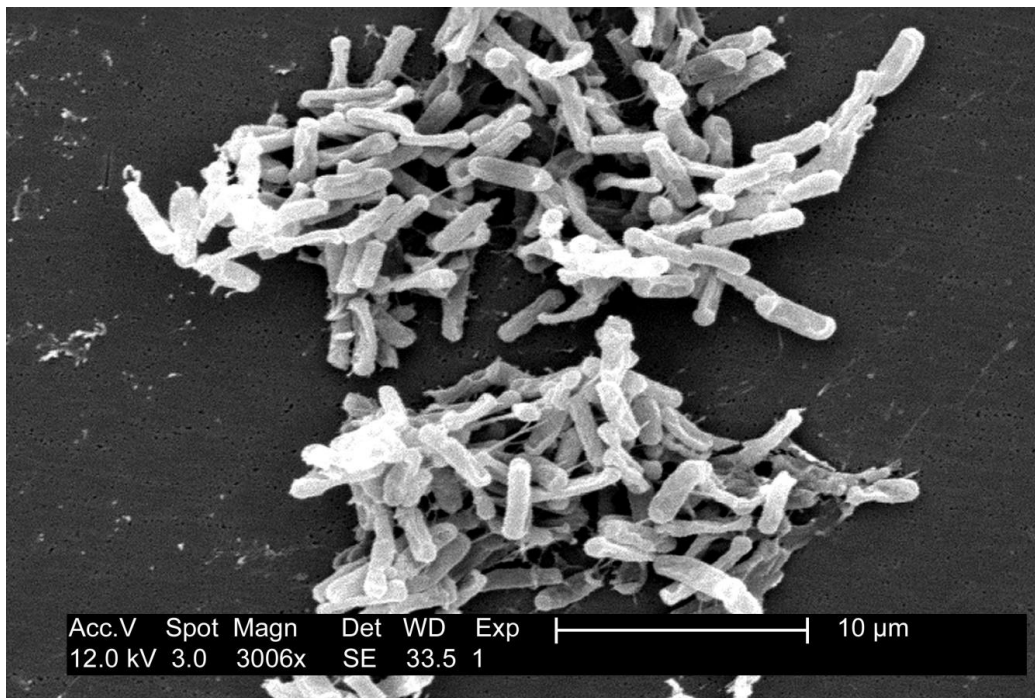

TEMA 15. GÉNERO CLOSTRIDIUM

GRUPO 15

EDUARDO MARTÍN
XABIER PEROSANZ
ANDREA SÁNCHEZ
EVA SOTO
ISABEL TORRES



FACULTAD DE
CIENCIAS

Microbiología clínica
Grado en Bioquímica
Departamento de Biología Molecular
U. A. M. © 2018



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Formación de esporas.....	1
1.2. Clostridios neurotóxicos: tétanos y botulismo.....	3
1.2.1. Tétanos.....	4
1.2.2. Botulismo.....	5
2. CARACTERÍSTICAS DE LAS NEUROTOXINAS.....	9
3. ASPECTOS ESTRUCTURALES DE LAS NEUROTOXINAS CLOSTRIDIALES.....	10
3.1. Estructura de la cadena L.....	12
4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS NEUROTOXINAS.....	14
4.1. Actividad metaloproteínasa.....	14
5. UNIÓN, INTERNALIZACIÓN Y TRANSPORTE DE LAS NEUROTOXINAS.....	18
5.1. Receptores para neurotoxinas.....	19
6. SIGNIFICADO EVOLUTIVO DE LAS NEUROTOXINAS.....	25
7. MÉTODOS DE PREVENCIÓN Y VACUNAS.....	26
7.1. Vacuna contra el tétanos.....	26
7.2. Prevención contra el tétanos.....	26
7.3. Prevención contra el botulismo.....	27
8. LAS TOXINAS DE <i>CLOSTRIDIUM</i> COMO AGENTES TERAPÉUTICOS.....	28
8.1. Usos de la toxina botulínica	28
8.2. Usos de la toxina tetánica.....	32
9. TOXINAS PRODUCIDAS POR <i>CLOSTRIDIUM DIFFICILE</i>	33
9.1. Toxinas TcdA y TcdB.....	34
9.2. La toxina binaria CDT (" <i>C. difficile</i> transferase toxin").....	41
REFERENCIAS.....	44

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias que constituyen el género *Clostridium* son **bacilos gram-positivos** de bajo contenido en GC (menos del 50% del DNA se compone de guaninas y citocinas) **esporulados** y **anaerobios estrictos** (Fig. 1).

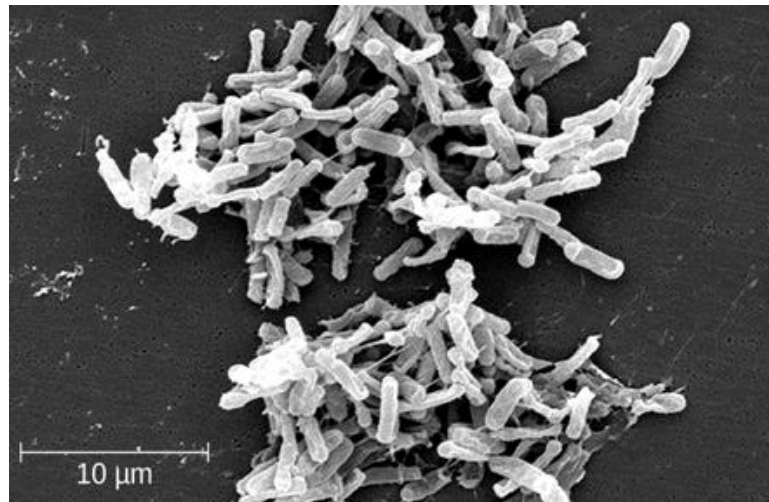


Figura 1. Fotografía de microscopía electrónica de *Clostridium difficile*. Se puede observar la morfología de bastón y el crecimiento en colonias.

Figura extraída de Parker (2016).

Los clostridios forman parte de la flora del ser humano y de los animales y se encuentran ampliamente distribuidos sobre el terreno a causa de la alta resistencia a los agentes externos que les proporcionan las esporas. Se encuentran, sobre todo, en sedimentos acuáticos ricos en nutrientes y en el suelo.

1.1 Formación de esporas

Los clostridios pueden encontrarse en **forma celular o como esporas**. En forma celular, se caracterizan por tener una morfología filamentososa (Fig. 2) y acumulación de vesículas. Comienzan el proceso de esporulación cuando detectan condiciones desfavorables en el medio.



Figura 2. Microscopía de *Clostridium botulinum*. Se destaca la presencia de endosporas en el interior de las células en estado vegetativo y las esporas independientes en la muestra.

Figura extraída de Parker (2016).

Cuando se inicia la **esporulación**, la célula vegetativa se **divide asimétricamente**, formándose un septo que define una célula madre y un compartimento de pre-espora dentro de la pared bacteriana. Entonces, la célula madre endocita a la pre-espora dotándola de un cortex sobre el que se forma la capa de espora. Finalmente, la célula madre se lisa liberando la espora al medio. Bajo condiciones favorables la espora germina dando lugar a la forma vegetativa (*Fig. 3*).



Figura 3. Ciclo vegetativo y ciclo de esporulación de clostridios.
Figura adaptada de Al-Hinai et al. (2015).

El ciclo de **esporulación comienza tras la detección de estímulos desfavorables**, con la activación de una cascada de eventos transcripcionales y postranscripcionales que incluyen la presencia de diferentes factores (*spo0A*, *sigH*, *sigF*, *sigE*, *sigG*, and *sigK*), factores de transcripción, proteasas, quinasas y fosfatasas. El proceso molecular no está definido completamente.

Al encontrarse tan ampliamente distribuidos en la naturaleza es frecuente que contaminen heridas, pero, al carecer de poder invasivo, los casos de infecciones clínicas son escasos (*Fig. 4 y Fig. 7*).

Las especies más importantes, de interés clínico, ejercen su **acción patógena** mediante **toxinas** elaboradas por ellas, que en algunos casos tienen un elevadísimo poder tóxico. Entre las eubacterias, los clostridios producen más toxinas proteínicas 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 periférico*. Los más relevantes son *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 muy resistentes al calor. Ejemplos notables de este tipo de clostridios son *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*.

1.2 Clostridios neurotóxicos: tétanos y botulismo

El botulismo y el tétanos son enfermedades de humanos y animales que se caracterizan por **desórdenes neurológicos específicos**.

El **tétanos** se caracteriza por la desregulación de los impulsos nerviosos relacionados con la contracción muscular, produciéndose una parálisis espásmica 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, se produce por el bloqueo de la liberación de acetilcolina en la unión neuromuscular, lo que lleva 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 es 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 patogenicidad bacteriana. Una bacteria produce una toxina que induce todos los desórdenes específicos de la enfermedad y la muerte.

1.2.1 Tétanos

La forma más habitual de adquirir la enfermedad del tétanos es por la **entrada en contacto con esporas** de *C. tetani* a través de heridas o cortes producidos por objetos punzantes contaminados con esporas. Hay que tener en cuenta que las esporas de *C. tetani* son muy resistentes a las condiciones medioambientales, y son abundantes en lugares donde hay materia orgánica en descomposición.

Una vez que *C. tetani* infecta al individuo, produce TeNT y por extensión la enfermedad. Dependiendo del sitio de infección, los casos de tétanos se definen como tétanos localizado, cefálico o generalizado.

El **tétanos localizado** ocurre cuando TeNT solo afecta a grupos de músculos cercanos al sitio de infección. No se relaciona con el sistema nervioso central. Los síntomas suelen ser leves; solo se observa espasmos musculares limitados.

El **tétanos cefálico** es una forma rara del tétanos, asociado a heridas en la cabeza. Esta enfermedad suele concurrir con doble visión, puesto que los espasmos afectan a los músculos que controlan el movimiento del ojo.

Ambos tipos de tétanos pueden progresar al **tétanos generalizado**, en donde TeNT entra en las neuronas del sistema nervioso central y migra hacia el cuerpo de las neuronas inhibitorias en el sistema nervioso central por movimiento retrógrado intracelular, donde ejerce su acción. **Inhibe la liberación de GABA**, responsable de la relajación muscular. Los espasmos musculares resultantes suelen ocurrir primero en los músculos de la mandíbula generando trismo (imposibilidad de abrir la boca). La toxina después involucra a otros músculos causando rotura de huesos y tendones, insuficiencia respiratoria, insuficiencia cardíaca y finalmente la muerte.

El **tétanos neonatal** normalmente ocurre cuando el cordón umbilical se contamina con esporas de *C. tetani*. cuando se usan instrumentos no esterilizados para cortar el cordón umbilical o cuando se usa material contaminado para cubrir el muñón umbilical. Los partos asistidos por personas con las manos sucias o realizados sobre superficies

contaminadas también son factores de riesgo. Los síntomas incluyen espasmos musculares, que a menudo están precedidos por la incapacidad del recién nacido para succionar o amamantar, y un llanto excesivo. Tiene una tasa de mortalidad del 70% al 100% de los casos.

La enfermedad sigue siendo un importante problema de salud pública en muchas partes del mundo, pero especialmente en los países o distritos de ingresos bajos, donde la cobertura vacunal es baja y los partos sin condiciones asépticas son frecuentes. En países desarrollados, por otro lado, la incidencia ha disminuido drásticamente desde finales del siglo XX hasta ahora. En España el tétanos se mantiene estable con una incidencia entre 0,03 y 0,01 casos por 100.000 habitantes y año (Fig. 4).

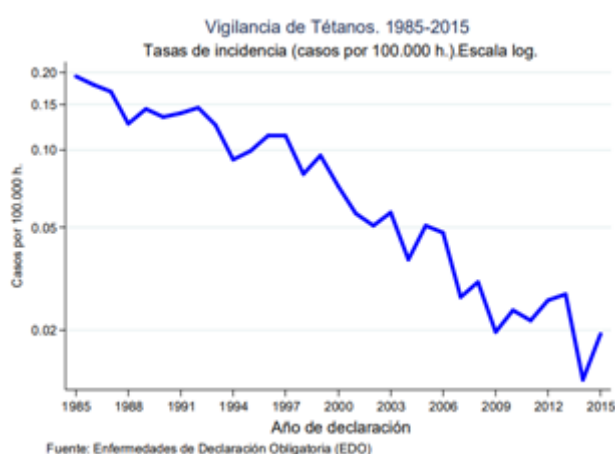


Figura 4. Incidencia del tétanos en España (1985-2015). Se muestra el número de casos por cada 100.000 habitantes. Hay una disminución en la incidencia de tétanos desde finales del siglo XX hasta 2015.

Figura extraída de “Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles”. (2017).

1.2.2 Botulismo

El **botulismo** se desarrolla como consecuencia de la **introducción de BoNT** producida por *C. botulinum* **en los tejidos afectados**. Hay 3 grupos genotípica y fenotípicamente diferenciados de dicha bacteria. Asimismo, existen siete formas diferentes de BoNT identificadas con las letras A a G. Cuatro de ellas (tipos A, B, E y ocasionalmente F) son producidas por *C. botulinum* pertenecientes a los grupos I y II; y pueden causar botulismo humano. Los tipos C, D y E son sintetizadas por *C. botulinum* del grupo III y provocan enfermedades en otros mamíferos, aves y peces.

Pues bien, cuando las toxinas entran en la sangre, son transferidas a las neuronas motoras en la unión neuromuscular, donde **impiden la liberación de acetilcolina** del terminal presináptico. Como consecuencia se pierde actividad muscular, causando parálisis.

Si es absorbido por el tracto gastrointestinal, los primeros síntomas que se observan son: visión borrosa, párpados caídos, dificultad al tragar calambres abdominales, náuseas, vómitos, estreñimiento y posiblemente diarrea. Después se observa parálisis flácida, la cual conlleva la muerte por insuficiencia respiratoria.

