

TEMA 14:

GÉNERO CLOSTRIDIUM



AUTORES:

Clara Llorente González
Elena Martínez Blanco
Marta Torrecilla Parra

Microbiología clínica

Grado en Bioquímica

Departamento de Biología Molecular

U. A. M. © 2015



FACULTAD DE
CIENCIAS



ÍNDICE

1. Introducción	3
1.1 El botulismo en animales	4
1.2 El botulismo en humanos	6
2. Características de las neurotoxinas	9
3. Aspectos estructurales de las neurotoxinas <i>clostridiales</i>	9
3.1 Estructura de la cadena L	11
4. Mecanismo de acción de las neurotoxinas	12
4.1 Actividad metaloproteasa	12
5. Unión, internalización y transporte de las neurotoxinas	14
5.1 Receptores para neurotoxinas	16
6. Significado evolutivo de las neurotoxinas	20
7. Métodos de prevención y vacunas	20
7.1 Tétanos	21
7.2 Botulismo	22
8. Las toxinas de <i>Clostridium</i> como agentes terapéuticos	24
8.1 BoNT	24
8.2 TeNT	26
9. Referencias	26

1. INTRODUCCIÓN.

Las bacterias que constituyen el género *Clostridium* son bacilos gram-positivos (Fig 1), esporulados y anaerobios estrictos. Los clostridios forman parte de la flora del hombre y de los animales y se encuentran ampliamente difundidos en el terreno a causa de la alta resistencia a los agentes externos que les proporcionan las esporas.

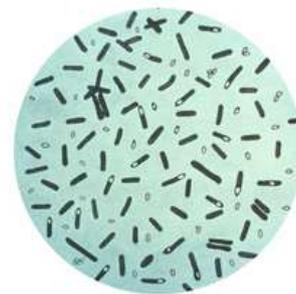


Figura 1. *Clostridium botulinum* al microscopio.

La amplia distribución de los clostridios en la naturaleza provoca que contaminen heridas con elevada frecuencia pero, al carecer de poder invasivo, los casos de infecciones clínicas son escasos.

Las especies más importantes, de interés clínico, ejercen su acción patógena mediante toxinas elaboradas por ellas mismas que, en algunos casos, tienen un elevadísimo poder tóxico. Entre las eubacterias, los clostridios producen más toxinas proteicas que ningún otro género de bacterias.

De acuerdo con los cuadros clínicos que producen, los clostridios se pueden dividir asimismo en cuatro grupos:

1. **Clostridios neurotóxicos:** Generan toxinas que ejercen su acción nociva en el tejido nervioso. Ejemplos: *C. tetani* y *C. botulinum*.

2. **Clostridios histotóxicos.** Son aquellos que producen daño en múltiples tejidos gracias a sus toxinas. Los más importantes son *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. bifermentans* y *C. histolyticum*.

3. **Clostridios enterotóxicos:** Producen enterotoxinas, proteínas de cadena simple no ramificada muy resistentes al calor, por lo que son capaces de resistir a las medidas higiénicas habituales. Como ejemplos de estos clostridios encontramos *C. perfringens* (tipo A y C) y *C. difficile*

4. **Clostridios piógenos.** Dan lugar a cuadros purulentos, a menudo de etiología polimicrobiana. Son procesos idénticos a los producidos por otras bacterias anaerobias, con las que suelen estar asociados. En este tipo de infecciones, las toxinas no desempeñan papel patogénico alguno. Las especies aisladas más frecuentemente son *C. perfringens* y *C. ramosum*.



Figura 2. *C. perfringens*, *C. tetani*, *C. difficile*

Este capítulo está centrado en las neurotoxinas producidas por patógenos del género *Clostridium*.

El botulismo y el tétanos son enfermedades de humanos y animales que se caracterizan por desórdenes neurológicos específicos. Estas enfermedades se conocen desde la antigüedad.

El **tétanos** se caracteriza por una parálisis espasmódica generalizada, que suele tener un desenlace fatal por colapso cardíaco e insuficiencia respiratoria. Incluso en caso de que el enfermo supere la fase aguda, las secuelas neuronales son permanentes.

El **botulismo**, por el contrario, da lugar a una parálisis flácida que conlleva debilidad muscular y dificultad en los movimientos. Se acaba por perder el control de los músculos voluntarios. La mortalidad por botulismo, aunque elevada, es inferior a la del tétanos y es causada por parálisis de los músculos respiratorios.

La **neurotoxina botulínica** (BoNT) y la **neurotoxina tetánica** (TeNT) causan todos los síntomas del botulismo y del tétanos, respectivamente. La patología de los clostridios neurotoxigénicos es el modelo más sencillo de patogenidad bacteriana. Una bacteria produce una toxina que induce todos los desórdenes específicos de la enfermedad y la muerte.

1.1. El botulismo en animales

El botulismo afecta fundamentalmente a animales salvajes (y también domésticos); además, las epidemias de botulismo se pueden expandir con rapidez, pudiendo producir la intoxicación de cientos de miles de animales en pocos días (Figura 3).



Figura 3. Distribución geográfica de los casos sospechosos de botulismo humano (n = 35) enviados al Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III) para su estudio durante el período 2010-2011

El ciclo de transmisión de los clostridios toxigénicos en la naturaleza comienza con el crecimiento de las formas vegetativas en material en descomposición y la liberación de BoNTs vía autólisis. El material orgánico infectado es ingerido por invertebrados insensibles a BoNT, tales como los gusanos, almejas y distintas larvas. Cuando estos invertebrados son ingeridos por peces, pájaros y otros animales vertebrados, que son sensibles a la toxina, les producirán parálisis y, eventualmente, les causarán la muerte (Fig. 4). Los cadáveres se convertirán ahora en un nicho adecuado para, por un lado, el crecimiento de la bacteria, y por otro, el desarrollo de larvas de invertebrados. Hay que tener en cuenta que muchos vertebrados tienen en su microbiota intestinal *C. botulinum* neurotoxigénico. Como resultado, se puede producir la muerte de muchos animales vertebrados a partir de un foco de infección. Además, el consumo de los cadáveres por animales carroñeros puede contribuir a la expansión del botulismo.

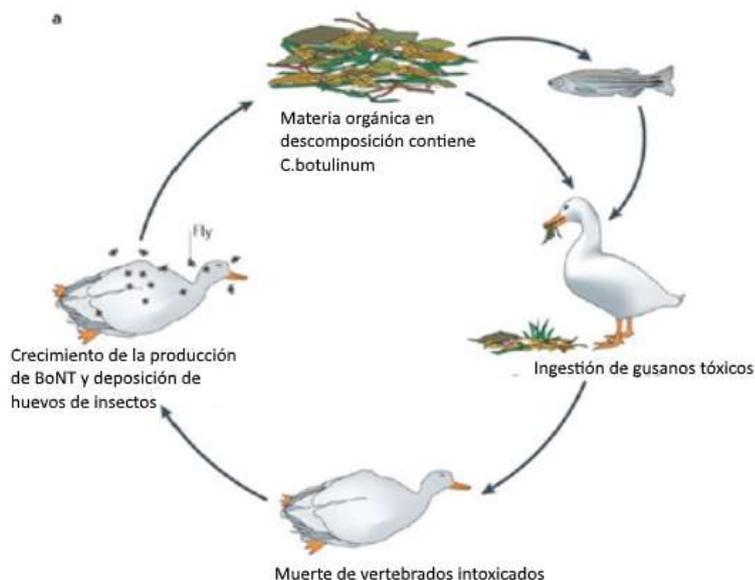


Figura 4. Botulismo en animales. Principalmente afecta a animales domésticos y salvajes, y comienza con el crecimiento de *Clostridium toxigénico* en material anaeróbico en descomposición, seguido de la liberación de la toxina. Este material infectado es consumido por invertebrados insensibles a la neurotoxina botulínica, los cuales diseminan la bacteria y la toxina a vertebrados. Los cadáveres de animales intoxicados proporcionan un ambiente anaerobio que permite la proliferación de la bacteria. La deposición de huevos de insectos conduce al crecimiento de muchas larvas intoxicadas, que serán comidas por pájaros o peces, generando un ciclo que puede involucrar rápidamente a muchos otros peces y pájaros. *Modificada de Rossetto et al. (2014)*

1.2. El botulismo en humanos

El botulismo en humanos es mucho más raro que en animales. Se distinguen cinco formas de enfermedad, de acuerdo con la ruta de entrada de la toxina (Fig. 5).

El **botulismo alimentario** se produce como consecuencia de la ingestión de alimentos contaminados con BoNT (frecuentemente alimentos enlatados). La toxina es capaz de resistir el ambiente proteolítico del tracto gastrointestinal hasta llegar al intestino, donde va a ser absorbida.

