

TEMA 15 - GÉNERO CLOSTRIDIUM

MARCOS FEMENÍA MUIÑA
LUCIA DOMÍNGUEZ ESTEBAN
LAURA MANSO PÉREZ



FACULTAD DE
CIENCIAS

Microbiología clínica

Grado en Bioquímica
Departamento de Biología Molecular
JMRR-UAM © 2022

UAM

Universidad Autónoma
de Madrid

CONTENIDO

1. Introducción	3
2. Características de las neurotoxinas	8
3. Aspectos estructurales de las toxinas clostridiales	9
3.1. Estructura de la cadena L	11
3.2. Estructura de la cadena H	13
4. Mecanismo de acción de las neurotoxinas	13
4.1. Actividad metaloproteínasa	13
5. Unión, internalización y transporte de las neurotoxinas	15
5.1. Receptores para neurotoxinas	17
6. Significado evolutivo de las neurotoxinas	20
7. Métodos de prevención y vacunas	21
8. Las toxinas de <i>Clostridium</i> como agentes terapéuticos	22
8.1. Botox facial	23
9. Toxinas producidas por <i>Clostridium difficile</i>	25
9.1. Toxinas TcdA y TcdB	25
9.2. La toxina binaria CDT (<i>C. difficile</i> transferase toxin)	30
10. Referencias	34

1. Introducción

Las bacterias que constituyen el género *Clostridium* son bacilos gram-positivos, 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. La amplia distribución de los clostridios en la naturaleza provoca que con elevada frecuencia contaminen heridas, 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, 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 (Fig. 1):

1. Clostridios neurotóxicos: *C. tetani* (Fig. 1A) y *C. botulinum* (Fig. 1B).
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: *C. perfringens* (tipo A y C) y *C. difficile* (Fig. 1C).
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*.

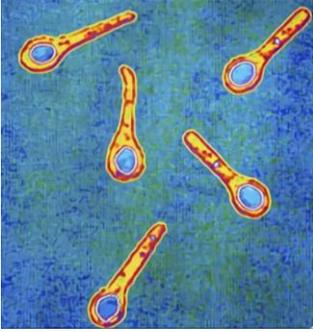
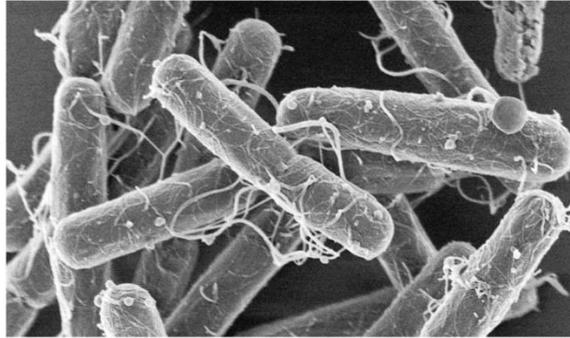
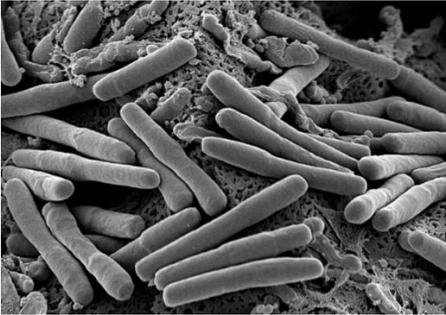
A**B****C**

Figura 1. Principales especies de *Clostridium* tratadas en este capítulo. A. Imagen de microscopía electrónica de transmisión coloreada de *Clostridium tetani*. B. Imagen de microscopía electrónica de barrido de células vegetativas de *Clostridium botulinum*. C. Imagen de microscopía electrónica de barrido de *Clostridium difficile*.

Imagen A. [Alfred Pasioka](#).

Imagen B. [Skarin, \(2015\)](#).

Imagen C. [Robert Koch Institut](#).

