

La patogenia involucrada en las enfermedades diarreicas.

Parte II: El caso de la shigelosis

Raúl Garza-Velasco^{*}, Georgina Rueda-Munguía^{*} y Adriana G. Mejía-Chávez^{*}

^{*}Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM.

INTRODUCCIÓN

En un artículo análogo, publicado en el número anterior de *Infectología*, se pretendió reiterar la enorme trascendencia de las elevadas tasas de morbi-mortalidad asociadas a las enfermedades diarreicas ocasionadas por agentes infecciosos, subrayándose también su negativo impacto desde la perspectiva socio-económica en los países subdesarrollados.

Así mismo, se señalaron las frecuencias de los principales agentes etiológicos en México, haciéndose especial énfasis en que, entre los patógenos de origen bacteriano, las incidencias más elevadas pertenecen a *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET), *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) y *Shigella* las cuales, conjuntamente, ocasionan el 38 % de las enteropatías.

Finalmente, se describieron los más destacados mecanismos de virulencia detectados a la fecha en ECET y ECEP, después de haberse comentado la gran importancia del estudio de dichas temáticas para sentar las bases del diseño e implementación de las futuras medidas preventivas, diagnósticas y terapéuticas, que habrán de adoptarse para combatir al síndrome diarreico.

En ese mismo contexto, el presente trabajo se concentra en el género *Shigella*, habida cuenta que su frecuencia en las enteropatías se ha calculado en un sobresaliente 11 % para nuestro

país -cifra sólomente rebasada por las asociadas a los *Rotavirus* (13 %) y ECET (17 %)- pero, además, debido a que sus factores de virulencia resultan completamente diferentes a los de ECET y ECEP; en este sentido, el objetivo que se persigue es el de ampliar, de la manera más concreta posible, los conocimientos actuales sobre la patogenia implicada en las enfermedades intestinales.

PATOLOGÍA

La shigelosis o disentería bacilar corresponde a una severa enteritis aguda y autolimitada, cuyos principales síntomas son fiebre, tenesmo, calambres abdominales y diarrea mucosanguinolenta. La hipersensibilidad abdominal es más pronunciada en los cuartos inferiores, los ruidos intestinales son frecuentes y, en los casos más graves, la mucosa colónica se torna hiperémica y edematosa, los folículos linfoides aumentan de tamaño, y el exudado fibrinosupurativo da lugar a pseudomembranas grisáceas o amarillentas que recubren al tejido epitelial (1, 2).

Por lo regular, la enfermedad se transmite de persona a persona y por ingestión de alimentos, agua u otras bebidas contaminadas con materia fecal y llega a curar en pocos días, aunque puede prolongarse durante una a cuatro semanas en los niños y ancianos, en quienes la deshidratación, los trastornos del equilibrio ácido-base y el estado de shock llegan a resultar letales. En cuanto a la dosis infectiva, la ingestión de 10 a 200 células del microorganismo son suficientes para reproducir la shigelosis en los voluntarios humanos, lo cual confirma la gran virulencia del agente causal (2).

Las patologías provocadas por *Shigella* pueden cursar de tres maneras: **a)** como disentería clásica, con material fecal inconsistente que contiene sangre, moco y pus; **b)** como diarrea

acuosa sin complicaciones; o c) como diarrea acuosa y disentería. En cualquier caso, la diarrea acuosa suele preceder a la disentería y, en lo general, semeja a las afecciones ocasionadas por *Salmonella*, aunque la shigelosis se limita a la mucosa colónica y al íleon terminal, y su agente etiológico no provoca bacteremias ni invade órganos distantes (1).

La afección es ocasionada indistintamente por las cuatro especies o serogrupos de *Shigella*: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei*; no obstante, en E.U.A. y otros países desarrollados, la mayor parte de los cuadros se debe a esta última y *S. flexneri* es el serogrupo que asciende al segundo lugar. Por otro lado, en los países en vías de desarrollo, *S. flexneri* y *S. dysenteriae* son las especies de mayor prevalencia, aunque el serotipo 1 de la segunda es la de mayores índices de morbi-mortalidad. Cabe mencionar que algunos autores insisten en señalar que las cepas de *Shigella* y las de *E. coli* enteroinvasiva (ECEI) se encuentran tan estrechamente relacionadas que ambas deberían pertenecer a una misma especie (1).

Por último, es importante señalar que una de las principales complicaciones de la shigelosis es el síndrome urémico hemolítico (HUS), correspondiente a una triada de signos clínicos muy severos: anemia hemolítica, falla renal aguda y trombocitopenia, la cual se presenta en un considerable número de pacientes pediátricos entre los cinco y siete días posteriores al ataque de disentería. De hecho, esta entidad clínica representa una de las causas más frecuentes de falla renal en los niños menores de 10 años (3).