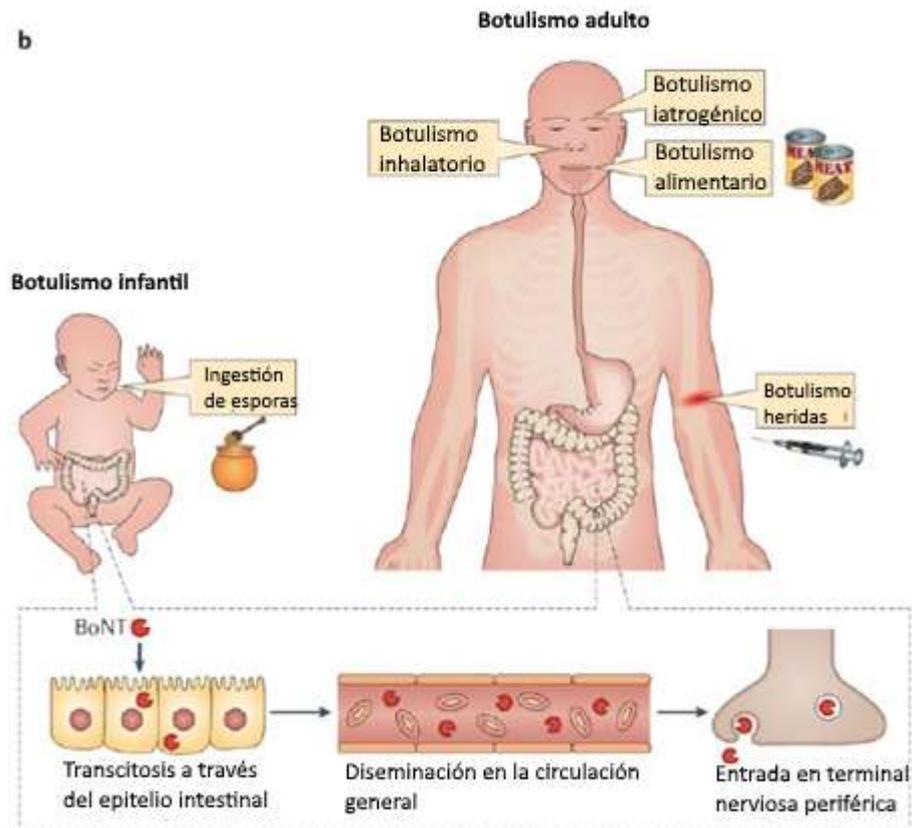


Figura 5. Botulismo en humanos. Hay 5 formas, las dos más comunes son la alimentaria, que ocurre por la ingestión de alimentos que contienen BoNT, normalmente conservas, y la infantil, causada por la ingestión de alimentos contaminados con esporas que germinan en el tracto gastrointestinal. En el intestino infantil, la bacteria tiene potencial para proliferar debido a la baja competencia de la microbiota residente, ya que es menos robusta en los niños. Las otras tres formas de botulismo humano son más raras e incluyen el botulismo inhalatorio (transmisión por aerosoles), iatrogénico (causado por la inyección de dosis clínicas excesivas de BoNT), y por la contaminación de heridas. La toxina cruza el epitelio intestinal mediante transcitosis y entra en la circulación general, alcanzando de manera general los terminales nerviosos colinérgicos. Esto provoca una parálisis flácida, síntoma clínico de la enfermedad. *Modificada de Rossetto et al. (2014)*

El **botulismo infantil**, que afecta a niños menores de 1 año, es producido por contaminaciones alimentarias en las que hay esporas de *Clostridium*. Como la microflora de los niños pequeños está pobremente desarrollada, las esporas de *C. botulinum* pueden germinar y dar lugar a una población productora de toxinas en el intestino. Puede ser causa de muerte súbita. La colonización de los niños ocurre con mayor frecuencia que en los adultos debido a que el microbiota de los niños es menor y el clostridio toxigénico encuentra menos competencia microbiana.

En el botulismo alimentario o en el infantil, las BoNTs cruzan la barrera intestinal y llegan a la circulación. Su blanco son los terminales nerviosos colinérgicos, en los que van a producir la parálisis (Fig. 5).

El **botulismo adquirido por heridas** es el resultado de la contaminación de tejidos por esporas, y se produce fundamentalmente en personas que se inyectan drogas. El **botulismo iatrogénico** ocurre en personas que han sido expuestas a cantidades excesivas de BoNTs en tratamientos cosméticos o terapéuticos.

En estos dos tipos de botulismo, frente a los relacionados con contaminaciones alimentarias, se requiere menor cantidad de toxina, dado que no precisa ser absorbida por vía intestinal. Estudios en animales indican que, para producir la enfermedad, se requiere entre 100-1000 veces menos toxina cuando esta es inoculada directamente en la circulación que cuando se administra de forma oral.

Por último encontramos el **botulismo inhalatorio**, que se produce cuando la toxina entra por la vía respiratoria.

El botulismo alimentario y el botulismo infantil son las formas más frecuentes de botulismo en humanos, mientras que las otras formas se producen de forma muy infrecuente (Fig 6).

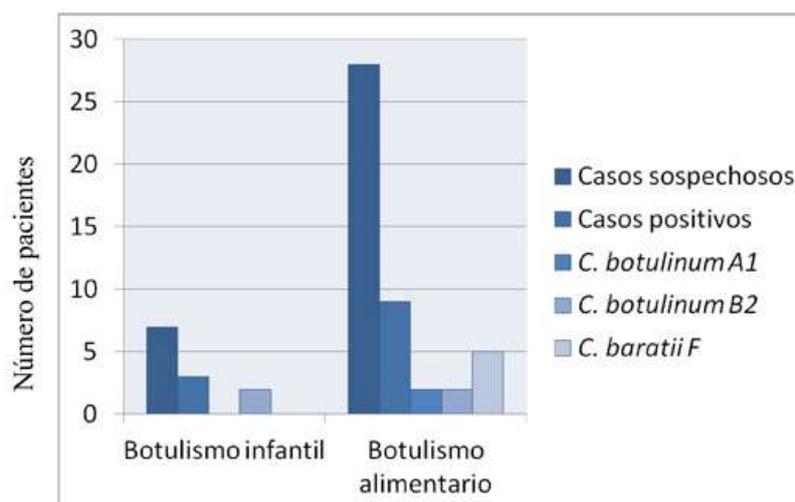


Figura 6. Distribución de los casos sospechosos, de los casos positivos directos e indirectos (pacientes con clínica de botulismo y determinaciones de laboratorio negativas incluidas en episodios de brote con pacientes positivos), y de los tipos detectados en España (Fuente: CNM del ISCIII).

2. CARACTERÍSTICAS DE LAS NEUROTOXINAS.

Las neurotoxinas tetánica y botulínica son las sustancias más tóxicas conocidas: la LD₅₀ en ratón de preparaciones altamente purificadas está entre 0,1 y 1 ng/kg.

Bloquean la liberación de neurotransmisores tanto en el sistema nervioso periférico (BoNT) como en el central (TeNT).

Esta tremenda potencia deriva de dos características esenciales de estas toxinas bacterianas:

1. Su absoluta **neuroespecificidad**. Al concentrar su acción sobre un número limitado de células, cuya completa funcionalidad es esencial para la supervivencia de los vertebrados, las neurotoxinas conducen a la muerte del animal con una cantidad mínima de moléculas tóxicas. La base de su especificidad celular reside en los receptores sobre los que actúan, que se encuentran presentes únicamente sobre las células neuronales.
2. Su **actividad catalítica intracelular**. Las neurotoxinas clostridiales son enzimas que actúan en el citosol de la neurona sobre proteínas blanco muy concretas.

3. ASPECTOS ESTRUCTURALES DE LAS NEUROTOXINAS CLOSTRIDIALES.

Todas las neurotoxinas clostridiales son sintetizadas como cadenas polipeptídicas inactivas de 150 kDa con una secuencia "leader" y así son liberadas presumiblemente mediante lisis bacteriana.

Las proteasas bacterianas o tisulares rompen estas toxinas y generan las neurotoxinas activas bicatenarias compuestas de una cadena pesada (H, 100 kDa) y una cadena ligera (L, 50 kDa) unidas por un puente disulfuro (Fig. 7, Fig. 8). El puente disulfuro desempeña un papel crítico en la penetración celular, y su rotura mediante reducción suprime la toxicidad de la neurotoxina.