Este capítulo está centrado en las neurotoxinas producidas por patógenos del género *Clostridium*, aunque también se incluye un apartado final sobre las toxinas producidas por *C. difficile*.

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 espásmica generalizada, que suele tener un desenlace fatal por colapso cardíaco e insuficiencia respiratoria (Fig. 2A). Incluso en caso de que el enfermo supere la fase aguda, las secuelas neuronales son permanentes. Tras la identificación de la neurotoxina tetánica (TeNT) se desarrollaron vacunas, que son aplicadas en los países desarrollados, donde la enfermedad del tétanos actualmente es muy infrecuente.

El botulismo, por el contrario, da lugar a una parálisis flácida que conlleva debilidad muscular y dificultad en los movimientos (Fig. 2B). El primer síntoma es la aparición de problemas de visión, al verse afectados los músculos que controlan el movimiento de los ojos, y es seguido

por la parálisis de los músculos faciales. Finalmente, los pacientes fallecen por un fallo respiratorio causado por una parálisis del diafragma.

A



B



Figura 2. Síntomas del tétanos y botulismo. A. Cuadro que muestra la parálisis espásmica derivada de la infección con *C. tetani*. B. Niño con parálisis flácida inducida por *C. botulinum*.

Imagen A: *Opisthótonos*, Charles Bell.

Imagen B: Wikipedia.

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.

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 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, van a experimentar parálisis y eventualmente les provocará la muerte (Fig. 3). 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, pero su número aumentará significativamente tras la ingestión de esporas y su germinación. 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.

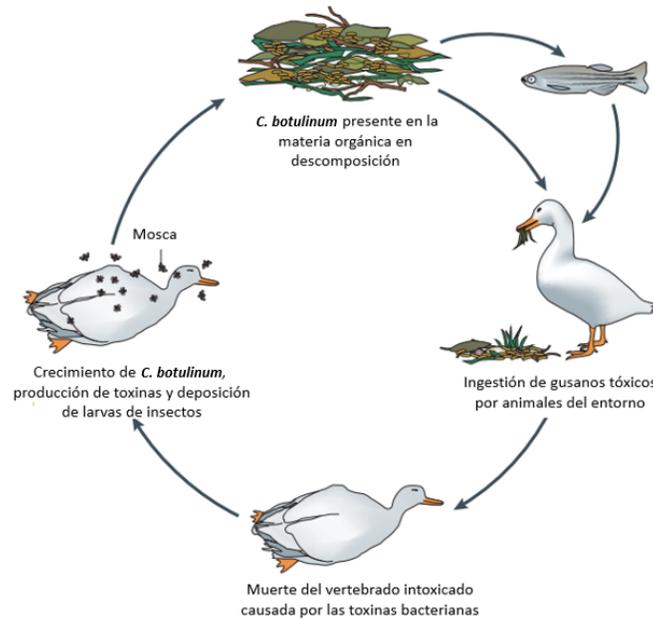


Figura 3. Ciclo de transmisión de *C. botulinum*. El ambiente anaeróbico de la materia orgánica en descomposición y de los animales muertos por la toxina proporciona el entorno preciso para el crecimiento de la bacteria y la producción de sus toxinas, que serán ingeridas primero por invertebrados y después por vertebrados. *Figura adaptada de Rosetto et al. (2014).*

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. 4).