El HUS se asocia en forma directa a la toxina Shiga (Stx), cuyo efecto patológico primario se concentra en el endotelio del glomérulo renal, aunque su receptor natural Gb3 también abunda en los enterocitos y eritrocitos. La Stx puede detectarse con relativa facilidad en las heces de

los enfermos, aunque no en el torrente circulatorio, debido probablemente a que sus niveles sanguíneos resultan insuficientes para evidenciarse mediante los ensayos disponibles (3).

PATOGENIA

El estudio de la patogenia asociada a la shigelosis ha representado todo un desafío para los investigadores, en virtud de que el agente etiológico no reproduce las clásicas lesiones humanas en los principales animales de laboratorio; sin embargo, los nuevos recursos de los infectólogos han permitido realizar diversos estudios *in vitro*, según los cuales el microorganismo se adhiere a las células HeLa –neoplásicas de cérvix humano-, provoca que estas últimas lo engloben -por fagocitosis no profesional¹- y, a continuación, escapa del fagosoma para reproducirse en el citoplasma eucariote. Posteriormente, se disemina desde la primera célula invadida hasta las vecinas, sin entrar en contacto con el medio extracelular (4).

Cabe hacer notar que si bien la biología molecular involucradas en la internalización y la diseminación intercelular se han investigado ampliamente en *S. flexneri*, la mayoría de las observaciones aplica para todas las especies del género, e inclusive, para ECEI. En este sentido, la infección de las células HeLa involucra a los siguientes eventos (1, 4):

1. La adhesión bacteriana a la superficie de la célula “blanco”.
2. La entrada (internalización) del bacilo a la célula hospedera.
3. El escape bacteriano del fagosoma para acceder al citoplasma eucariote.
4. La reproducción intracelular del microorganismo.

¹ Se conoce como fagocitosis “no profesional” a la efectuada por las células diferentes a los neutrófilos, monocitos y macrófagos.

5. El desplazamiento del bacilo, vía la polimerización de los filamentos de actina que permanecen unidos a él, hasta llegar a la membrana, en donde provoca la formación de protrusiones, como el evento transicional que antecede a la diseminación intercelular.
6. La lisis de las dos membranas celulares que delimitan el fagosoma de las células invadidas posteriormente, para que el invasor acceda al citoplasma de estas últimas.

.Adherencia, invasión y liberación intracelular. La adherencia del género a las células HeLa se efectúa a través de una proteína bacteriana (IpaD), que funge como “ligando” y cuyos receptores en la célula hospedera son las integrinas $\beta 1$. Éstas no sólo reciben a IpaD, sino también a otras moléculas bacterianas denominadas invasinas; la reacción entre éstas y las integrinas $\beta 1$ desencadenan secuencialmente la reorganización de la actina y, de esta manera, se forman los pseudópodos que engloban a *Shigella* y la “encierran” dentro de un fagosoma, aunque posteriormente el bacilo escapa del saco fagosómico y se multiplica en el citoplasma (5, 6).

Es importante subrayar que los rearrreglos de actina también requieren de la participación de otras tres proteínas producidas por la célula hospedera: la cortactina, la GTPasa rho y la plastina; la primera origina la polimerización de la actina, la segunda es indispensable para la elongación de los filamentos actínicos a partir del núcleo y, la tercera, influye para que ocurra la agrupación de los segmentos elongados, aunque también resulta necesaria para estabilizar las proyecciones del citoesqueleto (4).

FACTORES DE PATOGENICIDAD

El plásmido de virulencia de *Shigella*

Este plásmido de aproximadamente 220 kb resulta esencial en el proceso de invasión; de hecho, las cepas que carecen de él son incapaces de promover su internalización, e inclusive, cuando es transferido experimentalmente a otras especies, se obtienen cepas transformadas capaces de ingresar a las células HeLa. A este respecto, el plásmido de virulencia es fundamental en las siguientes funciones bacterianas (1):

- Invasión del tejido “blanco”, vía la producción de adhesinas e invasinas.
- Diseminación intercelular del invasor.
- Traslado y secreción de diversos factores de virulencia.

La región plasmídica que determina la entrada bacteriana a la célula hospedadora codifica para la síntesis de las proteínas Ipa (por *invasion plasmid antigens*), de su chaperón molecular IpgC y de un sistema de secreción de las Ipa, conocido como Mxi-Spa (por *membrane excretion of Ipa and surface presentation of Ipa*) (6, 7).

Las proteínas IpaA, IpaB, IpaC e IpaD resultan indispensables para la adherencia e invasión de *Shigella*; de hecho, la IpaD funge como la adhesina primaria, en tanto que IpaB e IpaC actúan como invasinas, sólo se les puede detectar en el medio extracelular después del contacto entre el invasor y la célula epitelial, y ambas conforman un complejo extracelular que promueve la internalización bacteriana (7).