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.

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** insensible 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, van a experimentar parálisis y eventualmente les provocará la muerte. Y los cadáveres, ahora, se convierten, por un lado, en un **nicho adecuado** para el **crecimiento de la bacteria** y, por otro, para 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 (Fig. 5).



Figura 5. Ciclo de transmisión de *C. botulinum*. Se muestran las fases de transmisión de la bacteria en animales (principales afectados): Comienza con el crecimiento de la bacteria en material anaeróbico y la liberación de la toxina, sigue con el consumo de animales vertebrados sensibles a la toxina (tras su esparcimiento gracias a animales vectores insensibles a la toxina), y finaliza con la muerte de dichos animales sensibles y formación de un nuevo nicho de crecimiento de bacterias y animales vectores.

Figura adaptada de Rossetto et al. (2014).

Botulismo en humanos

El botulismo en humanos es **mucho más raro que en los animales**. Se distinguen cinco formas de enfermedad, de acuerdo con la ruta de entrada de la toxina (Fig. 6).

El **botulismo alimentario** se produce como consecuencia de la ingestión de alimentos contaminados con BoNT. El crecimiento de la bacteria y la formación de toxinas tienen lugar en productos de bajo contenido en oxígeno y con bajo grado de acidez. Estas condiciones se dan sobre todo en alimentos conservados. La toxina es capaz de resistir el ambiente proteolítico del tracto gastrointestinal hasta llegar al intestino, donde va a ser absorbida.

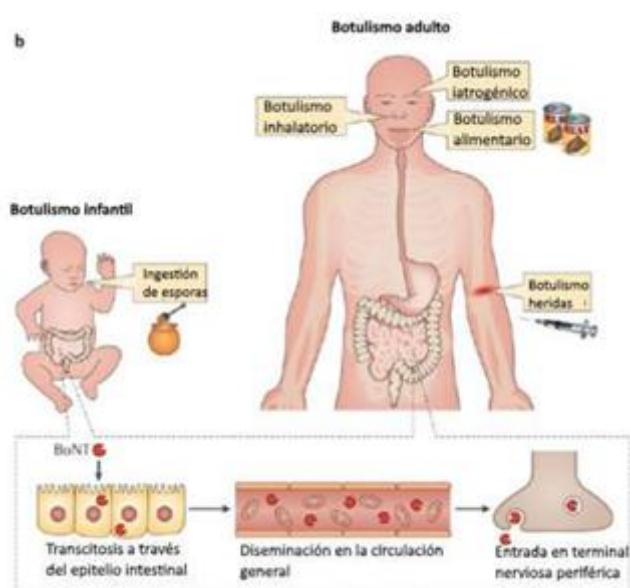


Figura 6. Tipos de botulismo en humanos y mecanismo de entrada de BoNT en botulismo infantil y botulismo por ingestión de alimentos. En estos dos casos la toxina cruza el epitelio intestinal mediante transcitosis y entra en la circulación general, alcanzando de manera general los terminales nerviosos colinérgicos.

Figura adaptada 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 menor 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, y van a provocar la parálisis de los terminales nerviosos (*Fig. 6*).

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, comparado con las contaminaciones alimentarias, se requiere menor cantidad de toxina dado que no precisan de ser absorbidas por vía intestinal.

Estudios en animales indican que, para producir la enfermedad, se requieren entre 100-1000 veces menos de toxinas cuando son inoculadas directamente en la circulación que cuando se administran de forma oral.

Finalmente, está el **botulismo inhalatorio**, que se produce cuando la toxina entra por la vía respiratoria. BoNT es inestable en forma de aerosol y por tanto no se encuentra en la naturaleza. Dicha forma de toxina es sintética.

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.

El botulismo es una enfermedad grave y puede ser mortal. Sin embargo, es relativamente inusual. No se transmite de persona a persona y por ello los brotes en humanos de esta enfermedad son infrecuentes.

En España la incidencia ha disminuido desde veinte a dos casos por cada diez millones de habitantes según el informe anual del centro nacional de epidemiología (*Fig. 7*).

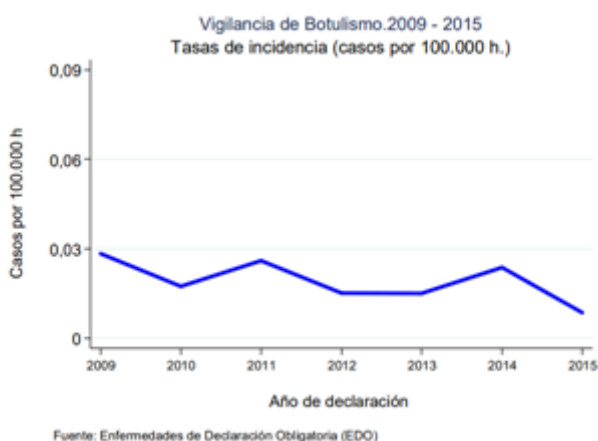


Figura 7. Incidencia de botulismo en España (2009-20015). Se muestra el número de casos de botulismo por cada 100.000 habitantes. En la última década el número de casos se ha estabilizado en España, oscilando entre 0,03 y el 0,01.

Figura extraída de “Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles”. (2017).

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 bien en el sistema nervioso periférico (BoNT) o 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 que únicamente se encuentran presentes 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**, 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. 8*). El puente disulfuro desempeña un papel crítico en la penetración celular, y su rotura mediante reducción suprime la toxicidad de la neurotoxina.

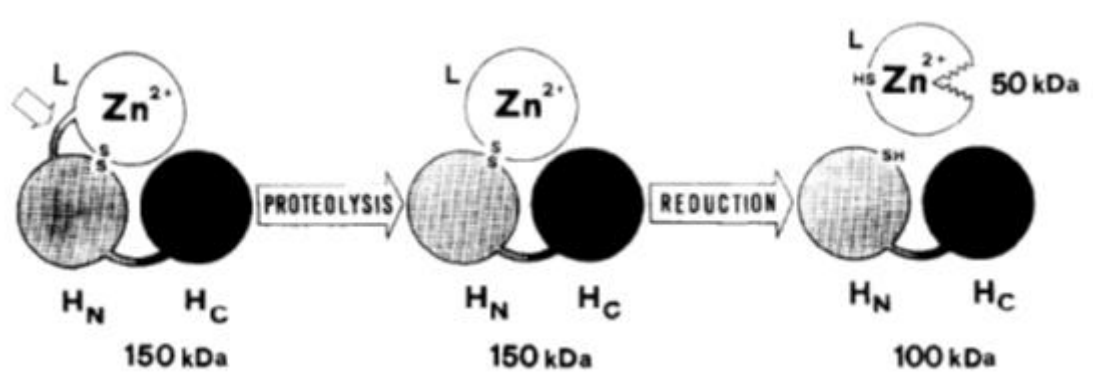


Figura 8. Esquema de la estructura y mecanismo de activación de las neurotoxinas tetánicas y botulínicas. Estas toxinas se producen como una cadena polipeptídica única de 150 kDa compuesta por tres dominios de 50 kDa: L, HN y HC, que desempeñan diferentes funciones en la intoxicación de las células nerviosas. La toxina se activa tras la escisión proteolítica selectiva que genera dos cadenas unidas por un puente disulfuro. Hc es responsable de la unión de alta afinidad al terminal de la neurona motoneurona y HN para la penetración celular. La reducción del puente disulfuro tiene lugar dentro de las células nerviosas y libera la actividad de la cadena L, que bloquea la neuroexocitosis a través de una actividad de endopeptidasa de zinc específica para tres subunidades de proteínas del aparato neuroexocitosis.

Figura adaptada de Rossetto et al. (1995).

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 (*Fig.9 y Fig.10*).

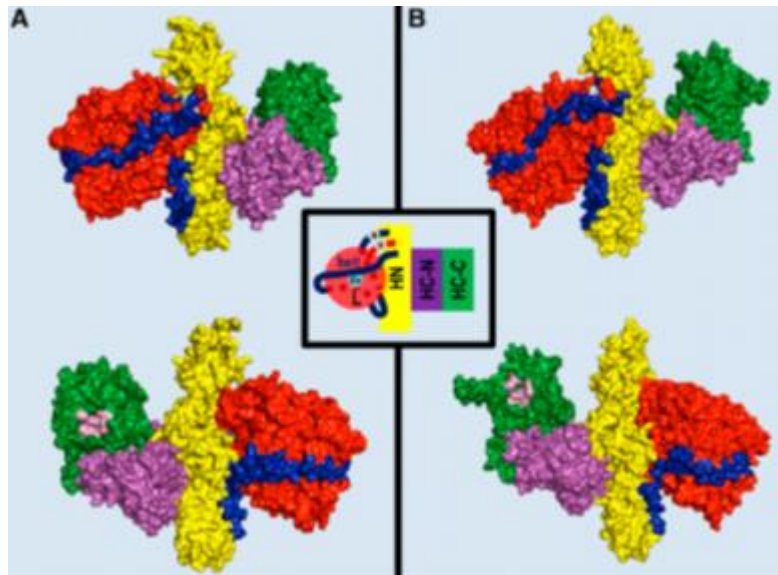


Figura 9. Estructura de las moléculas BoNT / A1 y BoNT / B1. Estructuras cristalinas de BoNT / A1 (ID PDB: 3BTA) (A) y BoNT / B1 (ID PDB: 1EPW)(B) representadas como modelos tridimensionales donde podemos observar cada uno de los tres dominios de la toxina: el subdominio HC-C de unión neuroespecífica (verde), el subdominio HC-N de lectina (púrpura), el dominio HN de translocación (amarillo) y la dominio metaloproteasa L (rojo). La cavidad rosada en los subdominios de HC-C que se muestra en los paneles inferiores es el sitio de unión al polisialogangliósido. También se muestra un cinturón peptídico (mostrado en azul) que rodea el dominio L y el enlace disulfuro entre cadenas (blanco en los paneles superiores) que une el dominio L y HN, que estabiliza la estructura.

Figura adaptada de Pirazzini *et al.* (2017).

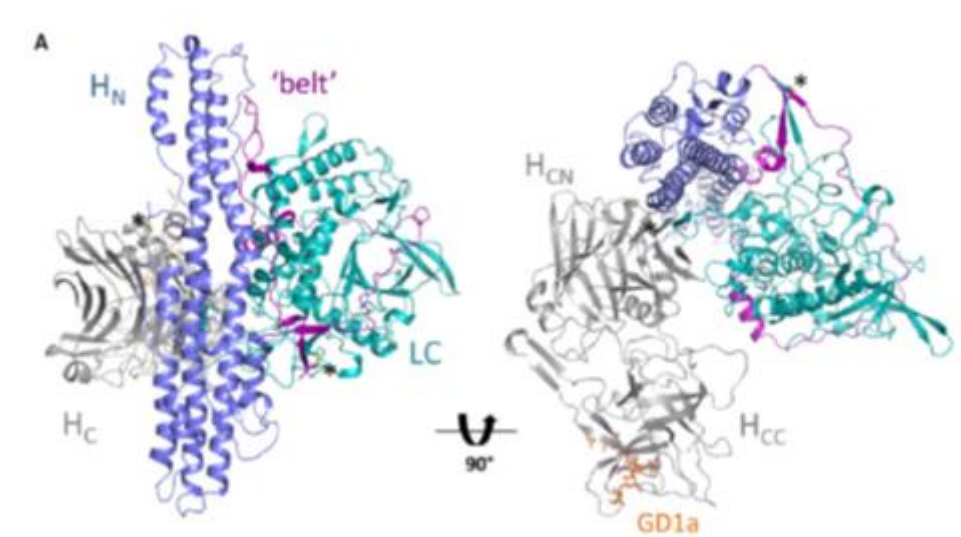


Figura 10. Estructura cristalina de TeNT. Estructura general de la TeNT con el dominio catalítico (LC, cian), la región del cinturón (púrpura), el dominio de translocación (HN, azul) y el dominio de unión (HC, gris). El puente disulfuro está marcado con un asterisco negro, y las cisteínas correspondientes se muestran en palos. El polisacárido GD1a (naranja) está unido al sitio de unión primario de HC.

Figura adaptada de Masuyer (2017).

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.

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. 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. (Fig. 11).

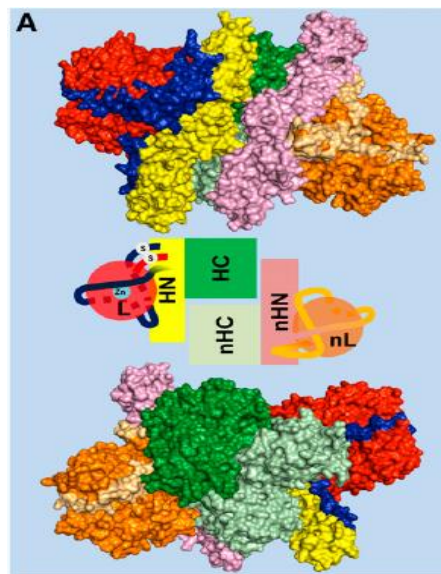


Figura 11. Estructura cristalina de BoNT / A1 en complejo con la proteína NTNHA / A1 (ID PDB: 3V0B) representada como modelos tridimensionales de las dos superficies opuestas. Para BoNT / A1, la cadena L está en rojo, el dominio HN está en amarillo y en verde el dominio HC. La proteína BoNT / A1 se une "de la mano" a la proteína NTNHA / A1, cuya estructura de dominio y organización son muy similares a las de la toxina. Para NTNHA / A1 nL está en naranja, nHN en rosa y nHC en verde claro. En azul y en naranja claro están los cinturones de toxina y NTNHA, respectivamente. Observamos que NTNHA / A1 protege una gran parte de la superficie de BoNT. Se ha determinado una estructura similar para BoNT / E1 (ID de PDB: 4ZKT).