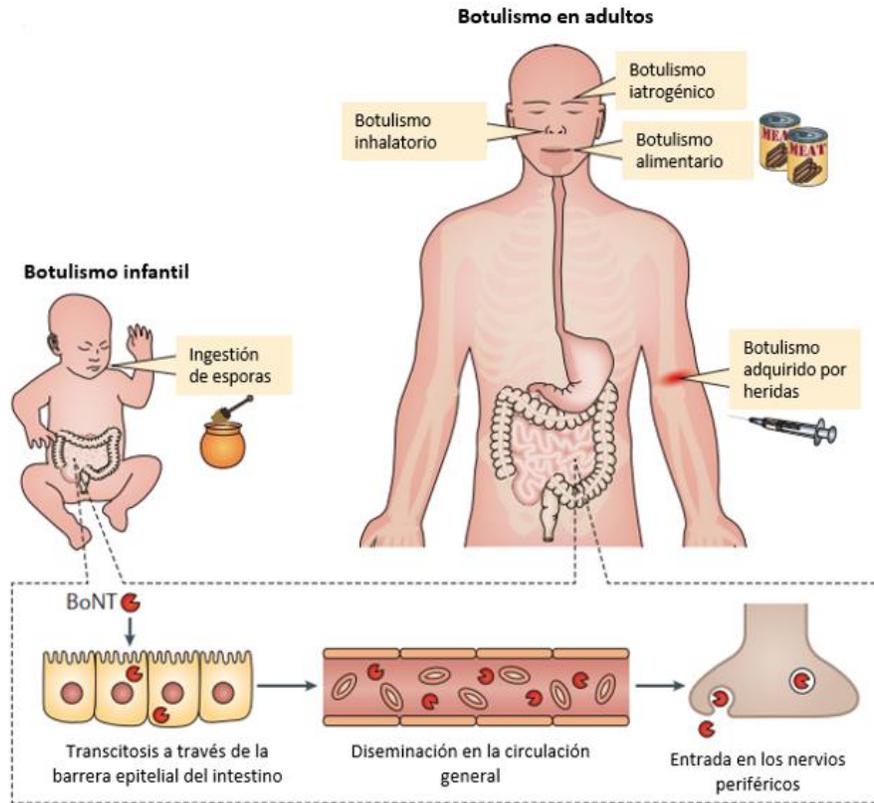


Figura 4. Formas de botulismo en humanos. Dentro del botulismo en etapa adulta se distingue entre botulismo alimentario, adquirido por heridas, iatrogénico e inhalatorio. El botulismo infantil se da predominantemente por la ingestión de esporas. En el diagrama inferior se muestra el proceso de llegada de la neurotoxina botulínica (BoNT) desde el lumen intestinal hasta los terminales nerviosos.
 Figura adaptada de Rosetto et al. (2014).

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.

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. 4).

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. Además de *C. botulinum*, otras especies (*C. baratii*, *C. butyricum* y *C. argentinense*) también producen toxinas botulínicas.

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.

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.

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. 5, Fig. 6). El puente disulfuro desempeña un papel crítico en la penetración celular, y su rotura mediante reducción suprime la toxicidad de la neurotoxina.

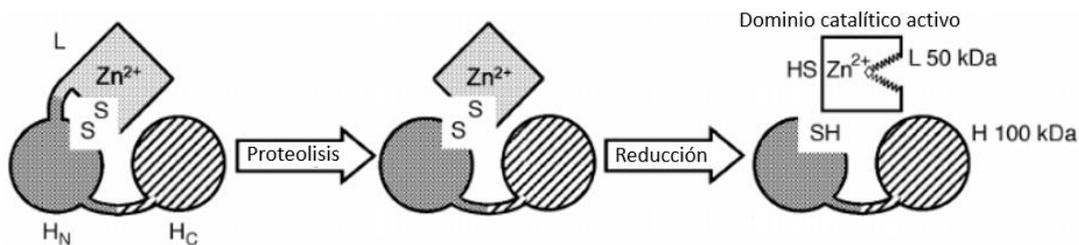


Figura 5. Estructura y activación de las toxinas tetánica y botulínica. Se muestran la cadena ligera (L) y la cadena pesada (H), esta con sus dos dominios (H_N y H_C). La activación de L como Zn²⁺ metaloproteasa se produce en el citoplasma neuronal tras la reducción del puente disulfuro.

Figura adaptada de Cook et al. (2001).