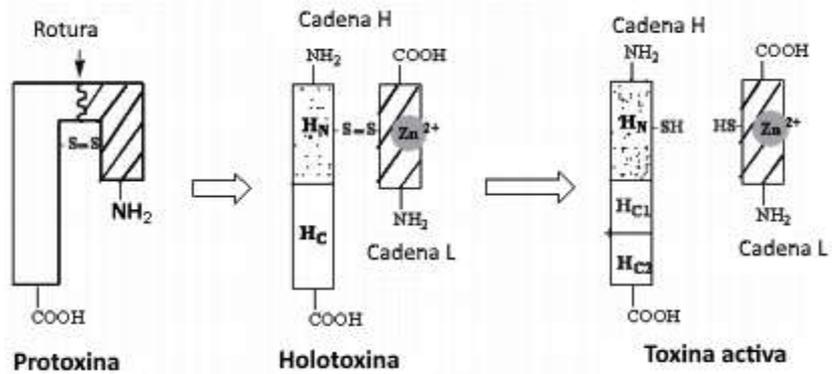


Figura 7. Esquema de la estructura y mecanismo de activación de las neurotoxinas de *Clostridium*. Esas toxinas son sintetizadas como un único polipéptido inactivo de 150 kDa compuesto por 3 dominios de 50kDa cada uno, los cuales tienen diferentes papeles en la intoxicación de la célula nerviosa. Estos tres dominios están conectados por lazos sensibles a proteasas. La toxina comienza a ser activa una vez se produce el corte proteolítico selectivo, llevado a cabo por varias proteasas, lo que genera dos cadenas. El dominio Hc es responsable de la unión celular. La cadena L bloquea la neuroexocitosis gracias a la actividad Zn-endopeptidasa específica para tres componentes del aparato neuroexocítico.

El dominio L es la parte catalítica, responsable del bloqueo de la neuroexocitosis. El dominio Hn, los 50-kDa N-terminales de la cadena H, parecen estar implicados en la traslocación al interior celular. El dominio Hc, los 50-kDa C-terminales de la cadena H, es responsable de la unión neuroespecífica. En este dominio existen varios sitios de unión a oligosacáridos, lo que sugiere que los receptores para TeNT y BoNTs van a contener carbohidratos.

Una vez que la neurotoxina está dentro de las células nerviosas tiene lugar la reducción del puente disulfuro y la liberación de la actividad asociada a la cadena L, que actúa bloqueando la neuroexocitosis.

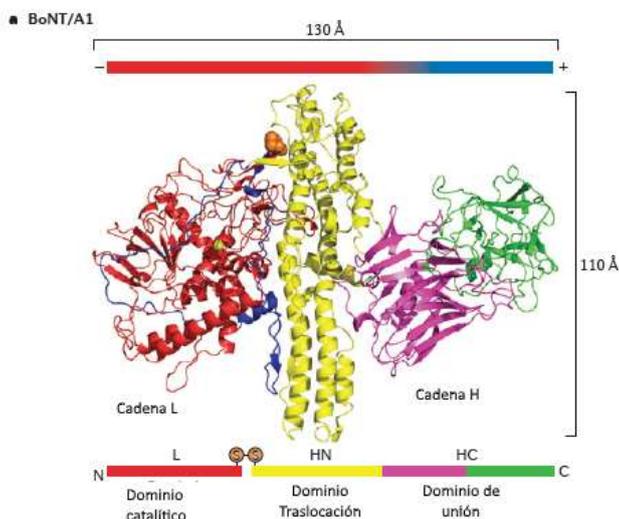
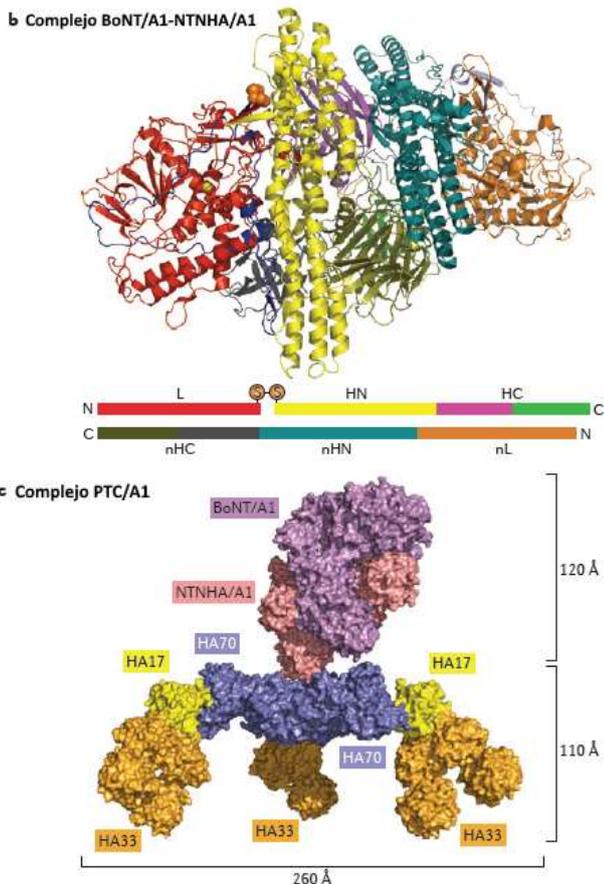


Figura 8. Estructura de moléculas BoNT aisladas y formando el complejo. (a) Estructura cristalina de BoNT/A1, mostrando su dipolo eléctrico asociado y la organización de los dominios individuales, cada uno de los cuales tiene una función específica en la intoxicación celular. Un péptido cinturón (azul oscuro) rodea el dominio L y el enlace disulfuro intercatenario (naranja), además de unir la cadena L al dominio HN. Esto



también está presente en BoNT/B1 y BoNT/E1. (b) Estructura cristalina de BoNT/A1 formando un complejo con la proteína NTNHA/A1, la cual se ha sugerido que protege a la toxina de proteasas y otros agentes dañinos que la toxina encuentra en el ambiente *ex vivo* y en el tracto gastrointestinal. (c) Estructura del precursor del complejo toxina (PTC), el cual contiene el heterodímero anterior acomplejado a PTC/A1. Hay 6 proteínas HA33, 3 HA17 y 3 HA70 en cada complejo. PTC/A1 forma tres ramas que tienen un pequeño contacto proteína-proteína con NTNHA/A1, pero no con la toxina. Esta estructura sugiere que la función de las proteínas hemaglutininas en la unión al epitelio intestinal es facilitar la absorción de la toxina, en lugar de proteger a BoNT del ataque de proteasas. Modificada en base a Rossetto et al (2014).

El gen codificante para la BoNT se encuentra junto al gen codificante para la proteína NTNHA (“non-toxic non-haemagglutinin”). Se ha visto que ambas proteínas NTNHA y BoNT se pliegan de una forma muy parecida e interaccionan entre ellas como si fueran dos manos entrelazadas (Fig. 8). Se ha sugerido que la función de la proteína NTNHA podría ser la de proteger a BoNT en su tránsito intestinal u en otros ambientes inhóspitos. También se ha sugerido que puede contribuir a una mejor absorción intestinal.

3.1. Estructura de la cadena L.

La cadena L está compuesta de alrededor de 450 aminoácidos, su número preciso depende de los serotipos y del sitio exacto de rotura. Las cadenas L de TeNT y BoNTs presentan segmentos homólogos. El segmento más conservado está localizado en la mitad de la cadena L y consta de 19 residuos (Fig. 9). Contiene el motivo de unión a Zinc His-Glu-Xaa-Xaa-His de las zinc-endopeptidasas, incluyendo el residuo glutámico directamente involucrado en catálisis. Las histidinas están involucradas en la coordinación con el Zn, lo que sugiere que este átomo juega un papel catalítico en lugar de estructural.

Clostridium produce una variedad de Zn endopeptidasas, y, ciertas observaciones apuntan a especular que sus neurotoxinas han surgido por fusión de un gen codificante para una metaloproteasa con la de una proteína altamente específica para la unión a la membrana presináptica. La actividad metaloproteasa, situada en la cadena L, podría entonces ser liberada dentro de la célula neuronal y actuar sobre un enlace peptídico específico de un componente que interviene en el control de la liberación de neurotransmisores.