Figura adaptada de Pirazzini et al. (2017).

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. Contiene el **motivo de unión a Zinc His-Glu-Xaa-Xaa-His** de las **zinc-endopeptidasas** (Fig. 12).

BoNT/A	D P A V T L A H E L I H A G H R L Y G
BoNT/A INFANT	D P A V T L A H E L I H A E H R L Y G
BoNT/B GP I	D P A L I L M H E L I H V L H G L Y G
BoNT/B GP II	D P A L I L M H E L I H V L H G L Y G
BoNT/C	D P I L I L M H E L N H A M H N L Y G
BoNT/D	D P V I A L M H E L T H S L H Q L Y G
BoNT/E	D P A L T L M H E L I H S L H G L Y G
BoNT/E BUTYRICUM	D P A L T L M H E L I H S L H G L Y G
BoNT/F	D P A I S L A H E L I H A L H G L Y G
BoNT/F BARATI	D P A I S L A H E L I H V L H G L Y G
BoNT/F LANGELAND	D P A I S L A H E L I H A L H G L Y G
BoNT/G	D P A L T L M H E L I H V L H G L Y G
TENT	D P A L L L M H E L I H V L H G L Y G
	* * • • * • * * * * * * • * * * *
ZINCINS	H E x x H
	* * * *
METZINCINS	x h x H E x h H x h G h x H x

Figura 12. Comparación de secuencias de la porción central de unión a zinc de la cadena L de las neurotoxinas clostridiales. La parte central de las cadenas L de las variantes de neurotoxinas clostridiales se compara con el motivo de unión al zinc común a todas las endopeptidasas de zinc (zincins) y al de las met-zincins. Este último grupo de metaloproteinasas se caracteriza por la presencia de una tercera histidina involucrada en la coordinación de zinc en el sitio activo.

Figura adaptada de Rossetto *et al.* (1995).

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 **sintaxina** (Fig. 13 y Fig. 14).

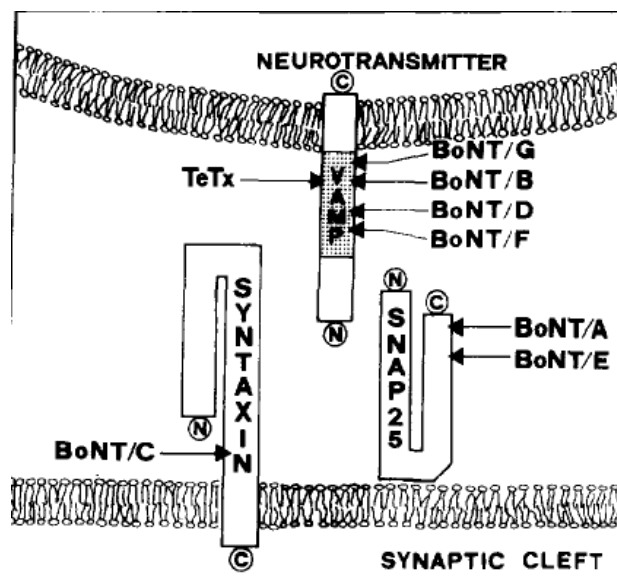


Figura 13. Dianas proteicas de la actividad intraneuronal de zinc-endopeptidasa del tétanos y neurotoxinas botulínicas. VAMP, SNAP-25 y la sintaxina son subunidades esenciales del complejo multiproteínico que media el acoplamiento de vesículas sinápticas y la fusión con la membrana presináptica. VAMP se encuentra en la cara citosólica de la membrana de la vesícula, mientras que SNAP-25 y la sintaxina se localizan principalmente en la cara citosólica del plasmalema. La parte punteada de VAMP indica la región conservada entre las especies y los isotipos. Su proteólisis por TeNT y BoNT/B, /D, /F o /G libera la parte amino-terminal, lo que dificulta el ensamblaje del aparato de neuroexocitosis. Cada toxina rompe un enlace peptídico diferente. BoNT/A y /E escinden SNAP-25 en el extremo carboxilo con la liberación de nueve residuos y 26 residuos,

respectivamente. BoNT/C escinde la sintaxina cerca de su término carboxilo. SNAP-25 está unida a la membrana, posiblemente a través de la palmitoilación de cuatro cisteínas ubicadas en el centro de la molécula. Así, la acción de TeNT y BoNT/B, /C, /D, /F y /G provoca la liberación de una gran parte del dominio citosólico de VAMP y sintaxina. En cambio, solo una pequeña parte de SNAP-25 se libera por la proteólisis selectiva de BoNT/A y /E, lo que indica que esta parte de la molécula es esencial para el funcionamiento del complejo. Otras proteínas putativamente implicadas en el aparato de neuroexocitosis son proteínas putativamente implicadas en el aparato de neuroexocitosis no están indicadas (referencias en Montecucco and Schiavo, 1994).

Figura extraída de Rossetto et al. (1995).

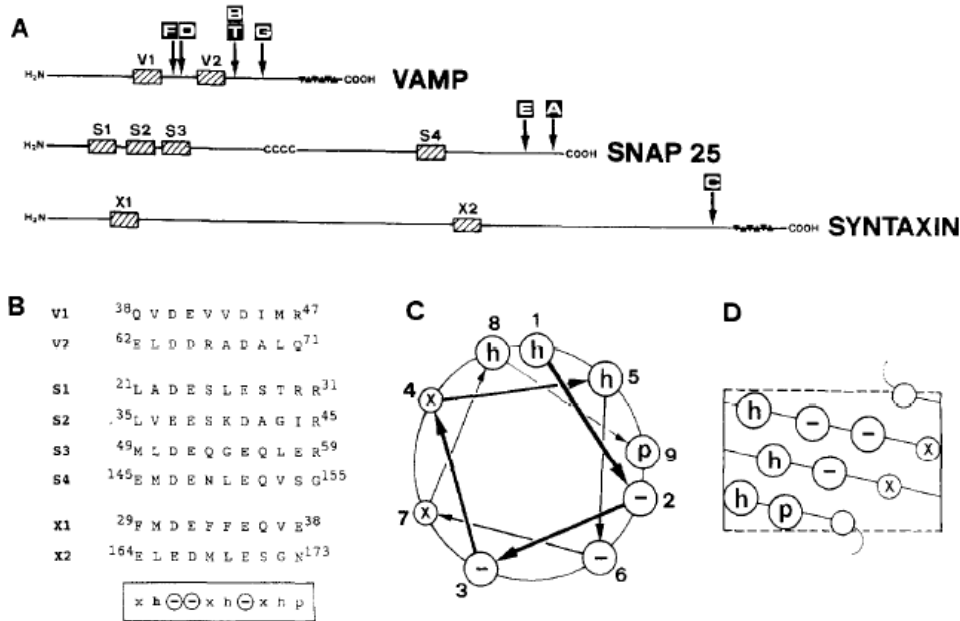


Figura 14. Motivo de reconocimiento de neurotoxina clostridial presente en sus dianas proteicas. **A.** VAMP, SNAP-25 y la sintaxina poseen múltiples copias de un motivo (cajas), presentes en las regiones predichas para adoptar una estructura secundaria alfa-helicoidal. **B.** Las secuencias del motivo en las tres proteínas se dan junto con los elementos comunes (línea inferior). **C, D.** El motivo se caracteriza por tres grupos carboxílicos en una cara y tres residuos hidrófobos en el tercio contiguo de la hélice.

Figura extraída de Rossetto et al. (1995).

VAMP, SNAP-25 y sintaxina, 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 sintaxina 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 (Fig. 15)

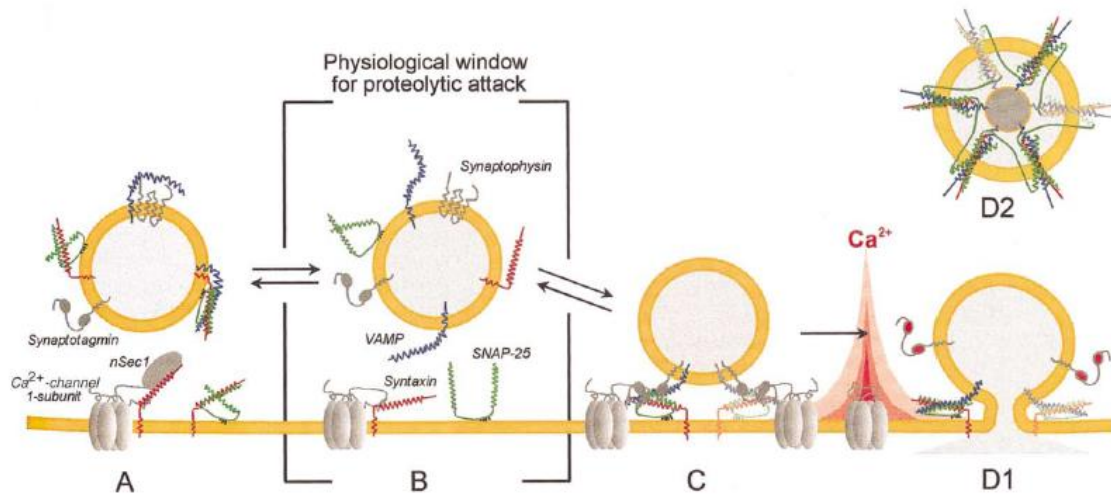


Figura 15. Las neurotoxinas clostridiales ejercen su acción proteolítica durante una breve ventana fisiológica. La exocitosis sigue una secuencia de pasos durante los cuales las vesículas libres (A) se acoplan en zonas activas (B y C) y se fusionan con la membrana plasmática después de una afluencia de Ca^{2+} (D1). Durante esta secuencia de eventos, los objetivos de neurotoxina clostridial (los tres SNAREs VAMP, SNAP-25 y sintaxina). D2 representa una sección transversal de D1 en la unión de la vesícula y las membranas plasmáticas. VAMP, SNAP-25 o sintaxina adoptan una configuración abierta solo durante el paso B. Esto determinaría la "Ventana fisiológica" durante la cual las neurotoxinas clostridiales pueden romper sus blancos.
Figura extraída de Humeau et al. (2000).

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:

1. Se producen como **precursores inactivos** que son activados mediante proteólisis específica seguida por reducción de un enlace disulfuro.
2. Actúan en el **citósol** celular y son **muy específicas** en términos de proteína blanco y del enlace peptídico que rompen.

3. 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.

Cabe destacar, a modo de curiosidad, que las toxinas clostridiales también bloquean otros eventos exocíticos además de la liberación de neurotransmisores (*Tabla 1*).

Tipo celular	Acciones bloqueantes de las toxinas
Células cromafines PC-12	Secreción de catecolaminas
Células de tipo enterocromafines	Secreción de histamina
Células beta pancreáticas	Secreción de insulina
Células pancreáticas acinares	Exocitosis de zimógeno
Células parótidas acinares	Secreción de amilasa
Plaquetas	Secreción de alfa-gránulos
Células embriónicas de erizo de mar	Resellado de la membrana celular
Huevo	Fertilización asociada a reacción cortical
Células endoteliales	Eventos de exocitosis
Leucocitos	Aumento de la superficie de la membrana antes de la fagocitosis
Células del conducto colector interno	Inserción en la membrana de la protón-ATPasa
Células CHO	Exocitosis de receptores de transferrina
Neuronas del hipocampo	Inserción de los receptores postsinápticos de glutamato
Adipocitos	Inserción en la membrana de transportadores de glucosa

Tabla 1. Diversos procesos en los que las toxinas clostridiales pueden producir bloqueo.

Tabla adaptada de Humeau *et al.* (2000).

5. UNIÓN, INTERNALIZACIÓN Y TRANSPORTE DE LAS NEUROTOXINAS

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

TeNT tiene una identidad de secuencia aminoacídica del 35% y una estructura conservada con las BoNTs. Sin embargo, aunque ambas, BoNTs y TeNT **cortan las proteínas SNARE** inhibiendo la liberación de neurotransmisores, causan distintos tipos de parálisis debido al tráfico diferencial dentro de las motoneuronas.

La familia de proteínas SNARE incluye más de 60 miembros en mamíferos y forman un complejo encargado de mediar **eventos de fusión de membranas en células eucariotas**. BoNTs y TeNT cortan específicamente un grupo de proteínas SNARE (syntaxina 1, SNAP 25, VAMP 1 y 2) que median la fusión de la vesícula sináptica con la membrana presináptica.

Las BoNTs alcanzan las terminales nerviosas en la **unión neuromuscular** (*Fig. 16*) donde se unen a la membrana neuronal, se mueven al citoplasma del terminal axónico y actúan bloqueando la transmisión sináptica **excitatoria** (bloquean la liberación de acetilcolina), conduciendo a la parálisis flácida.

La TeNT también es tomada por las terminaciones nerviosas en la unión neuromuscular pero no actúa en este sitio (*Fig. 16*). La TeNT es transportada (transporte retrógrado) en un compartimento vesicular dentro de los axones motores durante una distancia considerable, quizás 1 m, hasta el cuerpo de las neuronas motoras dentro de la cuerda espinal (los microtúbulos y los microfilamentos de actina son requeridos para un rápido transporte retrógrado de TeNT en las neuronas motoras). 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 inhibidores como el GABA y la glicina. 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.

