si bien ésta simulaba los síntomas de la fiebre escarlatina (fiebre, rash difuso y descamación cutánea de palmas y plantas), lo cierto es que no se percibía alguna razón aparente para relacionar a ambos padecimientos: a diferencia de la escarlatina -la cual se presentaba en niños de ambos sexos y rara vez en los adultos-, el SST afectaba a las mujeres de 20 a 40 años de edad (19, 20).

Eventualmente, la causa del SST pudo ubicarse en el uso de ciertos tampones superabsorbentes que, durante la menstruación, no eran cambiados con la frecuencia requerida por parte de quienes los utilizaban; por lo tanto, los estafilococos incorporados durante la inserción o -en algunos casos- situados previamente en la vagina, encontraban las condiciones adecuadas para crecer rápidamente en la sangre menstrual atrapada y liberar la TSST-1, misma toxina que después se absorbía hacia la circulación y provocaba los síntomas correspondientes (19).

El reconocimiento de las causas que promovían el padecimiento sugería que el problema se encontraba en vías de solución, ya que los tampones superabsorbentes habían sido retirados del mercado. De hecho, la frecuencia del SST declinó notablemente, hasta que se registraron nuevos episodios de SST asociados, tanto a infecciones de heridas como a cirugías nasales previas: en ambos casos, los estafilococos provenientes de la piel y la mucosa nasal humana desarrollaban en los tejidos lesionados y liberaban la TSST-1, la cual penetraba directamente al torrente sanguíneo (19).

No obstante, justo cuando empezaban a tomarse medidas para impedir la aparición del SST a partir de las heridas infectadas y las cirugías nasales, se detectaron los primeros casos de otra entidad clínica cuyos síntomas resultaban muy similares, si bien no implicaban el uso de tampones ni la participación de *S. aureus*; el agente etiológico era *Streptococcus pyogenes* y éste se podía aislar a partir de infecciones cutáneas o de heridas diversas, e inclusive, mediante hemocultivos (19, 20).

En virtud de las semejanzas clínicas encontradas entre ambos padecimientos, la nueva afección fue denominada TSLS, por *toxic shock-like syndrome*; cabe señalar que esta última surgió dentro de los hospitales, dentro de los cuales su mortalidad alcanzaba cifras del 30 %, casi tres veces mayores que las observadas para el SST (19).

No obstante, simultáneamente empezaron a evidenciarse numerosos e inusitadas patologías comunitarias debidas a *S. pyogenes*, cuya elevada y pronta letalidad sucedía al estado de shock y a múltiples fallas orgánicas, emulando en un inicio a la fiebre escarlatina del siglo XIX: el TSLS también era provocado por una potente toxina, cuya denominación actual es la de exotoxina pirogénica estreptocócica (Spe) (20, 21, 22).

i. Adherencia

Los trabajos realizados durante los últimos años han logrado precisar anteriores afirmaciones en el sentido de que la función adherente de los GAS era promovida principalmente por una estructura fimbrial constituida por el ácido lipoteicoico (ALT) y la proteína M: en la actualidad, se acepta que dicha molécula proteica podría mediar la adherencia del

microorganismo a los queratinocitos (las células predominantes en la piel) aunque, por lo que respecta a los tejidos faríngeos, ese mismo papel parece desempeñarlo la proteína F, de más reciente descubrimiento (23, 24, 25).

La proteína F (PrtF) muestra una gran afinidad a la fibronectina (Fn) tisular de la garganta, amígdalas y otras mucosas, e inclusive, se ha comprobado que las mutantes F^- pierden la capacidad de adherirse a los cultivos de células epiteliales; además, cuando el gen correspondiente es clonado en cepas no adherentes de *Enterococcus faecalis*, las variantes obtenidas manifiestan una evidente capacidad para adherirse a las células faríngeas (23, 24, 25, 26).

ii. Invasión intracelular

El súbito incremento de las enfermedades sistémicas estreptocócicas en numerosas regiones del mundo ha estimulado la búsqueda de factores y mecanismos que expliquen el presente comportamiento del agente causal. En tal contexto, recientemente se ha observado que el microorganismo puede penetrar en las células epiteliales de los mamíferos, al parecer con base en la participación de sus proteínas superficiales M y F (23, 27).