Por lo que se refiere al Mxi-Spa, éste corresponde prácticamente a un clásico sistema de secreción proteica tipo III y manifiesta su relevante función hasta que han interactuado las superficies del bacilo y de la célula hospedera; además, incluye la participación de IpgC, para estabilizar a IpaB e impedir que ésta interactúe con IpaC en el citoplasma bacteriano, ya que ello impediría el traslado y la exportación de ambas moléculas (7, 8).

Diseminación intra e intercelular de *Shigella*. Dado que la reorganización de los filamentos actínicos responsables del englobamiento bacteriano continúa llevándose a cabo sobre la superficie de la vesícula fagocitaria que contiene a *Shigella*, es muy probable que mientras ésta escapa hacia el citoplasma hospedero adsorba otros fragmentos de actina y, por ende, que en adelante adquiera el tipo de movilidad Ics (por *intercellular spread*), indispensable para lograr su diseminación hacia las células adyacentes; evidentemente, el Ics se basa en la polimerización de los filamentos de actina unidos al extremo de la bacteria, lo que crea una “cola” similar a la de un cometa, que confiere propulsión al invasor² (9).

Una vez que *Shigella* alcanza la superficie de la célula infectada, ejerce presión sobre la membrana correspondiente y la “empuja” hasta formar una “protrusión” (protuberancia que se inserta en la célula hospedera vecina); posteriormente, ésta es englobada por la célula adyacente, con vistas a generar un fagosoma de dos membranas -la más interna de las cuales proviene de la célula anterior-. Por último, el bacilo se reproduce en el citoplasma de la segunda célula invadida, gracias a que IpaB provoca la destrucción del fagosoma³; en este sentido, cabe agregar que la actividad de IpaB es máxima a pH ácido –como el del interior del

² *Shigella* es clasificada como inmóvil, ya que no posee flagelos ni alguna otra estructura de locomoción.

³ Al diseminarse intercelularmente, *Shigella* no interactúa con el medio extracelular y, por ende, evade al sistema inmune del hospedero –durante lapsos prolongados–.

fagosoma- y que, una vez que la bacteria se encuentra libre en el citoplasma eucariote, es capaz de duplicar su población cada 40 minutos (7, 8, 10).

Invasión de la mucosa del colon. Dado que gran parte de las afirmaciones anteriores ha surgido a partir de observaciones *in vitro* realizadas en células HeLa, es claro que el evento de adhesión resulta diferente en el colon humano; en este aspecto, resalta el hecho de que las integrinas $\beta 1$, receptoras de las adhesinas Ipa, no se localizan en la región apical (luminal) de las células colónicas, sino en su porción basolateral (posterior o contraria a la apical). En tal contexto, no fue sino hasta que se infectaron monos –artificialmente-, cuando se logró detectar que las primeras lesiones aparecían en las placas de Peyer y que la bacteria ingresaba, vía las células M, hasta la región posterior de la mucosa. Análogamente, el efecto lítico provocado por *Shigella* pudo explicarse a través de los siguientes hallazgos (5, 11, 12):

- La infección de los macrófagos asociados a las placas de Peyer desencadena el proceso inflamatorio, induciendo una gran liberación de IL- 1β madura y, secuencialmente, la de citocinas TNF- α e IL-8, las cuales originan el reclutamiento de numerosos PMNs⁴.
- El crecimiento intracelular de *Shigella* provoca que cese la producción de proteínas y que ocurra la muerte celular.
- Cuando *Shigella* se multiplica dentro de la célula eucariote, disminuyen en ésta los niveles de ATP y se incrementan los de piruvato, fenómenos que indican graves alteraciones en el metabolismo celular, ubicados predominantemente en la mitocondria.
- *Shigella* induce apoptosis en los macrófagos⁵.

⁴ Los PMNs son trascendentales en la shigelosis: al interactuar con la bacteria y los tejidos involucrados, excretan elastasa y su contenido lisosomal, con lo cual ocurre una lisis tisular masiva.

Enterotoxina SenA. Según recientes observaciones clínicas, esta toxina también se encuentra codificada por el plásmido de virulencia de *Shigella*, y su aparente función en la shigelosis es la de provocar las evacuaciones líquidas que anteceden a la diarrea disenteriforme (13).