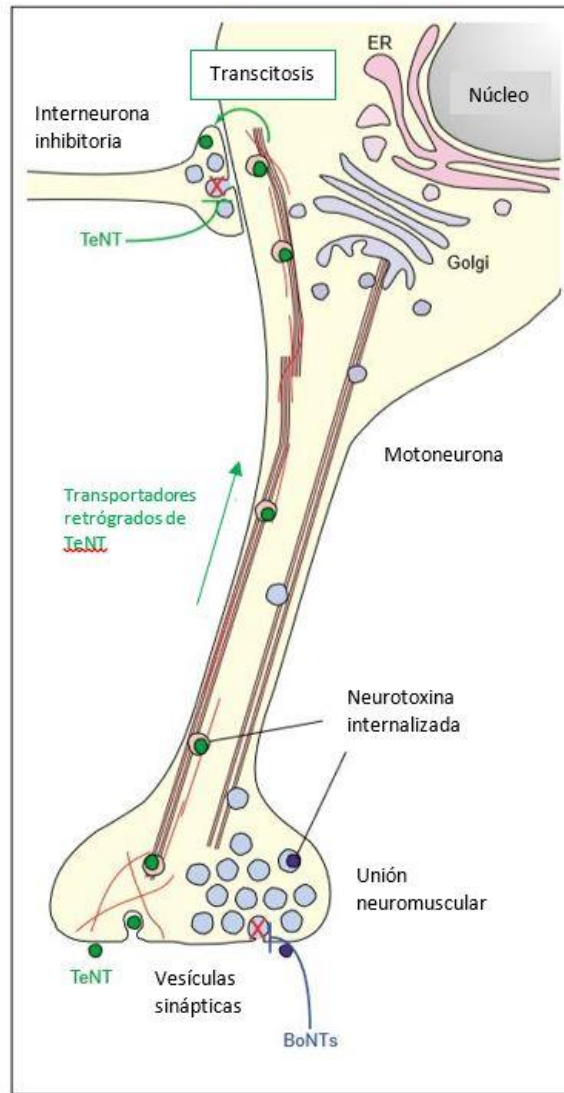


Figura 16. Dibujo esquemático de una motoneurona de mamífero y una interneurona inhibitoria espinal. Se muestran los sitios de acción de la toxina tetánica (TeNT; verde) y de las neurotoxinas botulínicas (BoNTs; azul) y sus rutas de tráfico intracelular. En la unión neuromuscular, las BoNTs son internalizadas en compartimentos endosomales sinápticos, algunos de los cuales pueden coincidir con las vesículas sinápticas. Por otro lado, TeNT sigue la ruta del transporte retrógrado. Los microtúbulos se muestran en marrón oscuro y los microfilamentos de actina en rojo. Las cruces rojas indican los sitios donde las toxinas bloquean la liberación de neurotransmisores; BoNTs en la unión neuromuscular y TeNT en la interneurona inhibitoria espinal.

Figura adaptada 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 vesículas sinápticas durante su exposición al medio externo y son **internalizadas mediante endocitosis vesicular dependiente de receptor**.

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

La 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 **BoNT** interactúan con los gangliósidos y con una proteína. El complejo de neurotoxina-gangliósido, formado primero, interactuaría con un receptor proteico específico para cada toxina individual (en los artículos más recientes la interacción con PSGs y proteína se considera simultánea, *Dong. et al. (2018); Surana et al. (2018)*). La formación de este **complejo trimérico** conduciría a la internalización de la neurotoxina (*Fig. 17*).

En el caso de **TeNT**, esta entraría uniéndose a los gangliósidos como receptores duales.

Los **dominios HC** son los principales responsables de esta interacción de alta afinidad, ya que la parálisis causada por proteínas nativas puede ser contrarrestada por proteínas con HC recombinante.

De acuerdo con el modelo de receptor doble, se han identificado proteínas que podrían 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. 17*).

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. 17*). 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 interactúa con su receptor y se va a servir del proceso endocítico subsiguiente para entrar en la célula y producir su intoxicación.

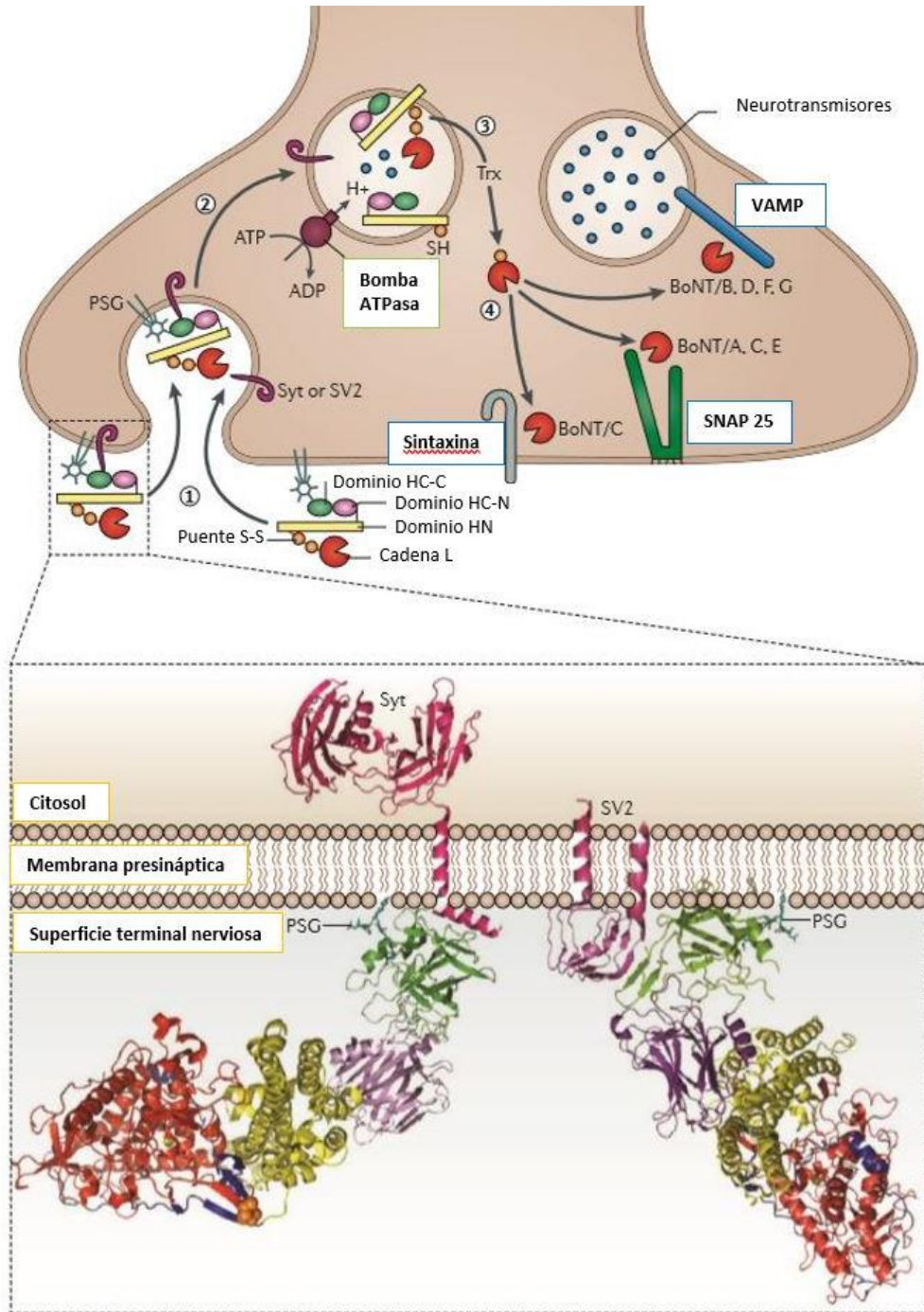


Figura 17. Unión y tráfico de las neurotoxinas botulínicas dentro de los terminales nerviosos. (1) Unión del dominio HC a un receptor polisialogangliósido (PSG) y la posterior unión a un receptor proteico, sinaptotagmina (Syt) o SV2. La estructura cristalizada de la neurotoxina botulínica B (BoNT/B) unida a sinaptotagmina y PSG se muestra en la zona inferior derecha. (2) Endocitosis de la BoNT en vesículas sinápticas. (3) Translocación de la cadena L a través de la membrana de vesícula hacia el citosol. (4) Liberación de la cadena L y acción de las metaloproteinasas.

Figura adaptada de Rossetto et al. (2014)

Una vez internalizada, para que la toxina alcance su blanco, la **cadena L de la toxina 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**. Esta interviene en la recaptura de los neurotransmisores (junto a iones H⁺) dentro de las vesículas sinápticas poco después de la liberación de los mismos por exocitosis (*Fig. 18*). De hecho, cuando se utilizan inhibidores específicos de la ATPasa, no se produce la intoxicación de los terminales nerviosos por las BoNTs.

Así, debido a la acidificación de la vesícula, la BoNT se protona y se produce la translocación. En este proceso **la cadena pesada (HC) se inserta en la membrana** y mantiene la conformación desplegada o parcialmente plegada de la cadena ligera (LC) durante su translocación y liberación tras su replegamiento al pH neutro de citosol. En este ciclo, el canal formado está ocluido por la LC durante el tránsito y se abre tras completarse la translocación y liberación de la cadena L (*Fig. 18*).

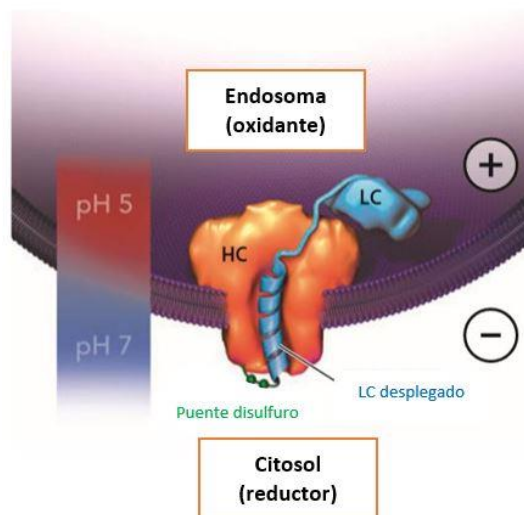


Figura 18. Representación del paso de la cadena LC a través de la cadena HC, proceso dirigido por el gradiente de pH. La cadena pesada (HC; naranja) crea un canal que previene la agregación de la cadena ligera (LC; azul) en el lumen endosomal ácido. Se muestran las dos conformaciones de la LC para resaltar la dinámica de plegamiento durante el tránsito y las interacciones transitorias entre el cargo y el canal. El puente disulfuro entre HC y LC se muestra en verde. Los signos + y - denotan la polaridad del potencial de membrana. **Figura adaptada de Montal (2010).**

Podemos ver que estas toxinas neurotoxigénicas han evolucionado para explotar dos procesos fisiológicos fundamentales que ocurren en los terminales nerviosos: la **endocitosis** de las vesículas nerviosas (para entrar en las neuronas) y el **relleno 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 (HC) que conduce a su inserción en la membrana endosomal. Como consecuencia se va a formar un canal por donde va a ser trasladada la cadena L al citoplasma, donde ésta va a llevar a cabo su acción.

En la *figura 19* se muestra la sucesión de eventos en el proceso de translocación.

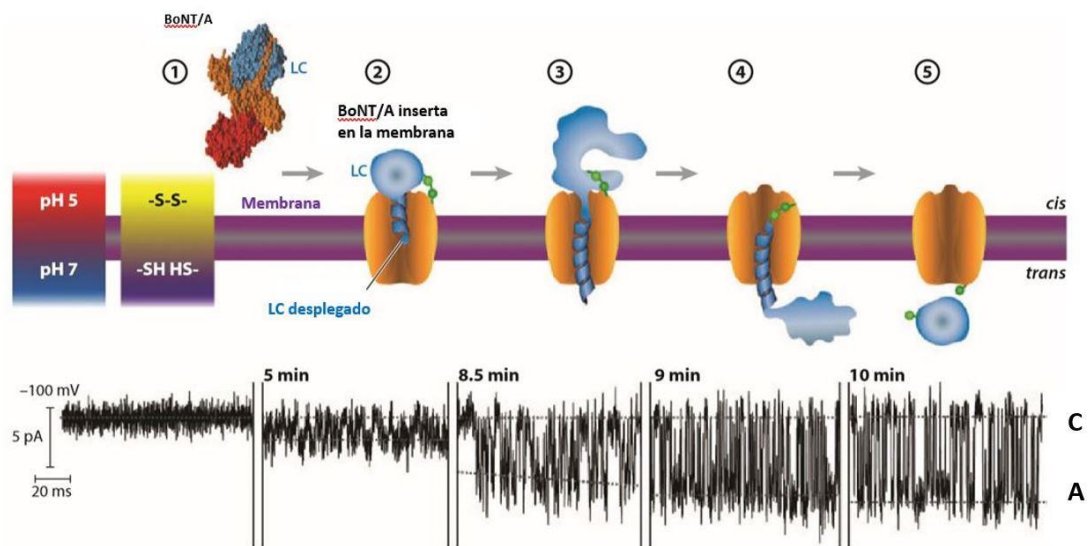


Figura 19. Secuencia de eventos que ocurren durante la translocación de la LC a través del canal formado por la HC. (1) Holotoxina BoNT/A antes de su inserción en la membrana ; se representa la estructura cristalizada de BoNT/A (PDB 3BTA) . (2) Proceso de entrada en la membrana, pasos de transferencia (3 y 4) y evento de salida (5). En la parte inferior se muestran los cambios de corriente asociados a cada paso medidos a -100 mV. C y A se corresponden con los estados abierto y cerrado del canal.

Figura adaptada de Montal (2010).

Finalmente, la cadena L es liberada del dominio HN debido a la acción del sistema tiorredoxina reductasa-tioredoxina (TrxR-Trx), el cual actúa cortando el puente disulfuro que une LC y HC. Las metaloproteinasas de la cadena L BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F y BoNT/G cortan **VAMP**, las de BoNT/A y BoNT/E cortan **SNAP 25** y la de BoNT/C corta **SNAP 25 y syntaxina** inhibiendo la fusión de membranas y la liberación de neurotransmisores, produciéndose por tanto la parálisis característica de esta infección.

Una cuestión intrigante es cómo la cadena ligera, una vez en el citoplasma, evita ser degradada. 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).