Es oportuno comentar que los casos de septicemia y TSLS publicados en los últimos años han implicado a determinados serotipos estreptocócicos, entre los que destaca una subclona M1, conocida como M1 inv^+ (23, 28, 29).

Dichas cepas M1 inv⁺ se han calificado como “de alta invasividad”, ya que invaden las células epiteliales A549 con una frecuencia significativamente mayor a la registrada en otras clonas estreptocócicas M1 y, desde el punto de vista molecular, se diferencian de estas últimas en que su DNA contiene un fragmento adicional perteneciente a dos distintos profagos, uno de los cuales codifica para la toxina SpeA (21, 23, 28).

Si bien aún es incierta la relación entre la alta frecuencia de invasión intracelular y la enfermedad sistémica estreptocócica, es indudable que el estadio intracelular puede incrementar las posibilidades de que *S. pyogenes* se disemine entre las poblaciones humanas. A este respecto, se ha comprobado lo siguiente (22, 23, 25, 27, 28, 29):

- Las cepas provenientes de los portadores se internalizan con alta frecuencia en las células HEp-2 en tanto que, las asociadas a faringitis o septicemia, lo hacen en mucha menor proporción; así mismo, los aislamientos M1 inv⁺ incrementan su grado de penetración cuando se les cultiva de manera seriada en células epiteliales humanas *-in vitro-*, ya que su repetido paso por los medios intracelular y extracelular termina seleccionando subclonas más invasivas.
- Los estreptococos intracelulares pueden resistir hasta 100 µg/mL de penicilina, e inclusive, el 30 a 40 % de los niños continúa liberando al microorganismo después de haber recibido tratamiento con el mencionado antibiótico.
- Las amígdalas extraídas a partir de niños con amigdalitis recurrente albergan estreptococos intracelulares, buena parte de los cuales se localiza en el interior de macrófagos.

De acuerdo con lo anterior, los tratamientos con penicilina seleccionan cepas con alta frecuencia de invasión, lo que origina una mayor cantidad de fallas terapéuticas y, por ende, el aumento de los reservorios humanos que transmiten al microorganismo; evidentemente, al crecer el número de individuos infectados también se incrementará la incidencia de enfermedades sistémicas.

Cabe señalar que, independientemente del papel de las proteínas M y F, diversos autores han detectado otra molécula proteica estreptocócica: SfbI (de *Streptococcus fibronectin-binding*), cuya afinidad hacia la Fn es tan elevada como la de la PrtF, por lo que también estimula la invasión de células HEP-2; de hecho, se ha logrado demostrar que: **a)** la internalización del microorganismo es impedida por Acs anti-SfbI y por la preincubación de las células “blanco” con SfbI purificado; y **b)** las esferas de látex recubiertas con SfbI se adhieren eficazmente a las HEP-2 y, a continuación, aquéllas resultan englobadas por estas últimas (23, 30).

iii. Evasión e interferencia de las defensas del hospedador

Por lo general, la mortalidad del TSLS es mayor que la del SST, debido probablemente a que las cepas de *S. pyogenes* asociadas al primer padecimiento sí ingresan al torrente circulatorio; lógicamente, lo anterior refleja la gran capacidad de esta especie para neutralizar o evadir las defensas de su hospedador, a través de la participación de estructuras o moléculas tales como la cápsula, la C5a hidrolasa, la proteína M y otras proteínas superficiales.

Por lo que toca a la cápsula, su composición de ácido hialurónico resulta trascendental, ya que dicho carbohidrato también forma parte de diversos tejidos humanos; consecuentemente, no es

inmunogénico y, al margen de su participación antifagocitaria, retarda el reconocimiento del invasor por parte del sistema inmune del hospedador. Obviamente, ambas propiedades de la cápsula no resultan suficientes para que los GAS permanezcan por tiempo indefinido en la garganta u otras regiones anatómicas, como lo demuestra el hecho de que numerosos casos de faringitis estreptocócica llegan a curar sin tratamiento alguno (31, 32).