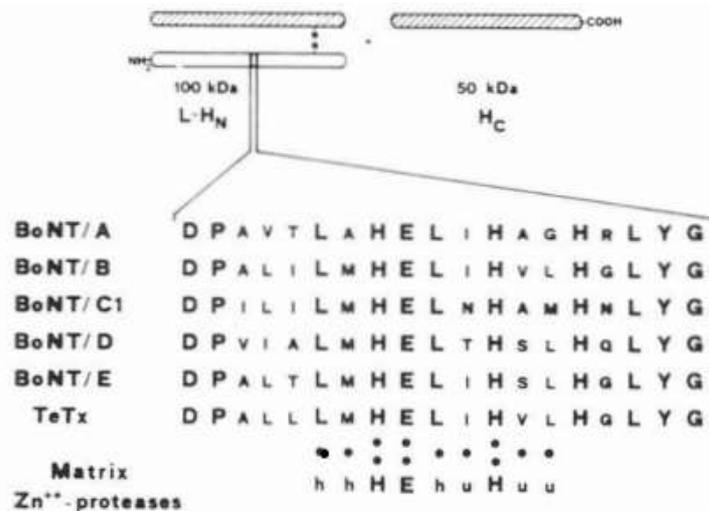


Figura 9. Estructura esquemática de las neurotoxinas de *Clostridium* y comparación de secuencia de sus segmentos ricos en histidina con el motivo de unión a Zn de metaloendopeptidasas. Las neurotoxinas son producidas como una sola cadena, que es cortada posteriormente por proteasas en un loop expuesto para generar las dos cadenas activas de la toxina. La cadena H puede ser además cortada con pepsina generando el fragmento Hc de 50Kda. El segmento más conservado de la secuencia de BoNT/A/B/C/D y E y de TeNT, localizado en la parte central de la cadena L, alineado y muestra el motivo de unión a Zn de metaloproteasas de la matriz.

4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS NEUROTOXINAS.

Tanto la toxina tetánica como la botulínica son inhibidores potentes de la liberación de neurotransmisores.

4.1. Actividad metaloproteínasa.

La TeNT y las BoNTs son zinc-endopeptidasas específicas para componentes proteicos del aparato neuroexocítico. Esta capacidad de inhibir la liberación de neurotransmisores se debe a que estas toxinas son capaces de cortar algunas de las proteínas implicadas en la fusión de vesículas sinápticas con la membrana.

Existen siete serotipos de BoNTs, designados con las letras desde la A hasta la G, mientras que sólo existe un serotipo de TeNT. TeNT y BoNT/B, /D, /F y /G actúan sobre el mismo blanco intraneuronal, ellas rompen VAMP (“vesicle-associated membrane protein”), también llamada sinaptobrevina, una proteína de membrana de las vesículas sinápticas. Como variación, BoNT/A, /C y /E actúan sobre proteínas de la membrana presináptica: BoNT/A y /E rompen SNAP-25, mientras que el serotipo /C rompe la syntaxina (Fig. 10).

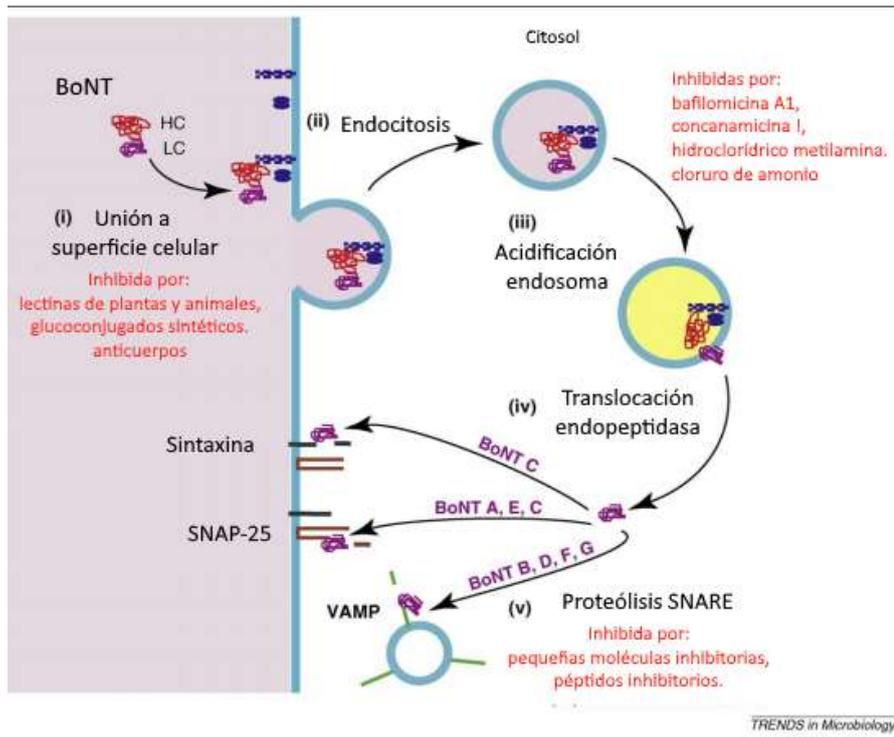


Figura 10. Esquema de la acción de BoNT. (I) BoNT se une al receptor en la superficie neuronal, y (II), es seguidamente internalizada a través de endocitosis. (III) Tras la acidificación endosomal, (IV) la cadena L endopeptidasa se transloca al citosol, (V) donde corta el sustrato SNARE. Dependiendo del serotipo particular de la toxina, las dianas estarán en la membrana plasmática (syntaxina, SNAP-25) o en la vesícula sináptica (VAMP). El corte de esas proteínas bloquea la formación del complejo SNARE, conduce a la inhibición de la liberación del neurotransmisor y sus efectos neurotóxicos. Se indican además los inhibidores de la acción de BoNT en los diferentes pasos. *Adaptada de Mollaaghababa Hakami et al. (2010)*

VAMP, SNAP-25 y syntaxina, junto a otras proteínas citosólicas, forman un complejo multiproteico 20S (conocido como SNARE) y se ha propuesto que este complejo multiproteico media el transporte de vesículas y su fusión en la terminal sináptica. Aunque estas neurotoxinas pudieran actuar sobre otras proteínas, VAMP, SNAP-25 y syntaxina son los blancos principales de la actividad intraneuronal de estas neurotoxinas in vivo, y su rotura proteolítica está unida al bloqueo de la liberación de neurotransmisores.

Aunque TeNT y BoNTs son proteasas con especificidad de secuencia en su corte, producen el corte tras reconocer la estructura terciaria de sus blancos más que la secuencia primaria. Esto se deduce del hecho de que en varios casos las neurotoxinas rompen un enlace peptídico y dejan intactos idénticos enlaces en otras partes de la secuencia de la proteína blanco.

En resumen, las neurotoxinas producidas por los clostridios y responsables del tétanos y el botulismo forman un nuevo grupo de zinc-endopeptidasas que poseen una serie de propiedades peculiares:

a) Se producen como precursores inactivos que son activados mediante proteólisis específica seguida por reducción de un enlace disulfuro.

b) Actúan en el citosol celular y son muy específicas en términos de proteína blanco y del enlace peptídico que rompen.

c) Rompen la molécula blanco plegada pero no hidrolizan péptidos que contengan el sitio de rotura y, por ello, son más bien proteinasas conformacionales que proteinasas secuenciales.

5. UNIÓN, INTERNALIZACIÓN Y TRANSPORTE DE LAS NEUROTOXINAS.

Aunque muchos de los detalles quedan aún por ser determinados, se acepta que las neurotoxinas clostridiales interaccionan con receptores de membrana y son translocados dentro del citosol donde actúan bloqueando la liberación de neurotransmisores.

Las **BoNT** alcanzan las terminales nerviosas en la unión neuromuscular (Figs. 11 y 12), donde se une a la membrana neuronal, se mueve al citoplasma del terminal axónico y actúa bloqueando la transmisión **sináptica excitatoria** (bloquea la liberación de acetilcolina), conduciendo a la parálisis flácida.

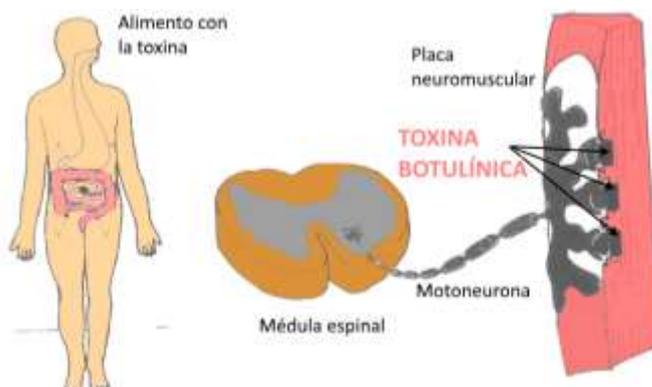


Figura 11: Entrada al organismo de la BoNT.

La **TeNT** también es tomada por las terminaciones nerviosas en la unión neuromuscular pero no actúa en ese sitio (Figs. 11 y 12). En cambio, TeNT es transportada en un compartimento vesicular dentro de axones motores durante una distancia considerable, quizás 1 m, hasta el cuerpo de las neuronas motoras dentro de la cuerda espinal. Allí, la toxina sale de la motoneurona, siendo liberada al espacio intersináptico entre motoneurona y neurona inhibidora, penetra en esta última y bloquea la liberación de neurotransmisores. Así, TeNT parece actuar preferencialmente sobre las **sinapsis inhibitorias**, causando desinhibición motora, lo que conduce a una parálisis espásmica. En

aquellas sinapsis en las que actúa, la toxina sale de su compartimento membranoso y actúa en el citosol para bloquear la liberación del neurotransmisor.