El mecanismo molecular responsable de la larga vida de las BoNTs aún no se conoce. A pesar de ser algo deseable desde un punto terapéutico, la larga duración de la acción de BoNTs tras la entrada en las neuronas, punto en el que las toxinas ya no son accesibles a los tratamientos antitoxinas, también es la principal responsable de la severidad de la patología. Conocer estos datos abriría una puerta hacia la mejora de las estrategias terapéuticas mediante el uso de quimeras con distintos fenotipos en las que se elegiría la duración de BoNT, todo ello sin interferir con la sensibilidad a las antitoxinas y otras terapias.

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. La estrategia que utilizan estas bacterias para multiplicarse y diseminarse no es otra que matar a su hospedador para **generar un nicho anaeróbico** que promueva su crecimiento, además de ser capaces de proliferar en materiales biológicos en descomposición procedentes de animales que han muerto por otras causas.

A día de hoy, no se han descubierto posibles funciones de estas toxinas en el ciclo de vida de *Clostridium* (comunicación, señalización, competencia de especies, etc), pero no podemos descartar que el papel principal que desempeñan estas toxinas para la bacteria sea otro, y que la patología que produce en vertebrados sea meramente accidental.

Los clostridios son capaces de sobrevivir y replicar sin necesidad de un hospedador vertebrado, por lo que la producción de las neurotoxinas no se requiere para estos procesos. El origen de la aparición de estas toxinas es desconocido, pero si se han mantenido durante la evolución es debido a que proporcionan a las bacterias una mejora en su crecimiento y difusión, expandiendo las dimensiones de los ambientes favorables para su crecimiento y multiplicación.

7. MÉTODOS DE PREVENCIÓN Y VACUNAS

Las esporas de los clostridios son ubicuas y muy resistentes. Se encuentran en abundancia en el suelo, en materia biológica en descomposición. 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. Vacuna contra el tétanos

La toxina tetánica es una vacuna segura y eficaz. Es muy inmunogénica y genera una protección duradera contra el 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 es uno de los productos más difundidos de la industria biotecnológica.

La vacuna del tétanos está comercializada formando parte de vacunas combinadas que incluyen, además, otros componentes (difteria, tosferina, polio...)

7.2. Prevención contra el tétanos

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.

7.3. Prevención contra el botulismo

El desarrollo del botulismo sigue una vía distinta. Generalmente este microorganismo prolifera en carnes y vegetales conservados en anaerobiosis. 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.).

Históricamente, las personas en riesgo se vacunaban con una forma inactivada con formaldehído de la toxina botulínica, pero esta práctica no continuó debido a una disminución en su eficacia.

Hoy en día se realizan estudios para la fabricación de vacunas basadas en ácidos nucleicos (basadas en plásmidos o en vectores virales), cuyo fundamento es lograr la expresión de dosis inmunizantes de la toxina botulínica, especialmente del dominio HC; y vacunas basadas en proteínas, que consisten en la inoculación de toxinas inactivadas químicamente o de toxinas recombinantes. También es importante la fabricación de vacunas contra el botulismo en animales.

8. LAS TOXINAS DE *CLOSTRIDIUM* COMO AGENTES TERAPÉUTICOS

8.1. Usos de la toxina botulínica

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.

En las distonías, el mecanismo que lleva a cabo la toxina botulínica consiste en disminuir la liberación de acetilcolina por parte de las motoneuronas en la unión neuromuscular, provocando la relajación del músculo esquelético afectado (*Fig 20*).

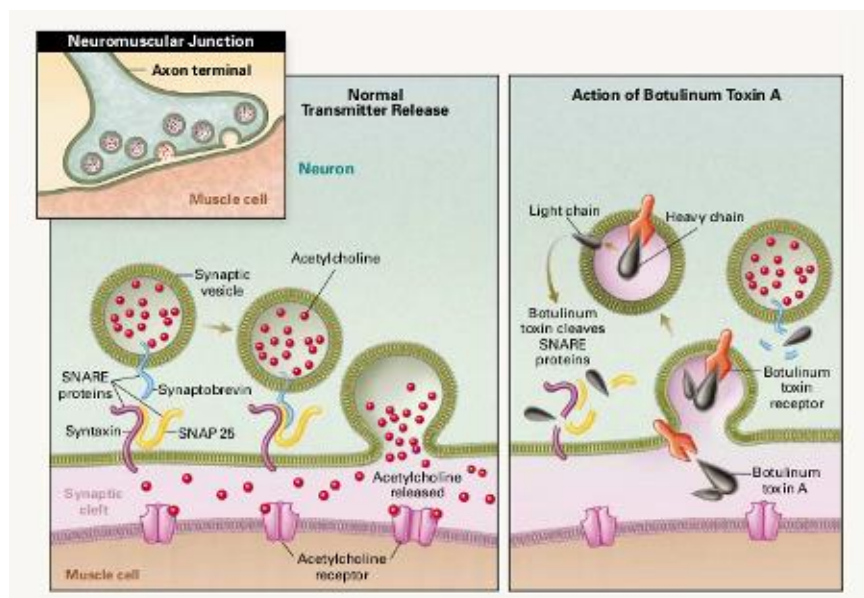


Figura 20. Inhibición de la liberación del neurotransmisor acetilcolina en la unión neuromuscular: la proteólisis de las proteínas SNARE llevada a cabo por la toxina inhibe la fusión de vesículas y liberación del neurotransmisor.

Figura extraída de Rowland (2002).

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 toxina botulínica no solo actúa en la sinapsis colinérgica del músculo esquelético, sino también a nivel del sistema nervioso autónomo, controlando la sudoración, la contracción del músculo liso y esfínteres, las glándulas salivares y las lágrimas. Debido a ello, se utiliza en casos de hiperhidrosis (exceso de sudoración) y problemas urológicos y gastrointestinales.

La remarcable utilidad terapéutica de la toxina botulínica radica en su habilidad para **inhibir, de forma específica y poderosa, la actividad muscular involuntaria** durante un periodo prolongado.

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.

Usos terapéuticos de la toxina botulínica		
Oftalmología		Estrabismo
		Nistagmo
Neurología	<u>Distonías focales</u>	Blefaroespasmos
		Distonía cervical (tortícolis, anterocolis, laterocolis)
		Disfonía laríngea
		Distonía oromandibular
		Distonía Lingual
	<u>Desórdenes no distónicos</u>	Espasmo hemifacial
		Temblor
		Tics
		Bruxismo
	<u>Espasticidad</u> (después de un accidente cerebrovascular, esclerosis múltiple o daño en la	Focal: en extremidades superiores e inferiores

	médula espinal)	
		No focal: hemiplejía espástica
		Parálisis cerebral
	<u>Hiperhidrosis</u>	Focal: axilar, palmar, plantar
		Difusa
	<u>Hipersalivación</u>	Sialorrea (enfermedades de motoneuronas y esclerosis lateral amiotrófica)
		Babeo (síndromes parkinsonianos)
		Síndrome de Frey, sudoración gustativa
	<u>Estética (músculo)</u>	Arrugas en la glabella
Dolor	<u>Muscular</u>	Distonía
		Espasticidad
		Dolor crónico miofascial
		Desórdenes Temporomandibulares
		Dolor lumbar
	<u>No muscular</u>	Migraña
		Dolor neuropático
		Neuralgia del trigémino
		Dolor pélvico
Urología		Disinergia del esfínter detrusor
		Vejiga hiperactiva
		Retención urinaria
		Síndrome de vejiga dolorosa
		Espasmos del suelo pélvico

		Hiperplasia benigna de próstata
Gastroenterología		Acalasia
		Fisuras anales crónicas
Psiquiatría		Depresión

Tabla 2. Usos terapéuticos de la toxina botulínica.

Tabla adaptada de Pirazzini et al. (2017).

Se ha probado en modelos animales que la toxina botulínica podría ser efectiva para el control del dolor, inhibiendo la liberación de otros neurotransmisores implicados en la modulación del dolor (glutamato, sustancia P...), e inhibiendo también la fusión de vesículas que contienen receptores transmembranas que actúan como sensores del dolor (TRP channels: transient receptor potencial channels) y cuya respuesta viene inducida por mediadores inflamatorios.

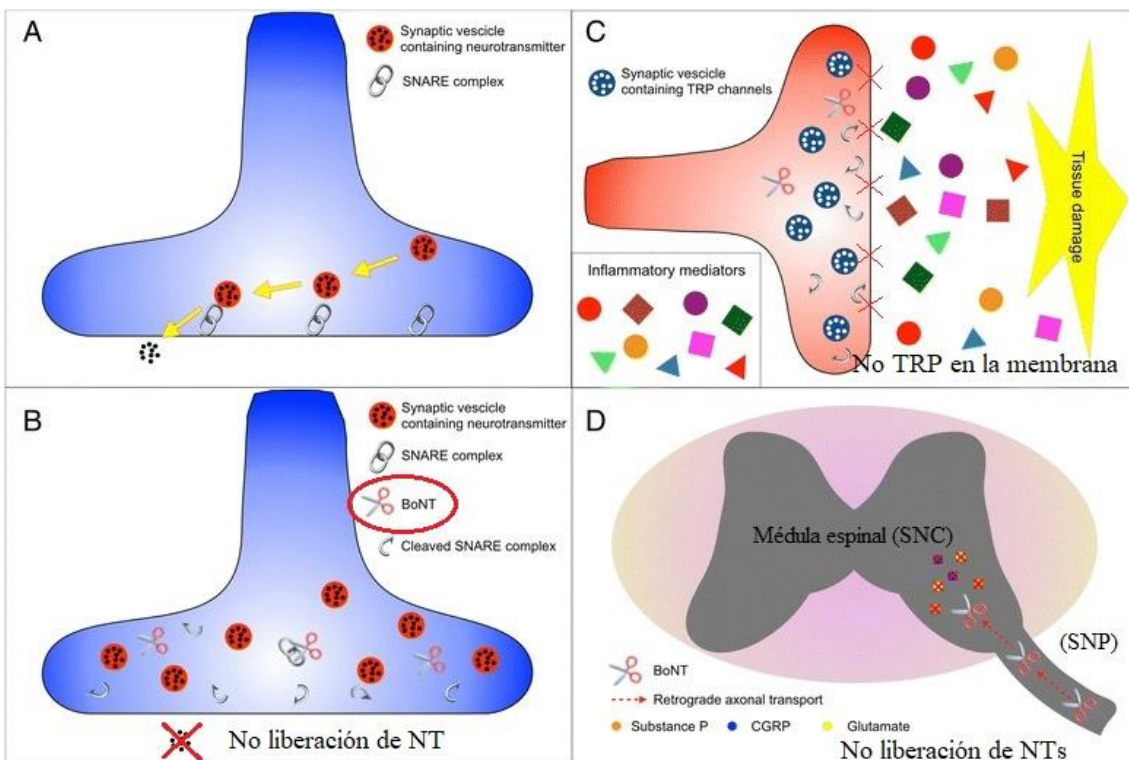


Figura 21. Mecanismos de acción de la toxina botulínica en procesos neurobiológicos del dolor, de acuerdo con estudios en modelos animales.

A: En un axón normal, el complejo SNARE permite la fusión de la membrana de la vesícula sináptica que contiene el neurotransmisor y la membrana plasmática del axón, produciéndose la liberación del neurotransmisor.

B: Efecto de la toxina botulínica, representada con unas tijeras que rompen el complejo SNARE, impidiendo la fusión de vesículas y la liberación de neurotransmisor.

C: El daño tisular provoca la liberación de mediadores inflamatorios (histamina, prostaglandinas, interleuquinas, etc) que inducen la expresión de canales TRP y causa sensibilización del nociceptor periférico. La toxina botulínica rompe el complejo SNARE, bloquea la fusión de vesículas que contienen canales TRP y reduce la sensibilización de los nociceptores periféricos.

D: Transporte axonal retrógrado de la toxina botulínica hasta el asta dorsal de la médula espinal, donde puede bloquear la liberación de neurotransmisores moduladores del dolor, como glutamato, sustancia P y CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina).

Figura adaptada de Sandrini et al. (2017).

Sin embargo, el uso de estas toxinas con fines terapéuticos puede conducir a la producción de anticuerpos, provocando una disminución en la efectividad del tratamiento. Estos pacientes requerirán dosis mayores de la toxina y una mayor frecuencia de administración.

8.2. Usos de la toxina tetánica

El dominio carboxi-terminal (HC) de la toxina tetánica, que mantiene su capacidad para unirse a la membrana de las neuronas y ser transportado al interior, se ha utilizado para construir productos de fusión para hacer llegar diversas proteínas al citoplasma neuronal. Estos estudios plantean la posibilidad de utilizar la toxina tetánica como transportadora de diferentes moléculas a distintas zonas del SNC por inyección.

9. TOXINAS PRODUCIDAS POR *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

C. difficile está presente en pequeños números en la microbiota intestinal normal de las personas. Actualmente, es un problema importante de salud en los países desarrollados, donde es causa de un proceso diarreico conocido como **colitis pseudomembranosa**, causado por una multiplicación de la bacteria a nivel del colon. El proceso habitualmente se desencadena como una consecuencia de la erradicación de la flora saprófita normal por el uso extenso de antibióticos. En estas condiciones, se produce una germinación de las esporas y una multiplicación de la bacteria con consecuencias que pueden ser fatales. Forma parte de las denominadas **infecciones nosocomiales**, y es causa de centenares de miles de muertes al año.

El tratamiento, en buena lógica, está basado en suspender los antibióticos de amplio espectro y utilizar fármacos específicos contra los clostridios, como el **metronidazol** o la **vancomicina**. Este último fármaco, por ejemplo, es el que se utiliza cuando la paciente infectada está embarazada. Además, se han reportado algunos casos de diarrea asociada a *Clostridium difficile* que mejoran significativamente tras el tratamiento con vancomicina.