En cuanto a la C5a hidrolasa, ésta degrada a C5a, la partícula del C' que actúa como quimioatrayente de los fagocitos; es decir, el microorganismo se autoprotege de la activación del C', reduciendo la cantidad de C5a en su radio de acción. De hecho, las mutantes que no producen C5a hidrolasa resultan menos virulentas (18, 31).

Por su parte, la proteína M cubre casi totalmente a las células estreptocócicas y su acción antifagocitaria reside en que capta con gran avidez al factor plasmático H, promoviendo la degradación C3b. A este respecto, las mutantes carentes de proteína M han mostrado ser más susceptibles a la fagocitosis⁹ y mucho menos virulentas que las cepas originales (23, 31).

Dado que hasta el momento se han detectado cerca de 100 serotipos diferentes de proteína M, existe la posibilidad de que el microorganismo también evada la opsonización mediante el proceso de variación antigénica.

Finalmente, los aislamientos más peligrosos de *S. pyogenes* presentan otras moléculas de superficie conocidas como proteínas parecidas a la M (*M-like proteins*), las cuales son capaces de incorporar el fragmento Fc de los Acs IgG e IgA dirigidos contra cualquier Ag; por lo

tanto, al cubrir a toda la célula estreptocócica con proteínas del hospedador, impide que ésta sea reconocida como extraña por el sistema inmune (32).

iv. La exotoxina pirogénica estreptocócica (Spe)

Los fagos temperados de *S. pyogenes* revisten una gran importancia, en virtud de que los genes asociados a las exotoxinas pirogénicas residen en sus respectivos genomas. De acuerdo con datos obtenidos recientemente, en el cromosoma estreptocócico se ubican al menos tres profagos completos, ubicados muy cercanos uno del otro, que contienen a los genes *speA*, *speB* y *speC* (19, 21).

En particular, las clásicas toxinas pirogénicas (eritrogénicas) SpeA y SpeC de los GAS, son codificadas por el fago T12 y el fago CS112, respectivamente; es importante tomar en cuenta que el gen *speA* también se ha puesto de manifiesto en otros fagos del grupo A (T14), lo que adquiere un gran significado epidemiológico, debido a que la SpeA también se asocia a los aislamientos provenientes de pacientes con TSLS (21).

La presencia de *speA* en fagos lisogénicos representa una prueba más de la transferencia horizontal de genes; de hecho, el elevado grado de similitud entre las secuencias de SpeA y de las enterotoxinas B (SEB) y C1 (SEC1) de *S. aureus*, ha conducido a sospechar la transferencia interespecies a través de la transducción de fagos (19).

⁹ Inclusive, los Acs anti-proteína M protegen de las infecciones ocasionadas por *S. pyogenes*.

La Spe es muy similar a la TSST-1 de *S. aureus*, e inclusive, su mecanismo de acción implica su participación como superantígeno: ejerce su perjuicio actuando como puente de unión entre el MHC II (de las células presentadoras de antígeno) y los receptores especializados de las células T que interactúan con dicha molécula (19, 21).

Es decir que, cuando existe una alta concentración de SpeA en el organismo del hospedero, sus moléculas se unen indiscriminadamente al MHC II de los macrófagos y de los linfocitos B -sin haber sido procesadas en el interior de dichas células- y, secuencialmente, a numerosas células T cooperadoras. La reacción generada es parecida a la que ocurre normalmente cuando se presenta a los Ags comunes, aunque tiene lugar de manera indiscriminada, por lo que su frecuencia es infinitamente mayor: se estimula a 1 de cada 5 células T y no a 1 de cada 10^4 o 10^5 ; consecuentemente, la concentración liberada de IL-1, IL-2 y TNF- α y otras diversas citocinas resulta altamente tóxica, motivo por el cual en los individuos afectados se manifiestan síntomas tales como fiebre elevada, náuseas, vómito, hipotensión, malestar general, graves trastornos del sistema circulatorio y algunos otros signos asociados al estado de shock (19, 20, 22).