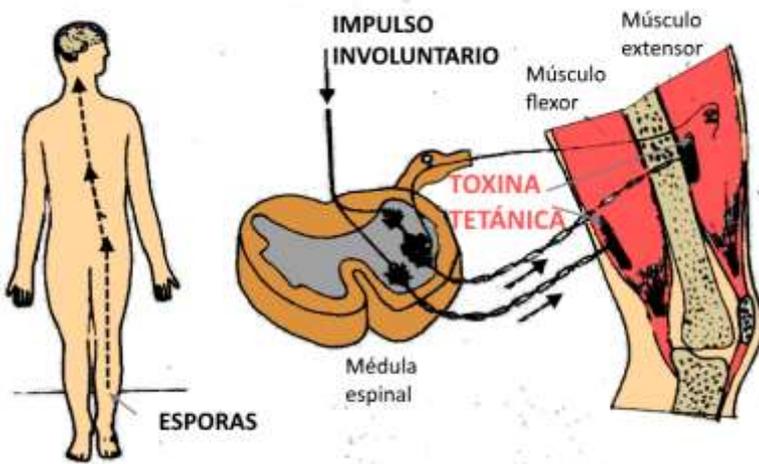


Figura 12: Entrada al organismo de la TeNT

Figura 13: Vista esquemática de una motoneurona de mamíferos y una interneurona inhibitoria. Se muestran los sitios de acción de la toxina del tétanos (TeNT, verde) y la toxina botulínica (BoNT, azul) junto a su ruta específica de tráfico intracelular. En la unión neuromuscular, BoNTs son internalizadas en compartimentos endosomales sinápticos, uno de los cuales podría coincidir con vesículas sinápticas.

Por el contrario, TeNT sigue una vía de transporte retrógrado dentro de la motoneurona, en el que intervienen microtúbulos (marrón) y microfilamentos de actina (rojo).

Las cruces rojas indican los sitios preferenciales donde las toxinas inhiben la liberación de neurotransmisores. Adaptado de Lalli et al (2003).



5.1. Receptores para neurotoxinas.

En su entrada, estas neurotoxinas parasitan el proceso fisiológico de reciclado de vesículas sinápticas. De hecho, las toxinas se unen a la cara interna de las vacuolas sinápticas durante su exposición al medio externo, y son internalizadas mediante endocitosis vesicular (Fig. 15).

TeNT y BoNTs se unen a **polisialogangliósidos** (PSGs), muy abundantes en la membrana presináptica de las neuronas; en cambio, las toxinas muestran una actividad reducida en neuronas en las que la síntesis de gangliósidos ha sido inhibida. La interacción es de muy alta afinidad; así, por ejemplo, las toxinas BoNT tienen afinidades en el rango nM para los disialo (GD1b) y trisialo-gangliósidos (GT1bs).

Sin embargo, su absoluta neuroespecificidad y la falta de competición en la unión entre TeNT y BoNTs hacen improbable que los polisialogangliósidos sean los únicos reconocidos en la superficie de la neurona.

Se ha propuesto un **modelo de "receptor dual"** que propone que las neurotoxinas interactúan con ambos los gangliósidos y una proteína. El complejo de neurotoxina-gangliósido, formado primero, interactuaría con un receptor proteico específico para cada toxina individual. La formación de este complejo trimérico conduciría a la internalización de la neurotoxina.

De acuerdo con el modelo de receptor doble, se han identificado proteínas que pudieran ser los co-receptores específicos para las neurotoxinas clostridiales. Así, se ha identificado que tras la unión a los PSGs, BoNT/B y BoNT/G se unen al dominio, situado en la cara luminal de la vesícula sináptica, de **sinaptotagmina (Syt)**. Por su parte, BoNT/A, BoNT/E y BoNT/F se unen a dominios luminales de la **proteína transmembrana SV2** de la vesícula sináptica (Fig. 15).

Curiosamente, el dominio de unión de la región C-terminal de BoNT/A (dominio HC) es homólogo al factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), haciéndolo un posible ligando para el receptor (FGFR). Se ha visto que el FGFR3 tiene una alta afinidad por este serotipo en células neuronales, y la unión provoca la fosforilación del receptor de la misma forma que lo haría el ligando nativo.



Fig. 14 Diferentes receptores para cada toxina en el proceso de internalización

Así, Syt y SV2 son proteínas integrales de la membrana de la vesícula sináptica y exponen los sitios de unión a las BoNT al lumen de la vesícula sináptica (Fig. 15). Por tanto, contrario a lo que ocurre con los PSGs, estos receptores no están expuestos en la superficie de las terminales nerviosas, y sólo estarán accesibles para la toxina tras la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana presináptica. En ese momento, la toxina interacciona con su receptor y se va a servir del proceso endocítico subsiguiente para entrar en la célula y producir su intoxicación.

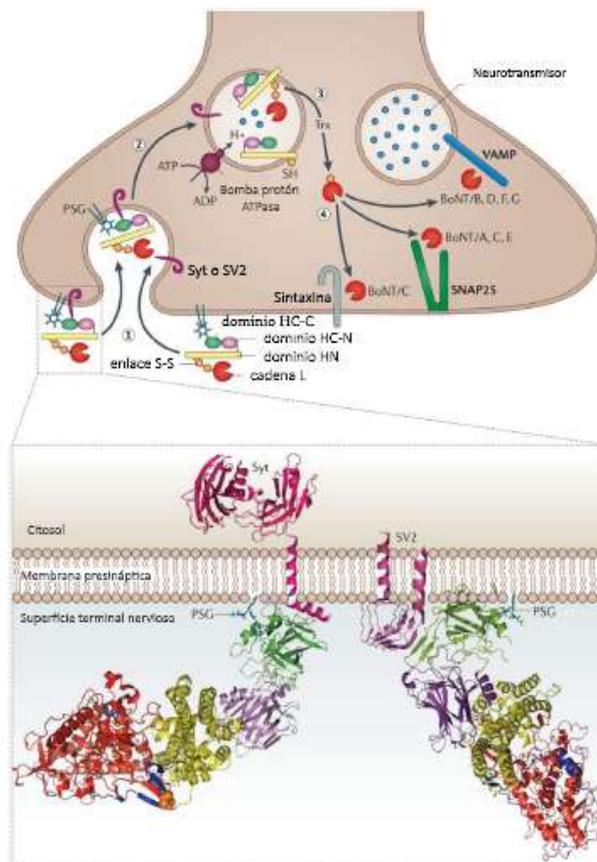


Figura 15: Unión y tráfico de BoNT en terminales nerviosas. La intoxicación empieza con la unión del extremo C-terminal del dominio HC a un receptor PSG, presente en la membrana presináptica, seguido de la unión a un receptor proteico (Syt o SV2) que está localizado dentro de la vesícula sináptica excitada o en la membrana presináptica (paso 1). La estructura cristalina de la BoNT/B unida a PSG y Syt se muestra en la parte inferior izquierda, y la estructura cristalina de BoNT/A unida a PSG y SV2 en la parte inferior derecha. La BoNT es luego endocitada dentro de la vesícula sináptica (paso 2) donde va a localizar la bomba protón ATPasa vesicular, implicada en la re-captura del neurotransmisor. Debido a la acidificación de la vesícula, BoNT resulta protonada, lo que favorece la translocación de la cadena L a través de la membrana vesicular (paso 3) al citosol. La cadena L es liberada del dominio HN por la acción del sistema tiorredoxina reductasa-tiorredoxina (TxR-Trx; los enlaces S-S se muestran en naranja). La actividad metaloproteasa de BoNT/B,/D,/F,/G cortan VAMP, la actividad de BoNT/A y /E cortan SNAP25 y BoNT/C corta ambas moléculas (paso 4), dando como resultado la inhibición de la liberación de neurotransmisores y su consecuente neuromparálisis. *Adaptado de Rossetto et al (2014).*

Para que la toxina alcance su blanco, las proteínas SNARE en el citosol de las células nerviosas, la cadena L debe ser translocada al citosol. La principal fuerza que va a facilitar la translocación de la cadena L es el gradiente transmembrana de pH, generado por la **bomba protón-ATPasa** que interviene en la recaptura de los neurotransmisores (junto a iones H^+) dentro de las vesículas sinápticas, lo que ocurre poco después de la liberación de los mismos por exocitosis. De hecho, cuando se utilizan inhibidores específicos de la ATPasa, no se produce la intoxicación de los terminales nerviosos por las BoNTs. Así, estas toxinas neurotóxicas han evolucionado para **explotar dos procesos fisiológicos** fundamentales que ocurren en los terminales nerviosos: la **endocitosis de las vesículas nerviosas** (para entrar en las vesículas) y el **rellenado con neurotransmisores de las vesículas sinápticas** (para introducir la metaloproteínasa de la cadena L en el citosol). La exposición de la toxina al **medio ácido** de los endosomas induce un **cambio conformacional en la cadena pesada (H)** que conduce a su inserción en la membrana endosomal. Como consecuencia se va a formar un **canal por donde va a ser traslocada la cadena L al citoplasma**, donde ésta va a llevar a cabo su acción (Fig. 16 y 17).