No obstante, debido al aumento de la resistencia a estos antibióticos, se están intentando desarrollar nuevas terapias efectivas. En concreto, actualmente se está centrando la investigación en el desarrollo de **inmunoterapias contra *C. difficile*** que tienen como diana alguna de las toxinas o alguno de los componentes de la superficie de *Clostridium*. Mientras que las primeras (neutralización de toxinas) pueden prevenir los signos clínicos, el segundo tipo de inmunoterapia impide el primer paso de la colonización del intestino por *C. difficile*.

A día de hoy, solamente una estrategia ha sido testada con éxito en ensayos clínicos de fase 1 y permite desencadenar tanto la respuesta inmunitaria sistémica como la propia de la mucosa intestinal. Se trata de una vacuna compuesta por la combinación de un antígeno de la toxina y un componente de las esporas expresados en la superficie de esporas de *Bacillus subtilis* inactivados (CDVAX)(NCT02991417).

La enfermedad es una causa directa de los efectos desencadenados por las toxinas que produce la bacteria. Siendo las principales **TcdA**, **TcdB** y **CDT**.

9.1. Toxinas TcdA y TcdB

Los genes codificantes para estas toxinas (*tcdA* y *tcdB*) forman parte de un locus de patogenicidad de 19,6 kb, en el que se encuentran otros tres genes: los productos de expresión de los genes *tcdC* y *tcdR* están implicados en la regulación de la expresión de los genes de las toxinas TcdA y TcdB, mientras que el otro gen, *tcdE*, codifica para una holina (proteínas típicas de bacteriófagos) que se requiere para la secreción de las toxinas (Fig. 22). Este locus de patogenicidad parece haberse adquirido por transferencia génica horizontal, ya que las cepas no toxigénicas de esta especie carecen del mismo.

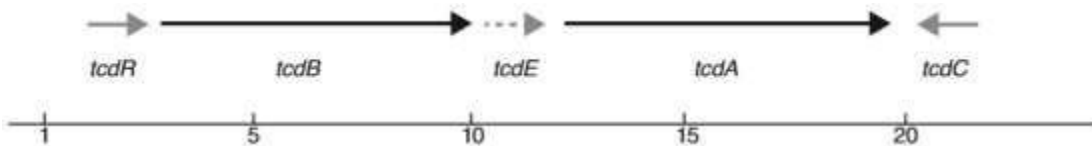


Figura 22. Esquema del locus de patogenicidad que contiene los genes que codifican las dos toxinas *tcdA* y *tcdB* (flechas negras), los genes reguladores *tcdR* y *tcdC* (flechas grises) y la holina (flecha punteada).

Figura extraída de Rodríguez-Pardo et al. (2013).

La expresión de las toxinas es regulada por **señales ambientales**. Así la presencia de ácidos grasos de cadena corta (p. ej. butirato) y alta temperatura (37°C) estimulan la producción de las toxinas. Los antibióticos no sólo disminuyen la biodiversidad de la microbiota intestinal, también se asocian con una disminución de los niveles de ácidos grasos de cadena corta, aminoácidos y sales biliares primarias. Los ácidos grasos de cadena corta regulan múltiples procesos, incluyendo la proliferación y diferenciación celular, la activación de respuesta inflamatoria y el reclutamiento de neutrófilos.

Las toxinas TcdA y TcdB tienen una longitud de 2710 y 2366 aminoácidos, respectivamente, y muestran un 48% de identidad de secuencia (Fig. 23). En su estructura se han definido cuatro dominios. La región N-terminal alberga el **dominio A**, responsable de la **actividad glucosiltransferasa** con la que la toxina modifica a las proteínas Rho. La región C-terminal, o **dominio B**, es considerado el lugar de **unión al receptor**. El **dominio C** posee una función **proteasa**. Y el **dominio D** sería el encargado de **liberar la toxina al citoplasma de la célula blanco**. En el interior del dominio D se encuentra una secuencia hidrofóbica (HP) (aminoácidos 958-1.130 en TcdA y 956-1.128 en TcdB) que probablemente desempeñe un papel importante en la translocación de la toxina.

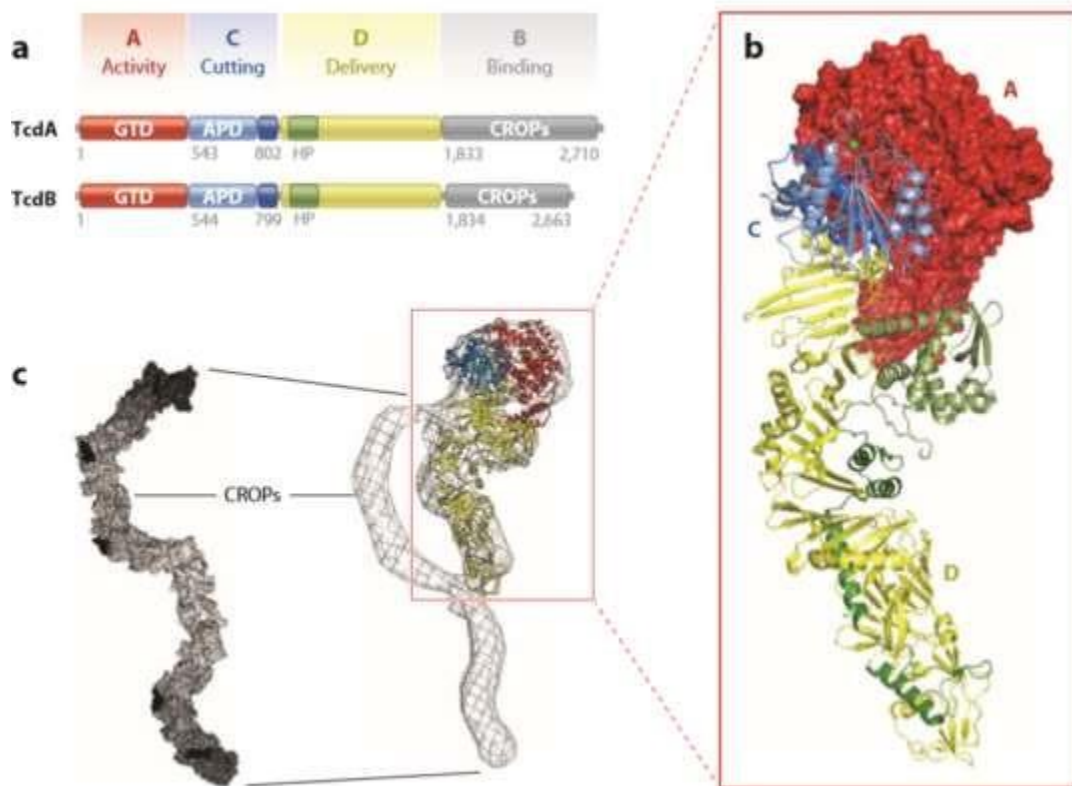


Figura 23. Estructura de las toxinas A (TcdA) y B (TcdB) de *C. difficile*. (a) Secuencias de TcdA y TcdB. Ambas toxinas contienen cuatro dominios. El dominio A es una glucosiltransferasa. El dominio B contiene una combinación repetida de oligopéptidos (CROPs) y está implicada en la unión o “binding”. El dominio C es un dominio autoproteasa y está conectado al dominio D a partir de una triple hélice (en azul oscuro). El dominio D está implicado en la liberación de la toxina y en la unión a las células huésped. El interior del dominio D contiene una secuencia hidrofóbica (HP) (aminoácidos 958-1.130 en TcdA y 956-1.128 en TcdB) que probablemente desempeñe un papel importante en la translocación de la toxina. (b) La estructura cristalina de los dominios A, C y D de TcdA. Falta el dominio compuesto por CROPs. (c) Modelo de la longitud total de la toxina de acuerdo con el análisis “single- particle” de la holotoxina.

Figura extraída de Aktories et al. (2017).

El dominio B de ambas toxinas posee una estructura interna repetida formada por repeticiones denominadas **CROPs** ('combined repetitive peptides'). En concreto, el dominio de unión al receptor de TcdA consta de 37 repeticiones CROPs, mientras que el de TcdB está formado por 19 repeticiones (*Fig. 24*). Cada toxina puede interactuar con receptores específicos: La toxina TcdA interactúa con alta afinidad con glicanos, y en las células humanas interactuaría con la estructura GalNAc-(1,3)- β -Gal-(1,4)- β -GlcNAc; si bien, la molécula que actúa como receptor no se conoce. Como receptor para la toxina TcdB se ha identificado al condroitin sulfato proteoglicano 4 (**CSPG4**) y la proteína Frizzled (**FZD**).

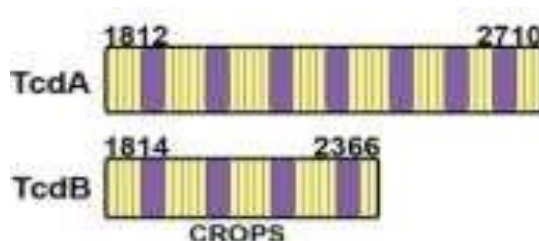


Figura 24. Estructura esquemática del dominio CROPs de TcdA y TcdB. Ambos consisten en una serie de secuencias repetidas cortas (en amarillo) intercaladas por secuencias repetidas largas (en violeta).

Figura extraída de Chandrasekaran et al. (2017).

CSPG4 (también conocido como HMWMAA [“high molecular weight melanoma-associated antigen”], NG2 [“nerve/glia antigen 2”] o como gp240) es una proteína transmembrana (*Fig. 25*). CSPG4 se expresa en varios tipos de células progenitoras (mesenquimáticas, perivasculares, mioblásticas, condroblásticas y oligodendrocíticas) y se encuentra sobre-expresado en varios tipos de tumores (melanoma, glioblastoma y cáncer de mama). Se ha sugerido que esta molécula intervendría en diversas funciones celulares, tales como la proliferación, la diferenciación, la migración y la polaridad celular. La proteína Frizzled (FZD) también parece actuar como receptor para la entrada de TcdB. La proteína FZD es una proteína con siete dominios transmembrana, y está implicada en la vía de señalización Wnt ('Wingless-related integration site').

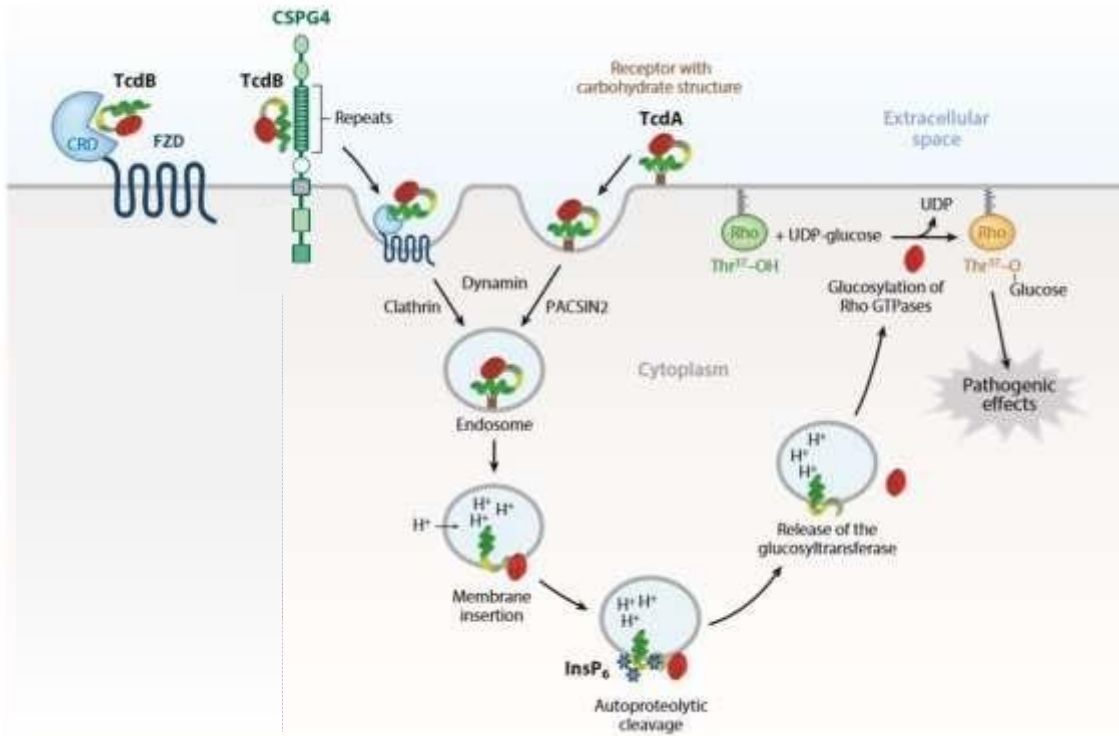


Figura 25. Unión y funcionamiento de TcdA y TcdB. Tanto CSPG4 como Frizzled (FZD) son los receptores presentes en la célula huésped para TcdB. Tras la unión, la toxina TcdB es endocitada en un proceso mediado por clatrina y dinamina. Algunos carbohidratos son los receptores para TcdA. PACSIN2 (syndapina-II) y dinamina, aunque no clatrina, están implicadas en la endocitosis de TcdA. Ambas toxinas llegan a compartimentos endosomales acidificados donde terminan insertándose en sus membranas endosomales y translocándose al citosol, al menos su dominio glucosiltransferasa (GTD) y su dominio autoproteolítico. El inositol hexakisfosfato (InsP6) citosólico activa la capacidad proteasa de las toxinas, liberándose el dominio GTD de las toxinas en el citosol. GTD se transloca a la membrana celular a través de su dominio N-terminal. Aquí, las proteínas Rho son glicosiladas (RhoA en la Thr37; Cdc42 y Rac en la Thr35). La modificación de las proteínas Rho causa efectos patológicos en el hospedador.

Figura adaptada de Aktories et al. (2017).