Cabe mencionar que, a últimas fechas, se han detectado otros superantígenos estreptocócicos, cuyo mecanismo de acción es muy similar al de Spe, el más estudiado de los cuales ha recibido la denominación de exotoxina mitogénica Z (33).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lee LA, Taylor J, Carter GP, Quinn B, Farmer III JJ, and Tauxe RV: *Yersinia enterocolitica* O:3 an emerging cause of pediatric gastroenteritis in the United States, J Infect Dis, 1991; 163:660-663.
2. Bottone EJ: *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues, Clin Microbiol Rev, 1997; 10:257-276.
3. Pelludat C, Rakin A, Jacobi CA, Schubert S, and Heesemann J: The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica*: organization and siderophore-dependent regulation, J Bacteriol, 1998; 180:538-546.
4. Cornelis GR., Boland A, Boyd AP, Geuijen C, Iriarte M, Neyt C, Sory MP, and Stainier I: The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome, Microbiol Mol Biol Rev, 1998; 62:1315-1352.
5. Roggenkamp A, Ruckdeschel K, Leitritz L, Schmitt R, and Heesemann J: Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein YadA of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils, Infect Immun, 1996; 64:2506-2514.
6. Shurnik M, El Tahir Y, Saarinen M, Jalakanen S, and Toivanen P: YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* to human intestinal submucosa, Infect Immun, 1994; 62:1252-1261.
7. Ruckdeschel K, Roggenkamp A, Lafont V, Mangeat P, Heesemann J, and Rouot B: Interaction of *Yersinia enterocolitica* with macrophages leads to macrophage cell death through apoptosis, Infect Immun, 1997; 65:4813-4821.
8. Monack DM, Mecsas J, Ghori N, and Falkow S: *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death, Proc Natl Acad Sci USA, 1997; 94:10385-10390.
9. Boland A, Havaux S, and Cornelis GR: Heterogeneity of the *Yersinia* YopM protein, Microb Pathog, 1998; 25:343-348.
10. Persson C, Nordfelth R, Holmström A, Hakansson S, Rosqvist R, and Wolf-Watz H: Cell-surface-bound *Yersinia* translocate the protein tyrosine phosphatase YopH by a polarized mechanism into the target cell, Mol Microbiol, 1995; 18:135-150
11. Cheng LW, Anderson DM, and Schneewind O: Two independent type III secretion mechanisms for YopE in *Yersinia enterocolitica*, Mol Microbiol, 1997; 24:757-765.

12. Iriarte M, and Cornelis GR: Identification of SycN, YscX, and YscY, three new elements of the *Yersinia* Yop virulon, J Bacteriol, 1999; 181:675-680.
13. Sarker MR., Neyt C, Stainier I, and Cornelis GR: The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD, J Bacteriol, 1998; 180:1207-1214.
14. Schlievert PM, Assimacopoulos AP, and Cleary PP: Severe invasive group A streptococcal disease: clinical description and mechanisms of pathogenesis, J Lab Clin Med, 1996; 127:13-22.
15. Adderson EE, Shikhman AR, Ward KE and Cunningham MW: Molecular analysis of polyreactive monoclonal antibodies from rheumatic carditis: human anti-N-acetylglucosamine/anti-myosin antibody V region genes, J Immunol, 1998; 161: 2020-2031.
16. Antone SM, Adderson EE, Mertens NMJ, and Cunningham MW: Molecular analysis of V gene sequences encoding cytotoxic anti-streptococcal/antimyosin monoclonal antibody 36.2.2 that recognizes the heart cell surface protein laminin, J Immunol, 1997; 159:5422-5430.
17. Quinn A, Ward K, Fischetti V, Hemric M, and Cunningham MW: Immunological relationship between the class I epitope of streptococcal M protein and myosin, Infect Immun, 1998; 66:4418-4424.
18. Kefalides NA, Pegg MT, Oho N, Poon-King T, Zabriskie J, and Fillit H: Antibodies to basement membrane collagen and to laminin are present in sera from patients with poststreptococcal glomerulonephritis, J Exp Med, 1986; 163:588-602.
19. Kehoe MA, Kapur V, Whatmore AM, and Musser JM: Horizontal gene transfer among group A streptococci: implications for pathogenesis and epidemiology, Trends Microbiol, 1996; 4:436-443.
20. Müller-Alouf H, Gerlach D, Desreumaux P, Leportier C, Alouf JE, and Capron M: Streptococcal pyrogenic exotoxin A (SpeA) superantigen induced production of hematopoietic cytokines, IL-12 and IL-13 by human peripheral blood mononuclear cells, Microb Pathog, 1997; 23:265-272.
21. McShan WM, Tang YF, and Ferretti JJ: Bacteriophage T12 of *Streptococcus pyogenes* integrates into the gene encoding a serine tRNA, Mol Microbiol, 1997; 23:719-728.
22. Cleary PP, McLandsborough L, Ikeda L, Cue D, Krawczak J, and Lam H: High frequency intracellular infection and erythrogenic toxin A expression undergo phase variation in M1 group A streptococci, Mol Microbiol, 1998; 28:157-167.