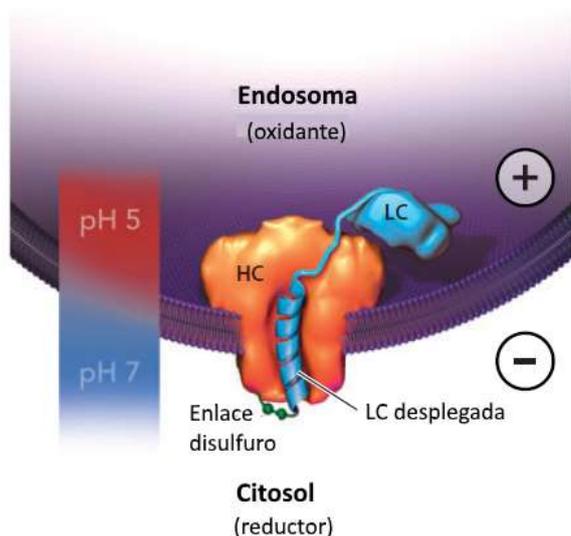


Figura 16. Representación de una chaperona molecular dirigida por una diferencia de pH en endosomas. El canal HC (naranja) previene la agregación del cargo LC (cian) en el lumen ácido del endosomal, mantiene la conformación desplegada o parcialmente plegada durante la traslocación y libera a LC después de replegarse al pH neutro citosólico. En este ciclo, el canal HC está oculto por LC durante el tránsito y se abre tras completarse los dos últimos pasos anteriores.

El puente disulfuro entre HC y LC está representado en verde, y los signos + y - se refieren a la polaridad del potencial de membrana en los endosomas. *Adaptada de Montal (2010)*

Por tanto, la traslocación de la cadena L por el dominio HC es estrictamente dependiente de:

- Un **gradiente de pH**, ácido en el interior y neutro en el citosol.
- Un **gradiente redox**, oxidante en el endosoma y reductor en el citosol. Es en este compartimento donde varios experimentos apuntan a la reducción del puente disulfuro de la toxina por el sistema Trx, haciéndola así competente para atacar su blanco.
- Un **potencial transmembrana positivo** en el interior del endosoma.

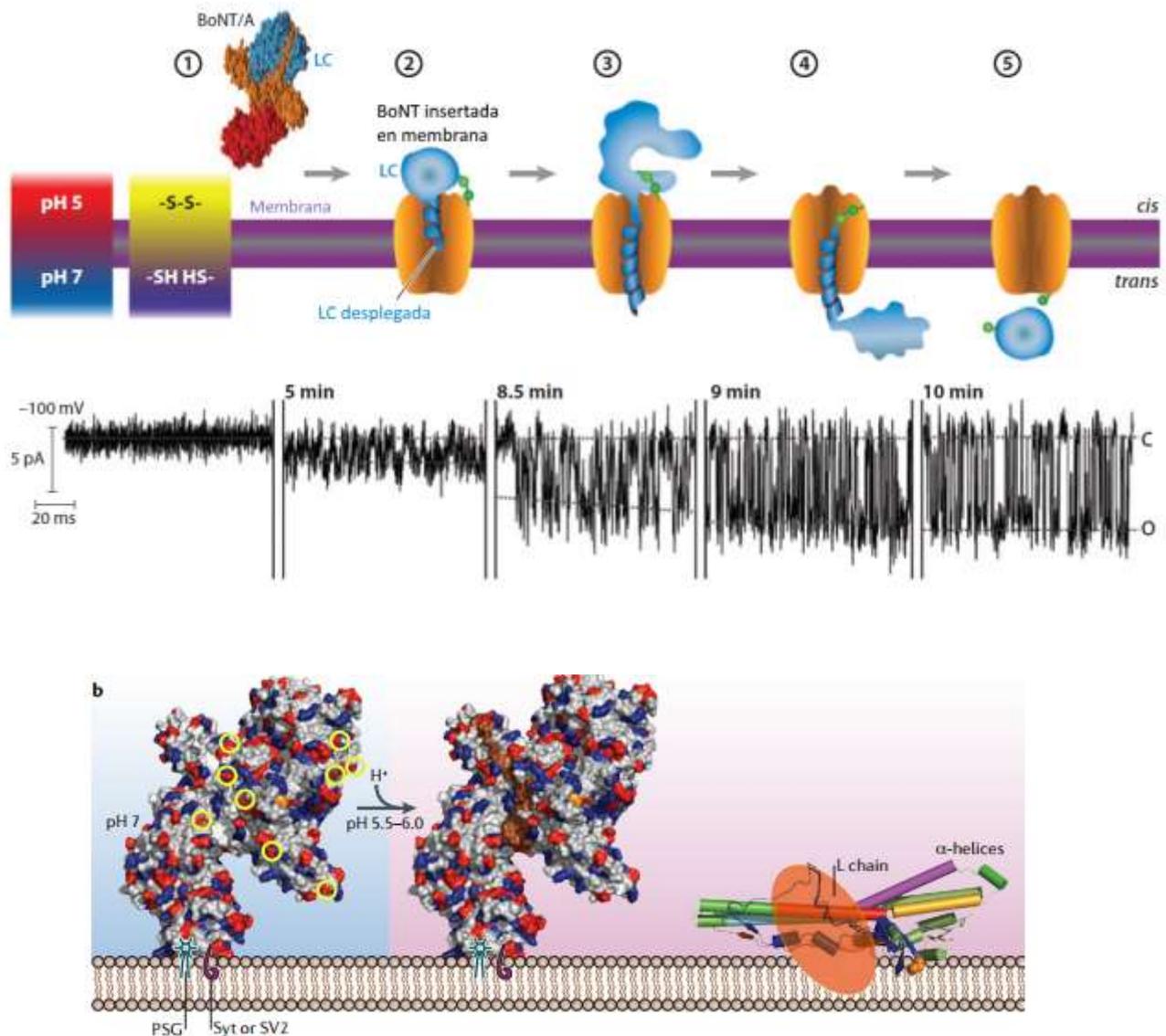


Figura 17. Secuencia de eventos en la translocación de la cadena L de BoNT a través del canal de conductancia del dominio HC de la toxina. Paso (1) inserción de la holotoxina BoNT/A en la membrana; esta es representada por su estructura cristalina (PDB 3BTA). Luego, hay una representación esquemática de la BoNT/A insertada en membrana durante un evento de entrada (2), una serie de transferencias (3) y (4), y un evento de salida (5), bajo las condiciones

del endosoma. Los segmentos de corrientes de canal típica, a 100 mV, se muestran bajo la correspondiente interpretación para cada paso. C y O hacen referencia al estado cerrado o abierto, respectivamente. (b) Pasos sugeridos antes de la inserción en la membrana de la proteína. El proceso comienza con la unión de BoNT a sus dos receptores (residuos catiónicos en azul, aniónicos en rojo). La acidificación de la vesícula sináptica produce la protonación de algún residuo de glutamato o aspartato, que tienen altos valores de pKa (círculos amarillos), los cuales son agrupados en una cara de la toxina. Esta misma cara también contiene el puente disulfuro (naranja) y un segmento que le proporciona a la toxina alta propensión a insertarse (marrón). La cara parcialmente protonada con carga positiva es atraída por la superficie aniónica de la membrana, y la toxina colapsa en ella. En ese momento, es posible que las α -hélices del dominio HN se rompan en fragmentos más cortos (derecha), los cuales son insertados en la bicapa lipídica para formar el canal iónico. *Adaptada de Montal (2010)*

Una cuestión intrigante es cómo la cadena ligera, una vez en el citoplasma, evita ser degradada. Se piensa que el dominio HN de la toxina protege a esta cadena del ambiente ácido en el endosoma, de las chaperonas en el citosol y la libera en una conformación activa enzimáticamente para acceder a sus sustratos.

Además, algunos serotipos de BoNT presentan una gran longevidad, que puede llegar hasta 12 meses, como en el caso de BoNT/A, tiempo durante el cual van a estar inhibiendo la liberación de neurotransmisores. Esta característica también es muy importante en cuanto a la aplicación de estas toxinas en tratamientos clínicos (ver más abajo).