TcdB se une a partir de una región carente de secuencias CROPs al dominio rico en cisteínas (CRD) de FZD. La unión a CSPG4, sin embargo, se produce a través de los dominios CROPs de TcdB.

Ambas toxinas entran mediante la vía endocítica; cuando el endosoma se acidifica, se produce una translocación a la parte citosólica del dominio glucosiltransferasa (GTD). La interacción del dominio proteasa con inositol hexakisfosfato (InsP6), presente en el citosol, promueve su actividad autoproteasa, produciendo un corte en la toxina, quedando libre el dominio GTD en el citosol. Este se dirige a la membrana para glicosilar a las proteínas Rho, lo que va a producir importantes alteraciones en la célula.

Mediante su actividad glicosiltransferasa, las toxinas TcdA y TcdB transfieren una glucosa a treoninas específicas de las proteínas Rho. Utilizan la molécula UDP-glucosa como fuente de glucosa. Esta modificación es irreversible, ya que las células humanas no poseen en su citoplasma glucosidasas con capacidad de romper los enlaces α -anoméricos generados.

Son varias las proteínas de la familia Rho que son modificadas por estas toxinas, las principales son **RhoA**, **RhoB**, **RhoC**, **Rac** y **Cdc42**. Cada una de las toxinas, TcdA y TcdB, muestran una preferencia distinta por cada una de las proteínas-substrato.

Las proteínas de la familia Rho, son proteínas pequeñas de unión a GTP, que se enmarcan dentro de la superfamilia Ras. Existen alrededor de 20 miembros en la familia Rho. Actúan como interruptores moleculares de un gran número de procesos de señalización celular. Así, son reguladores clave de la arquitectura del citoesqueleto y controlan procesos relacionados con la migración celular, la fagocitosis, la producción de citoquinas y O_2^- , la señalización de la respuesta inmunitaria y el tráfico intracelular. Pero, además, regulan la transcripción, la progresión del ciclo celular y la apoptosis.

Su función de interruptor molecular es controlada mediante el denominado **ciclo GTPasa** (*Fig. 26*). Las proteínas Rho están inactivas cuando se encuentran unidas a GDP y se activan tras la unión a GTP. En este ciclo intervienen proteínas **GEF** ('guanine nucleotide exchange factor') que promueven el intercambio GDP/GTP y, por tanto, activan a las proteínas Rho. Las proteínas Rho se 'apagan' cuando se produce la hidrólisis del GTP, que es estimulada por las proteínas **GAP** ('GTPase-activating proteins').

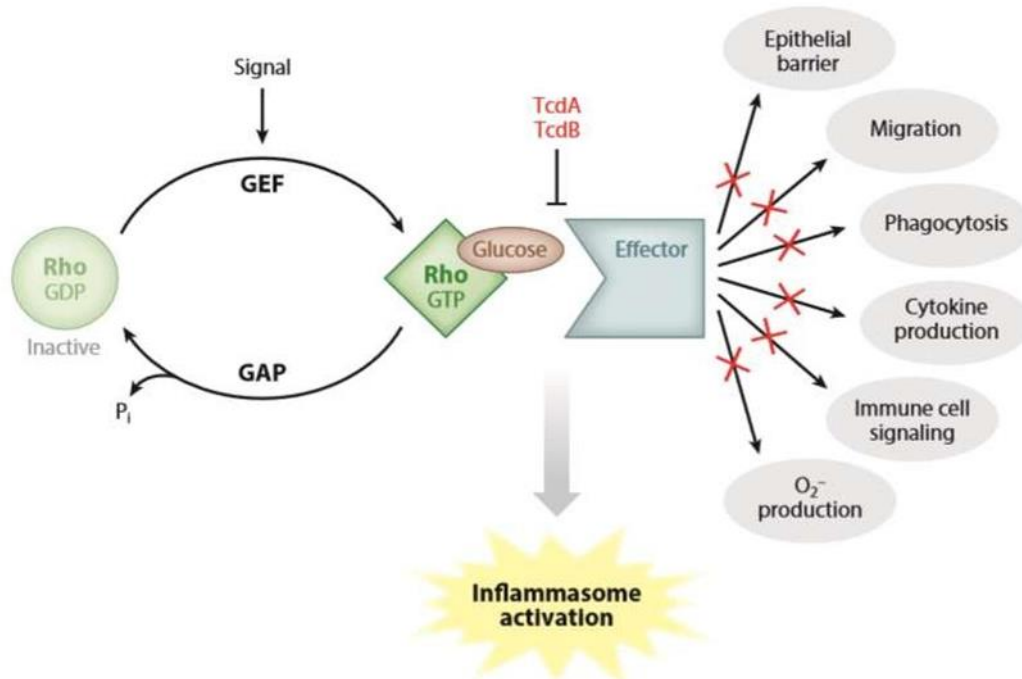


Figura 26. Ciclo GTPasa e inhibición por TcdA y TcdB. Las Rho GTPasas son inactivas cuando se encuentran unidas a GDP y activas cuando se encuentran unidas a GTP. Las proteínas GEF (“guanine nucleotide exchange factors”) activan a las proteínas Rho mediante el intercambio de GDP por GTP. Las proteínas GAP (“GTP-ase activating proteins”) facilitan la hidrólisis de GTP e inhiben el estado activo de las proteínas Rho. Rho activo interacciona con múltiples efectores para controlar funciones celulares fundamentales. La glucosilación de RhoA en Thr37 (y Rac y Cdc42 en Thr35) bloquea la interacción con estos efectores. Varias vías de señalización y funciones celulares cruciales para la interacción huésped-patógeno (por ejemplo, funciones de la barrera epitelial, migración, fagocitosis, producción de citoquinas, respuesta inmune celular y producción de radicales O_2^-) se ven, por tanto, alteradas. Por otro lado, la inactivación de RhoA por glucosilación activa el inflamasoma.

Figura extraída de Aktories et al. (2017).

La glicosilación de las proteínas Rho por parte de las toxinas TcdA y TcdB ocurre en una treonina muy conservada (posición 35 o 37) en todos los miembros de la familia. Concretamente, se produce la transferencia de la glucosa a la treonina 37 en el caso de la proteína RhoA; mientras que en los casos de Cdc42 y Rac, la glicosilación tiene lugar sobre la treonina 35. Esta treonina está implicada en la interacción con el ion magnesio, que es esencial para la unión del nucleótido. La glicosilación de las proteínas Rho las mantiene en un estado inactivo, en el que son incapaces de interactuar con sus efectores.

Entre los efectos más inmediatos que producen las toxinas se encuentra la disminución de los contactos célula-a-célula y la adhesión celular, lo que va a producir una **alteración de la barrera intestinal**.

También se ha encontrado que inducen apoptosis y también piroptosis en las células, así como necrosis. En concreto, TcdB causa una forma necrótica de muerte celular que no requiere de las actividades de autoprosesamiento ni de glucosiltransferasa de la toxina, sino que TcdB induce directamente necrosis promoviendo el ensamblaje de los complejos NADPH oxidasa (NOX) a los endosomas, generándose especies reactivas de oxígeno que inducen la muerte celular programada (Fig. 27).

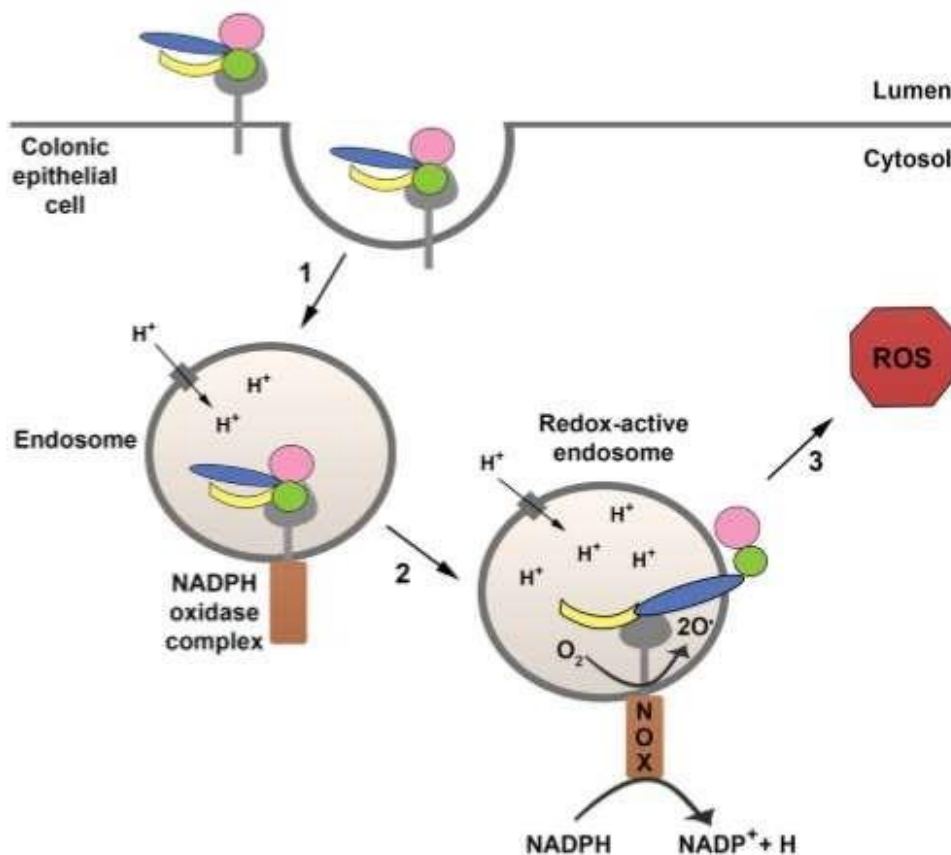


Figura 27. Necrosis inducida por TcdB. A altas concentraciones, TcdB causa una forma necrótica de muerte celular que no requiere de autoprosesamiento ni de actividad glucosiltransferasa por parte de las toxinas. TcdB induce necrosis promoviendo el ensamblaje del complejo NADPH oxidasa (NOX) a los endosomas (paso 1). El complejo, una vez ensamblado en la membrana endosomal, media la transferencia de un electrón procedente del NADPH al oxígeno molecular, resultando en la generación de superóxido (paso 2) y de especies reactivas de oxígeno (ROS) (paso 3). Niveles elevados de ROS promueven la necrosis celular probablemente a través de daño en el DNA, peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y/o disfunción mitocondrial.

Figura extraída de Chandrasekaran et al. (2017).

9.2. La toxina binaria CDT (“*C. difficile* transferase toxin”)

Esta toxina la producen **solo algunas cepas de *C. difficile***, pero su producción está asociada a un fenotipo de **hipervirulencia de la bacteria**, por ser causa de mayor morbilidad y mortalidad.

CDT pertenece a la familia de **toxinas binarias con actividad de ADP-ribosilación**. La toxina consta del componente de unión a receptor, CDTb (98,8 kDa, 876 aminoácidos), que está relacionado con el antígeno protector (PA) de la toxina ántrax, y del componente CDTa, que tiene actividad ribosil-transferasa (más en concreto su dominio C-terminal). Tras la rotura proteolítica de CDTb, y la liberación de un fragmento N-terminal de 20-kDa, este componente tiende a **oligomerizar en estructuras heptaméricas** (Fig. 28).

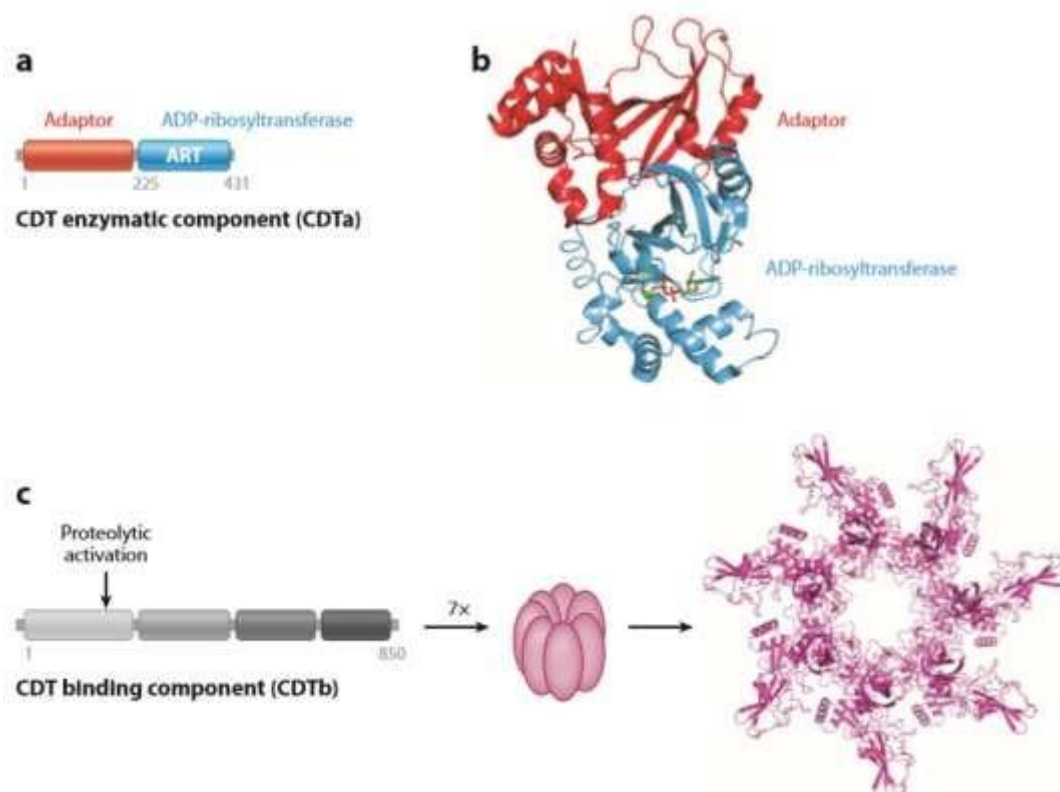


Figura 28. (a) CDT está formado por dos componentes: CDTa, que es una ADP-ribosiltransferasa que modifica la actina, y CDTb, que es el componente de unión. Tras la activación proteolítica, CDTb forma heptámeros. (b) CDTa está compuesto por dos dominios. Ambos dominios tienen el mismo plegamiento tipo ADP-ribosiltransferasa. El dominio N-terminal, no obstante, actúa como adaptador e interactúa con CDTb, mientras que el dominio C-terminal posee la actividad ADP-ribosiltransferasa. (c) Estructura del componente de unión (CDTb) de la toxina C2 de *Clostridium botulinum* en su forma heptamérica. Siete protómeros de toxina forman un complejo con un poro central de aproximadamente 2nm.