23. Berkower C, Ravins M, Moses AE, and Hanski E: Expression of different group A streptococcal M proteins in an isogenic background demonstrates diversity in adherence to and invasion of eukaryotic cells, *Mol Microbiol*, 1999; 31:1463-1475.
24. Courtney HS., Dale JB, and Hasty DL: Host cell specific adhesins of group A streptococci, *Adv Exp Med Biol*, 1997; 418:605-606.
25. Jadoun J, Ozeri V, Burstein E, Skutelsky E, Hanski E, and Sela S: Protein F1 is required for efficient entry of *Streptococcus pyogenes* into epithelial cells, *J Infect Dis*, 1998; 178:147-158.
26. Ozeri V, Rosenshine I, Mosher DF, Fässler R, and Hanski E: Roles of integrins and fibronectin in the entry of *Streptococcus pyogenes* into cells via protein F1, *Mol Microbiol*, 1998; 30:625-637.
27. Fluckiger U, Jones KF, and Fischetti VA: Immunoglobulins to group A streptococcal surface molecules decrease adherence to and invasion of human pharyngeal cells, *Infect Immun*, 1998; 66:974-979.
28. Cleary PP, LaPenta D, Vessela R, Lam H, and Cue D: A globally disseminated M1 subclone of group A streptococci differs from other subclones by 70 kilobases of prophage DNA and capacity for high-frequency intracellular invasion, *Infect Immun*, 1998; 66:5592-5597.
29. Dombek PE, Sedgewick J, Lam H, Ruschkowski S, Finlay BB, and Cleary PP: High frequency intracellular invasion of epithelial cells by serotype M1 group A streptococci: M1 protein mediated invasion and cytoskeletal rearrangements, *Mol Microbiol*, 1999; 31:859-870.
30. Molinari G, Talay SR, Valentin-Weigand P, Rohde M, and Chhatwal GS: The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells, *Infect Immun*, 1997; 65:1357-1363.
31. Ashbaugh CD, Warren HB, Carey VJ, and Wessels MR: Molecular analysis of the role of the group A streptococcal cysteine protease, hyaluronic acid capsule, and M protein in a murine model of human invasive soft-tissue infection, *J Clin Invest*, 1998; 102:550-560.
32. Moses AE, Wessels MR, Zalcman K, Alberti S, Natanson-Yaron S, Menes T, and Hanski E: Relative contributions of hyaluronic acid capsule and M protein to virulence in a mucoid strain of group A *Streptococcus*, *Infect Immun*; 1997, 65:64-71.
33. Proft T, Moffatt SL, Berkahn CJ, and Fraser JD: Identification and characterization of novel superantigens from *Streptococcus pyogenes*, *J Exp Med*, 1999; 189:89-101.