6. SIGNIFICADO EVOLUTIVO DE LAS NEUROTOXINAS.

Una de las cuestiones planteadas es cuál puede ser la razón que ha llevado a la producción de unas toxinas tan potentes. La razón se puede encontrar en las siguientes líneas argumentales:

- Los clostridios son bacterias anaerobias estrictas y en los animales, en situación normal, no existen zonas anaerobias que favorezcan el desarrollo de los clostridios. Así, con la muerte rápida del animal se obtienen las condiciones necesarias para el desarrollo de las bacterias.

7. MÉTODOS DE PREVENCIÓN Y VACUNAS.

Las esporas de los clostridios son ubicuas y muy resistentes. Se encuentran en abundancia en el suelo, el material biológico en descomposición, etc. Así, la contaminación de alimentos y heridas por esporas es frecuente. En determinadas condiciones ambientales (humedad, abundancia de nutrientes y falta de oxígeno), las esporas germinan en las células vegetativas; y lo contrario, la exposición al oxígeno, la falta de agua o de nutrientes, dispara la esporulación. Las heridas permiten la penetración de las esporas y la germinación de *C. tetani* (rara vez de *C. botulinum*) y la producción de toxinas. Las manifestaciones clínicas tardan de dos a cuatro semanas en aparecer. Otra forma frecuente de contaminación se da en países subdesarrollados al cortar el cordón umbilical de los neonatos con material sin esterilizar.

7.1 Tétanos.

Se ha observado que la inactivación de estas toxinas con formaldehído hace que éstas pierdan sus efectos tóxicos pero mantengan su capacidad para estimular una respuesta inmunitaria protectora. Esta vacuna, conocida como la vacuna antitetánica, es uno de los productos más difundidos de la industria biotecnológica (Fig. 18).

ESTADO VACUNAL	HERIDA LIMPIA	HERIDA DE RIESGO
Esquema completo: última dosis < 10 años		Vacuna antitetánica si la última dosis fue > 5 años
Esquema completo: última dosis > 10 años	Vacuna antitetánica	Vacuna antitetánica + Ig específica antitetánica
Esquema incompleto o desconocido	Vacuna antitetánica (3 dosis)	Vacuna antitetánica (3 dosis) + Ig específica antitetánica

Figura 18. Plan de vacunas contra el tétanos (Fuente: <http://es.slideshare.net/lucho1225/presentacin-vacunas-internos>)

Por otra parte, se está investigando en la utilización de nano-bilosomas como una vacuna potencial contra el tétanos y la hepatitis B. Los bilosomas (Fig 19) son vesículas bicapa construidas a partir de agentes tensioactivos no iónicos combinados con sales biliares, las cuales pueden estabilizar la vesícula en el tracto gastrointestinal evitando la desestabilización de la membrana.

La inmunización oral aparece como una eficiente alternativa para esta doble vacuna, y los nano-bilosomas, que contienen HBsAG y TeNT, ayudan a solventar el problema de la digestión, pues altas dosis producen altos niveles de anti-HBsAg-IgG y anti-TeNT-IgG, además de cantidades de IgA en las secreciones mucosas.

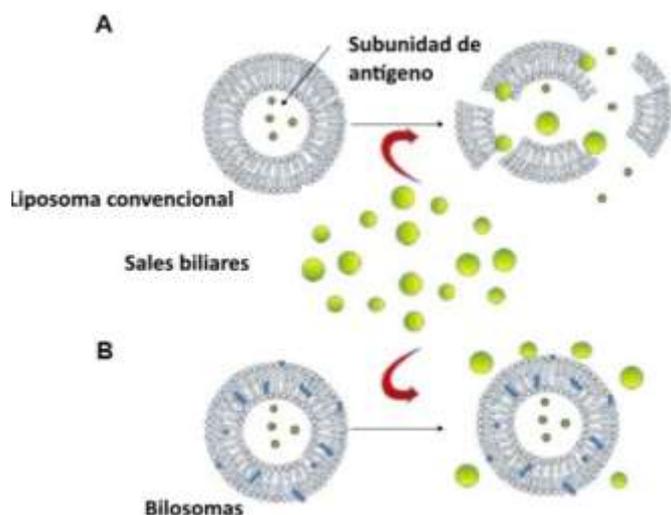


Figura 19. Representación de bilosomas estabilizando el efecto de vesículas orales que contienen proteínas. (A) Vesícula liposomal rota antes de llegar a las células M. (B) Bilosomas intactos con el antígeno ofrecen protección además de continuar su tránsito hacia las células M.

La prevención del desarrollo de la enfermedad en individuos con heridas contaminadas se lleva a cabo con la inoculación de inmunoglobulinas procedentes de individuos inmunes, con el objeto de impedir que las toxinas alcancen sus células blanco, las neuronas. Ante un caso serio de esta enfermedad se puede recurrir al uso terapéutico del Mg^{+2} , el cual reduce la necesidad de medicamentos para controlar la rigidez muscular y la inestabilidad cardiovascular, pero no reduce la mortalidad. Sin embargo, esta terapia puede causar graves efectos adversos, tales como debilidad muscular, parálisis e hipotensión.

7.2 Botulismo.

El desarrollo del botulismo sigue una vía distinta. Generalmente este microorganismo prolifera en carnes y vegetales conservados en anaerobiosis (Fig 20). La intoxicación se va a producir al consumir alimentos contaminados con la neurotoxina, ya producida por el crecimiento de *Clostridium*. Dependiendo de la dosis, el periodo de incubación puede variar entre 12 y 72 h. Actualmente, la incidencia de esta enfermedad se ha conseguido eliminar prácticamente gracias a la mejora de los métodos de conservación y envasado. Sin embargo, sigue siendo un riesgo asociado a la conservación casera o familiar de alimentos (carnes curadas, vegetales enlatados, etc.).



Figura 20. Vías caseras de adquisición de la toxina botulínica.

Cuando se produce la infección, el tratamiento que se aplica consiste fundamentalmente en tres pasos:

- Tratamiento ventilatorio de soporte adecuado.
- Eliminación de microorganismos del tracto digestivo: administración de metronidazol o penicilina.
- Aplicación de la antitoxina botulínica trivalente frente a las toxinas A, B y E, serotipos que afectan a humanos principalmente.

En cuanto a la prevención del botulismo, existe una vacuna pero se utiliza en muy pocas ocasiones, dado que su eficacia no se ha evaluado correctamente y se han demostrado efectos secundarios negativos. Anticuerpos específicos antitoxina pueden ser usados para prevenir y tratar el botulismo eliminando la toxina de la circulación pero su entrada a las neuronas encuentra ciertas dificultades, por lo que su uso es limitado. Algo similar ocurre al utilizar pequeñas moléculas inhibitorias como tratamiento post-intoxicación. Deben bloquear la actividad metaloproteasa de la cadena L en el nervio terminal a la vez que deben no ser tóxicas y capaces de cruzar la membrana plasmática de las células nerviosas. Sin embargo, el desarrollo de estos agentes es complicado debido a la complejidad de la unión de la cadena L a su sustrato. A pesar de los intensos esfuerzos en varios laboratorios, pocas moléculas han pasado, en neuronas en cultivo, el estado de inhibición de las toxinas.

A principios de este año ha aparecido una alternativa: el sistema de expresión 293E fue usado para expresar el dominio Hc de BoTN/B como una proteína recombinante soluble para evaluación de una vacuna experimental. Los resultados del experimento demostraron que se podían producir altos niveles de la proteína BHC recombinante secretada, la cual era específicamente inmuno reconocida por anti-BoNT/B y mostraba actividad de unión a gangliósidos, generando una efectiva protección inmune contra esta toxina.

8. LAS TOXINAS DE CLOSTRIDIUM COMO AGENTES TERAPÉUTICOS.

8.1 BoNT.

→ Desórdenes neuromusculares.

En particular, la toxina botulínica, la sustancia biológica más conocida, es utilizada para el tratamiento de muchos desórdenes neuromusculares en humanos caracterizados por contracciones musculares involuntarias, causadas por una hiperfunción de las terminales colinérgicas (Fig 21).

Desde la aprobación de la toxina botulínica tipo A por parte de la “US Food and Drug Administration” en diciembre de 1989 para tres desórdenes (estrabismo, “blepharospasm” y espasmo hemifacial), el número de indicaciones ha crecido enormemente y actualmente también se emplea para tratar otros desórdenes tales como temblores, migrañas y otros dolores de cabeza causados por tensión muscular. La remarcable utilidad terapéutica de la toxina botulínica radica en su habilidad para inhibir, de formas específica y poderosa, la actividad muscular involuntaria durante un periodo prolongado.



Figura 21. Efecto terapéutico de BoNT en desórdenes neuromusculares.