Figura obtenida de Aktories et al. (2017).

CDT se une al receptor de lipoproteínas **LSR** ('lipolysis-stimulated lipoprotein receptor'), expresado de forma abundante en intestino, pulmón y riñón. Su función es la de captar lipoproteínas ricas en triglicéridos que contienen apoB y apoE. Tras la interacción con el receptor, CDT es endocitada, y como consecuencia de la acidificación se produce un cambio conformacional en el complejo CDTb, que oligomeriza (heptámero) permitiendo la formación de un **poro transmembrana** a través del cual la subunidad CDTa accede al citoplasma.

En el citosol, **CDTa ADP-ribosila a G-actina**, lo que le impide polimerizar y, en consecuencia, **se inhibe la polimerización de actina** (Fig. 29). Esto va a provocar grandes cambios en la morfología celular, graves alteraciones de la barrera del epitelio intestinal, además de otras funciones celulares como son la migración, la fagocitosis y los procesos de endocitosis/exocitosis.

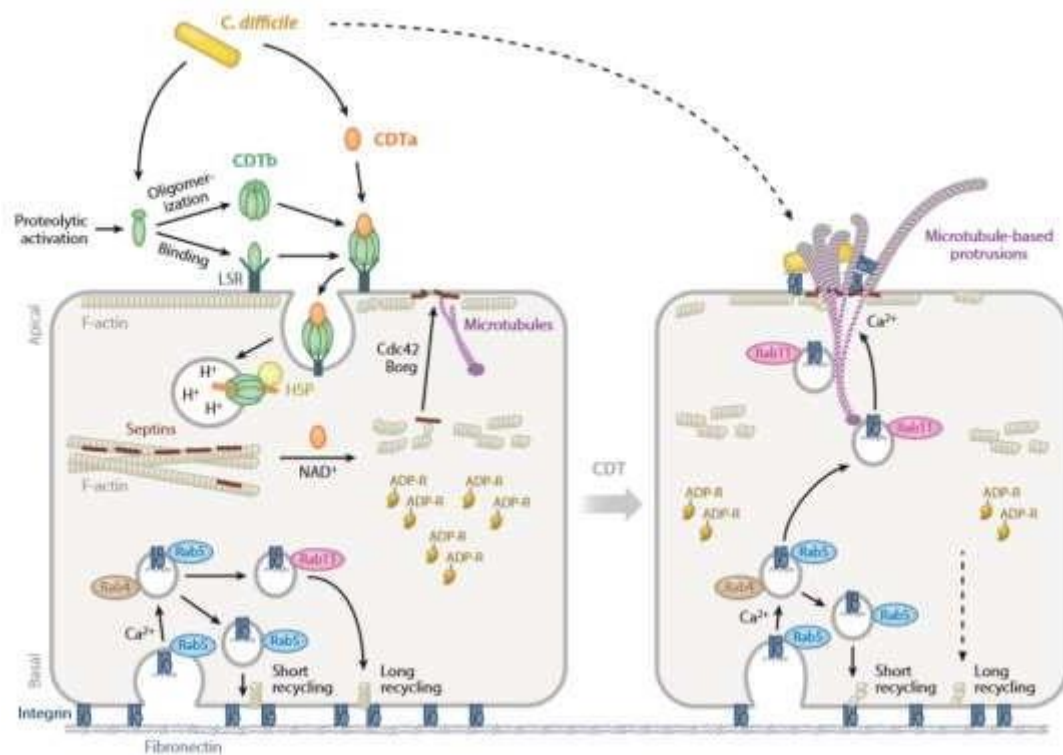


Figura 29. Acción de la toxina binaria CDT sobre actina, microtúbulos y vesículas de tráfico. *Clostridium difficile* libera los dos componentes de la toxina CDT: CDTa y CDTb. El componente monomérico de unión (CDTb) o el oligómero de éste se unen a su receptor de membrana, el receptor LSR ("lipolysis-stimulated lipoprotein receptor"). Tras ello, el componente CDTa se une a CDTb. El complejo toxina-receptor es entonces endocitado. La bajada de pH en el interior del endosoma provoca que el heptámero de CDTb se inserte en la membrana y forme un poro central a través del que CDTa es translocado al citosol. Esta translocación es facilitada por chaperonas, incluida HSP90 (HSP), y ciclofilinas. En el citosol G-actina es ADP-ribosilada. La actina ADP-ribosilada es incapaz de polimerizar. Además, actúa como proteína de "capping" para prevenir la polimerización de aquellas

moléculas de actina no modificadas. Como consecuencia, numerosas funciones dependientes de actina se van a ver alteradas. La depolimerización de actina afecta al sistema de microtúbulos e induce la formación de protusiones celulares basadas en estos microtúbulos. Además, la depolimerización de F-actina inducida por CDT altera la endocitosis dependiente de integrinas y el reciclaje de proteínas de la matriz extracelular como fibronectina. Las vesículas asociadas a Rab11 que contienen fibronectina son redirigidas a la membrana apical a través de microtúbulos. Las protusiones basadas en microtúbulos y fibronectina interaccionan con los clostridios.

Figura extraída de Aktories et al. (2017).

Más en concreto, la despolimerización de F-actina inducida por CDT altera la endocitosis dependiente de integrinas y el reciclaje de proteínas de la matriz extracelular como **fibronectina**. De esta manera, las vesículas que contienen fibronectina (que se encuentran asociadas a Rab11 en su membrana) en vez de dirigirse de nuevo a la membrana basal de las células epiteliales, son redirigidas a la membrana apical a través de microtúbulos.

La ADP-ribosilación de actina por parte de CDT también va a afectar a la organización y dinámica de los microtúbulos (filamentos formados por heterodímeros de α - y β -tubulina). Los microtúbulos tienen una estructura polarizada, crecen rápidamente por un extremo (denominado más o 'plus'). El crecimiento de los microtúbulos hacia la membrana celular normalmente es impedido por el contacto con la capa cortical de actina, subyacente a la membrana celular, mediante un proceso que se denomina 'captura de microtúbulos'. La actividad CDT, por su efecto despolimerizante de actina, altera esta función de captura de microtúbulos y en las células se forman **protuberancias en la membrana** como consecuencia del crecimiento descontrolado de los microtúbulos. Estas protuberancias pueden alcanzar varios cientos de micras. Estas largas protuberancias de la superficie de las células epiteliales, sumado al **aumento de los niveles de fibronectina en la cara apical** de las células epiteliales debido a un reciclaje defectuoso, van a favorecer la adherencia de la bacteria.

REFERENCIAS

- **Aktories, K., Schwan, C., & Jank, T.** (2017). *Clostridium difficile toxin biology*. *Annu. Rev. Microbiol.* 71, 281–307.
- **Al-Hinai, M.A., Jones S.W., & Papoutsakis E.T.** (2015). *The Clostridium sporulation programs: diversity and preservation of endospore differentiation*. *Microbiol Mol Biol Rev*; 79(1):19-37.
- **Blum, F. C., Chen, C., Kroken, A. R., & Barbieri, J. T.** (2012). *Tetanus Toxin and Botulinum Toxin A Utilize Unique Mechanisms To Enter Neurons of the Central Nervous System*. *Infection and Immunity*, 80(5), 1662–1669.
- **Carter, A.T., & Peck, M.W.** (2015). *Genomes, neurotoxins and biology of Clostridium botulinum Group I and Group II*. *Research in Microbiology* 166 (2015) 303-317.
- **Chandrasekaran, R., & Lacy, DB.** (2017). *The role of toxins in Clostridium difficile infection*. *FEMS Microbiology Reviews*, 41, 2017, 723–750.
- **Connan, C., & Popoff, M. R.** (2017). *Uptake of Clostridial Neurotoxins into Cells and Dissemination*. *Uptake and Trafficking of Protein Toxins*, 39–78.
- **Di Bella, S., Ascenzi, P., Siarakas, S., Petrosillo, N., & di Masi, A.** (2016). *Clostridium difficile Toxins A and B: Insights into pathogenic properties and extraintestinal effects*. *Rev. Toxins.* 8, 134;
- **Dong, M., Masuyer, G., & Stenmark, P.** (2018). *Botulinum and Tetanus Neurotoxins*. *Annual Review of Biochemistry*, 88(1).
- **Humeau, Y., Doussau, F., Grant, NJ., & Poulain, B.** (2000). *How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release*. *Biochimie*, Volume 82, Issue 5, Pages 427-446.
- **Lalli, G., Bohnert, S., Deinhardt, K., Verastegui, C., & Schiavo, G.** (2003). *The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons*. *Trends in Microbiology*, 11(9), 431–437.
- **Masuyer, G., Conrad, J., & Stenmark, P.** (2017). *The structure of the tetanus toxin reveals pH-mediated domain dynamics*. *EMBO reports*, 18(8), 1306-1317.
- **Meyer, L., Espinoza, R., & Quera, PR.** (2014). *Infeción por Clostridium difficile: epidemiología, diagnóstico estrategias terapéuticas*. *Rev. Med. Clin. Condes.* 25(3), 473-484.
- **Montal, M.** (2010). *Botulinum Neurotoxin: A Marvel of Protein Design*. *Annual Review of Biochemistry*, 79(1), 591–617.

- **Montecucco, C., & Rasotto, M.B.** (2015). *On botulinum neurotoxin variability*. MBio. 2015;6(1):e02131-14.
- **Montecucco, C., & Schiavo, G.** (1994). *Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins*. Mol Microbiol; 13(1):1-8.
- **Parker, N.** (2016). *Microbiology*. Editorial: Openstax.
- **Péchiné, S., Bruxelles, JF., Janoir, C., & Collignon, A.** (2018). *Targeting Clostridium difficile Surface Components to Develop Immunotherapeutic Strategies Against Clostridium difficile Infection*. Front. Microbiol. 9:1009.
- **Pellett, S., Bradshaw, M., Tepp, W. H., Pier, C. L., Whitemarsh, R. C. M., Chen, C., Johnson, E. A.** (2018). *The Light Chain Defines the Duration of Action of Botulinum Toxin Serotype A Subtypes*. mBio, 9(2).
- **Pirazzini, M., Rossetto, O., Eleopra, R., & Montecucco, C.** (2017). *Botulinum Neurotoxins: Biology, Pharmacology, and Toxicology*. Pharmacological Reviews; 69(2)200.
- **Rodríguez-Pardo, D., Mirelis, B., & Navarro, F.** (2013). *Infecciones producidas por Clostridium difficile*. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 31(4), 254-263.
- **Rossetto, O., Deloye, F., Poulain, B., Pellizzari, R., Schiavo, G., & Montecucco, C.** (1995). *The metallo-proteinase activity of tetanus and botulism neurotoxins*. J Physiol Paris; 89(1):43-50.
- **Rossetto, O., Pirazzini, M., & Montecucco, C.** (2014). *Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights*. Nature Reviews Microbiology, 12(8), 535–549.
- **Rossetto, O., Scorzeto, M., Megighian, A., & Montecucco, C.** (2013). *Tetanus neurotoxin*. Toxicon. Volume 66, Pages 59-63.
- **Rowland, L.P.** (2002). *Stroke, spasticity, and botulinum toxin*. N Engl J Med. 2002 Aug 8;347(6):382-3.
- **Rummel, A.** (2016). *Two Feet on the Membrane: Uptake of Clostridial Neurotoxins*. Uptake and Trafficking of Protein Toxins, 1–37.
- **Sabah, T S.** (2015). *Diarrea asociada a antibióticos*. Rev. Med. Clin. Condes. 26(5), 687-695.
- **Sandrini, G., de Icco, R., Tassorelli, C., Smania, N., & Tamburin, S.** (2017). *Botulinum neurotoxin type A for the treatment of pain: not just in migraine and trigeminal neuralgia*. J Headache Pain. 2017;18(1):38.
- **Sundeen, G., & Barbieri, J.T.** (2017). *Vaccines against Botulism*. Toxins (Basel). 2017;9(9):268.

- **Surana, S., Tosolini, A. P., Meyer, I. F. G., Fellows, A. D., Novoselov, S. S., & Schiavo, G.** (2018). *The travel diaries of tetanus and botulinum neurotoxins*. *Toxicon*, 147, 58–67.
- **Turton, K., Chaddock, J.A. & Acharya, K.R.** (2002). *Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility*. *TRENDS in Biochemical Sciences Vol.27 No.11, P552-558*

SITIOS DE INTERÉS EN INTERNET

- **Centro Nacional de Epidemiología. CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). Instituto de Salud Carlos III.** (2017). Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual 2015.
http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/pdf_2017/RENAVE_INFORME_ANUAL_2015.pdf
- **Comité Asesor de Vacunas de la AEP.** (2018). VACUNA TÉTANOS.
<https://vacunasaep.org/familias/vacunas-una-a-una/vacuna-tetanos>
- **The Center for Food Security and Public Health.** (2018). Botulism.
<http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/disease.php?name=botulism&lang=es>
- **World Health Organization website.** (2018). Tétanos.
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tetanus>.
- **World Health Organization website.** (2018). Botulismo.
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/botulism>.