Toxina de Shiga (Stx)

Las principales características de la Stx -la toxina más potente de *Shigella*-, son: **a)** los genes cromosómicos *stx* codifican para su síntesis; **b)** sólo es excretada al medio cuando el bacilo ha sido lisado; **c)** como otras toxinas A-B, presenta una subunidad A y cinco subunidades, si bien su receptor es el glicolípido Gb3 y no el gangliósido G_{M1}; y **d)** la Stx penetra en las células intestinales por endocitosis y les inhibe su síntesis proteica: en concreto, inactiva a la subunidad ribosómica 60S, incorporándose a los residuos N-glicosídicos, con lo que genera una estructura en forma de asa que impide la unión del aminoacil-tRNA al ribosoma y, por ende, bloquea la elongación de la proteína en proceso de formación. Además, la Stx exhibe las siguientes actividades tóxicas en algunos modelos experimentales (13):

- Actúa como enterotoxina en las asas ileales de conejo, provocando la pérdida de fluidos.
- Presenta actividad neurotóxica en ratones y conejos -a los cuales causa parálisis- y evidencia características de citotoxina al adicionarse a cultivos de células de mamífero.
- Induce apoptosis de las células epiteliales.

Por otra parte, cabe reiterar la relación directa de la Stx con el HUS, ya que la primera genera las lesiones de los vasos sanguíneos y otros tejidos afectados, lo cual explica ciertos cambios

⁵ Las células humanas tienen una vida media corta y su muerte depende de la apoptosis o muerte celular programada, caracterizada por la condensación de la cromatina y la ruptura del DNA.

histológicos que aparecen en el colon de los humanos y primates que padecen de disentería. El papel protagónico de la Stx en el HUS se ha deducido a partir de los siguientes hallazgos (13):

- Las cepas de *Shigella* que causan HUS manifiestan una notable producción de toxina Shiga, en comparación con los aislamientos ajenos a dicha enfermedad.
- Las cepas de *E. coli* causantes de HUS sintetizan una toxina casi idéntica a la Stx.
- Igual que los LPS bacterianos, la Stx también estimula la secreción de citocinas IL-1 y TNF α , las cuales actúan en forma sinérgica para matar células endoteliales humanas y generar el daño vascular clásico del HUS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Noriega FR, Liao FM, Maneval DR, Ren S, Formal SB and Levine M: Strategy for cross-protection among *Shigella flexneri* serotypes, *Infect & Immun*, 1999; 67(2): 782-788.
2. Sirivichayakul C and Thisyakorn U: Severe shigellosis in childhood, *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 1998; 29(3): 555-559.
3. Azim T, Rashid A, Qadri F, Sarker MS, Hamadani J, Salam MA, Wahed MA and Albert MJ: Antibodies to Shiga toxin in the serum of children with *Shigella*-associated haemolytic uraemic syndrome, *J Med Microbiol*, 1999; 48(1):11-16.
4. Nhieu GT and Sansonetti PJ: Mechanism of *Shigella* entry into epithelial cells, *Curr Opin Microbiol*, 1999; 2(1): 51-55.
5. Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, Adak GK and Levine MM: Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies, *Bull World Health Organ*, 1999; 77(8): 651-66.
6. Mounier J, Bahrani F and Sansonetti P: Secretion of *Shigella flexneri* Ipa invasins on contact with epithelial cells and subsequent entry of the bacterium into cells are growth stage dependent, *Infect & Immun*, 1997; 65: 774-782.
7. Menard R, Prevost MC, Gounon P, Sansonetti P and Dehio C: The secreted Ipa complex of *Shigella flexneri* promotes entry into mammalian cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996; 93: 1254-1258.

8. Hilbi H, Moss JE, Hersh D, Chen Y, Arondel J, Banerjee S, Flavell RA, Yuan J, Sansonetti PJ and Zychlinsky A: *Shigella*-induced apoptosis is dependent on caspase – 1 which binds to IpaB, *J Biol Chem*, 1998; 273: 32895-32900.
9. Egile C, d’Hauteville H, Parsot C and Sansonetti P J: SopA, the outer membrane protease responsible for polar localization of IcsA in *Shigella flexneri*, *Mol Microbiol*, 1997; 23: 1063-1073.
10. Allaoui A, Mounier J, Prévost M C, Sansonetti P J and Parsot C.: *icsB*: a *Shigella flexneri* virulence gene necessary for the lysis of protrusions during intercellular spread, *Mol Microbiol*, 1992; 6: 1605-1616.
11. Way SS, Goldberg MB, Borczuk AC and Dominitz R: An essential role for gamma interferon in innate resistance to *Shigella flexneri* infection, *Infect & Immun*, 1998; 66: 1342-1348.
12. Sansonetti D, Arondel PJ, Huere M, Harada A and Matsushima K: Interleukin-8 controls bacterial transepithelial translocation at the cost of epithelial destruction in experimental shigellosis, *Infect & Immun*, 1999; 67:1471-1480.
13. Louise CB and Obrig TG: Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: combined cytotoxic effects of shiga toxin and lipopolysaccharide (endotoxin) on human vascular endothelial cells *in vitro*, *Infect & Immun*, 1992; 60: 1536-1543.