El número de síndromes que se pueden beneficiar del tratamiento con BoNT está aumentando. Además, se está investigando la posibilidad de utilizar esta toxina para tratamientos de ciertas alteraciones del sistema nervioso central. De hecho, cuando de forma experimental se administra ahí, las BoNTs pueden también bloquear la liberación de otros neurotransmisores, incluyendo glutamina, glicina, noradrenalina, dopamina, serotonina y neuropéptidos.

→ Desórdenes urogenitales y dolor.

La primera vez que se usó BoNT/A en urología, su inyección en los esfínteres uretrales de pacientes con disinergia detrusor-esfínter resultó en una reducción de la resistencia uretral y una mejor eficiencia de la micción. Posteriormente, se ha aprobado el uso de inyecciones de esta toxina para tratar casos de vejiga hiperactiva idiopática en adultos. Otras indicaciones para las que los urólogos han aplicado inyecciones BoNT/A incluyen la cistitis intersticial, hipersensibilidad de la vejiga y el síndrome de dolor pélvico crónico.

Por otra parte, debido al éxito del tratamiento con BoNT en desórdenes que causan dolor, datos en animales han proporcionado evidencias para una variedad de mecanismos que explican los efectos analgésicos de la toxina A.

Por último, cabe destacar los últimos avances en la ingeniería genética de neurotoxinas (Fig 22). Los éxitos terapéuticos de BoNT resultan de su inhibición específica y potente de la liberación de neurotransmisores de las neuronas colinérgicas periféricas combinado su duración durante meses. La utilidad clínica de la neurotoxina, sin embargo, es restringida por su rango limitado de células diana y su estrecha ventana terapéutica. Los avances en el entendimiento de su estructura y el desarrollo de proteínas recombinantes nos aportan nuevas capacidades terapéuticas, encontrándose algunas de ellas actualmente en el ámbito preclínico y clínico.

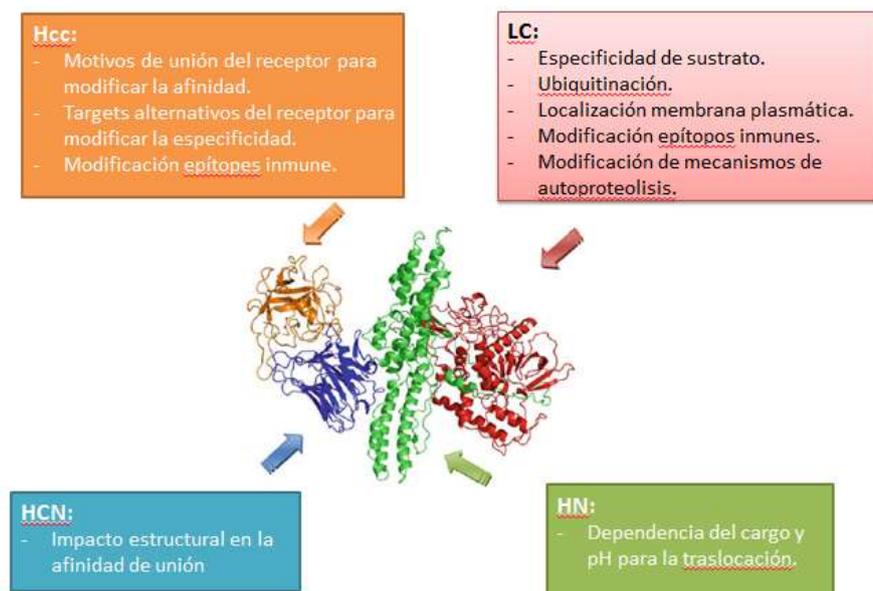


Figura 22. El potencial para la ingeniería de los dominios de la neurotoxina botulínica.

8.2 TeNT.

La enfermedad meningococal invasiva es una infección seria que ocurre a nivel mundial, causada por la bacteria *N.meningitidis*. En Europa en 2012 (no así en EEUU) se aprobó el uso de una vacuna conjugada, con los serogrupos A, C, W e Y de meningococos y la toxina del tétanos. Esta vacuna se ha demostrado de manera consistente que proporciona una adecuada inmunogenicidad desde la edad de 12 meses, con una seguridad aceptable y su inmunidad es de larga duración.

REFERENCIAS

- **García-Rodríguez, J.A.** (1989) *Clostridium*. En: Microbiología y Parasitología Médica (2ª Ed.). pp. 387-402. Salvat Editores, S.A., Barcelona.
- **Hakami, RM., Ruthel, G., Stahl, AM. and Bavari, S.** (2010) Gaining ground: assays for therapeutics against botulinum neurotoxin. *Trends Microbiol.* 18, 164-172
- **Halpern, J.L. and Neale, E.A.** (1995) Neurospecific binding, internalization, and retrograde axonal transport. *Cur. Top. Microbiol. Immunol.* 195: 221-241.
- **Hedari, CP., Khinkarly, RW. and Dbaiibo, GS.** (2014). Meningococcal serogroups A, C, W-135, and Y tetanus toxoid conjugate vaccine: a new conjugate vaccine against invasive meningococcal disease. *Dovepress.* 7: 85-99
- **Jacky BPS, Garay PE, Dupuy J, Nelson JB, Cai B, Molina, Y., Wang, J., Steward, LE., Broide, RS., Francis, J., et al.** (2013) Identification of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) as a Protein Receptor for Botulinum Neurotoxin Serotype A (BoNT/A). *PLOS Pathog* 9: 1-16
- **Johnson, E.A.** (1999) Clostridial toxins as therapeutic agents: benefits of nature's most toxic proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 551-575.
- **Karanikolas, M., Velissaris, D., Marangos, M., Karamouzos, V., Fligou, F. and Filos, K.** (2010) Prolonged high-dose intravenous magnesium therapy for severe tetanus in the intensive care unit: a case series. *Journal of Medical Case Reports*, 4: 1-5
- **Lalli, G., Bohnert, S., Deinhardt, K., Verastegui, C. and Schiavo, G.** (2003). The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. *Trends Microbiol.* 11: 431-437.
- **Montal, M.** (2010). Botulinum neurotoxin: a marvel of protein design. *Annu. Rev. Biochem.* 79: 591-617.
- **Magistro, G. Stief, C.G. and Gratzke, C.** (2015). New intraprostatic injectables and prostatic urethral lift for male LUTS. *Nat. Rev. Urol.* 12: 461-471
- **Pirazzini, M., Bordin, F., Rossetto, O., Shone, CC., Binz, T. and Montecucco, C.** (2013). Thethioredoxin reductase-thioredoxin system is involved in the entry of tetanus and botulinum neurotoxins in the cytosol of nerve terminals. *FEBS Letters.* 587: 150-155.
- **Rainey, G. J. A. and Young, J. A. T.** (2004). Antitoxins: novel strategies to target agents of bioterrorism. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 721-726.
- **Rossetto, O., Pirazzini, M. and Montecucco, C.** (2014). Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 535-549.
- **Schiavo, G., Rossetto, O, Tonello, F. and Montecucco, C.** (1995) Intracellular targets and metalloprotease activity of tetanus and botulism neurotoxins. *Cur. Top. Microbiol. Immunol.* 195: 257-274.
- **Schiavot, G., Rossetto, O., Santucci, A., FasGupta, BR., and Montecucco, C.** Are Zinc Proteins. *J. Biol. Chem.* 267, 23463-23479

- **Shukla, A., Bhatia, A., Amarji B., Singh, B., Katare, O.P. and Vyas, S.P.** (2010) Nano-bilosomes as potential vaccine delivery system for effective combined oral immunization against tetanus and hepatitis B. *J Biotech.* 150. 98-99
- **Verderio, C., Rossetto, O., Grumelli, C., Frassoni, C., Montecucco, C., and Matteoli, M.** (2006). Entering neurons: botulinum toxins and synaptic vesicle recycling. *EMBO Rep.* 7: 995-999
- **YunZhou Yu, DanYang Shi, Si Liu, Zheng-Wei Gong, Shuang Wang, and ZhiWei Sun** (2015) Production and evaluation of a recombinant subunit vaccine against botulinum neurotoxin serotype B using a 293E expression system. *Human Vaccines & Immunotherapeutics.* 11:2, 468-473.

En la red:

- https://en.wikipedia.org/wiki/Clostridium_botulinum
- <http://microbiology.science.oregonstate.edu/content/dr-mahfuzur-sarker>
- <https://microbiology2009.wikispaces.com/Tetanus++Symptoms,+Causes+and+Treatments>
- <http://www.medciencia.com/la-bacteria-c-difficile-sigue-infectando-en-los-hospitales/>
- <http://revista.isciii.es/index.php/bes/article/view/461/492>