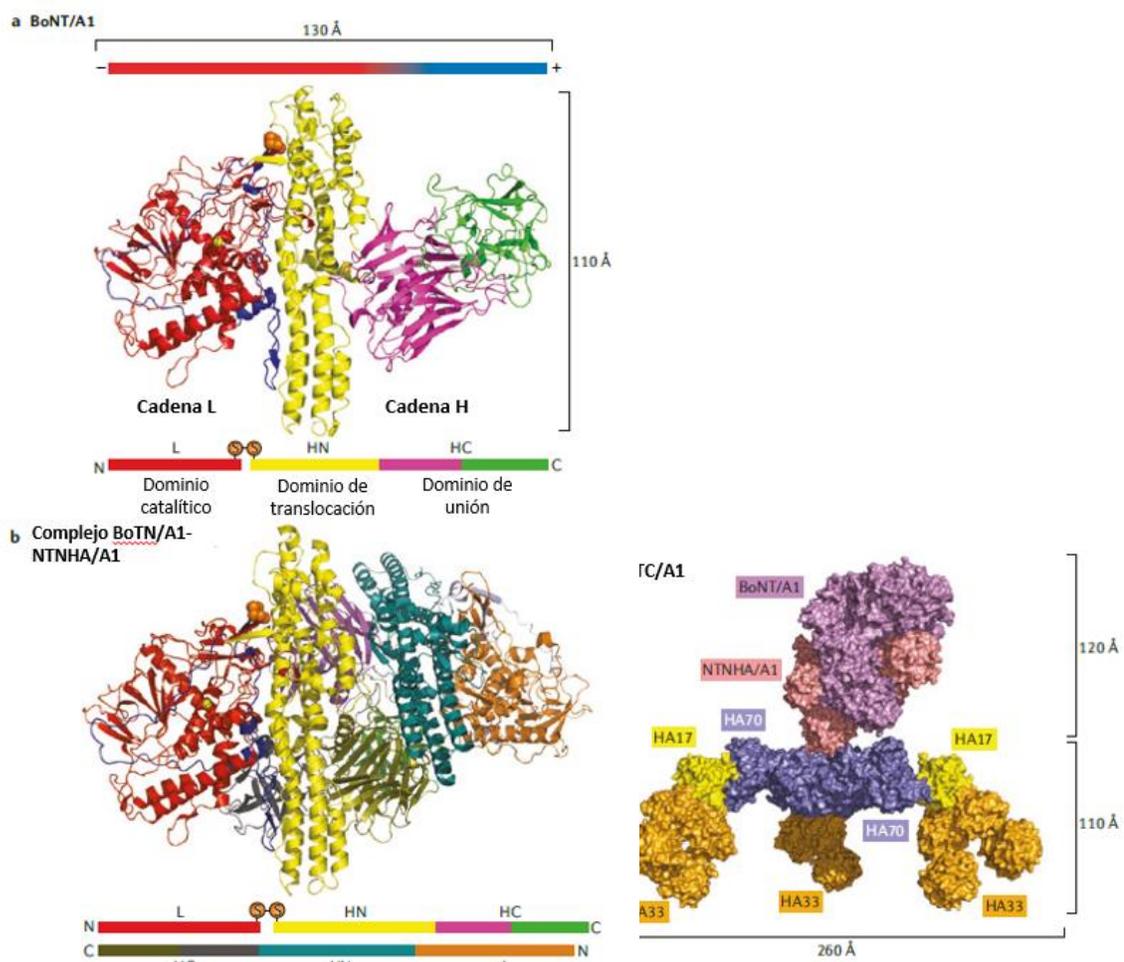


Figura 6. Estructura de la toxina botulínica. **a.** Estructura cristalina de la toxina botulínica A1 (BoTN/A1). **b.** Estructura cristalina del complejo formado por BoTN/A1 con la proteína NTNHA/A1, caracterizado por su forma de manos entrelazadas. **c.** Estructura del complejo precursor de la toxina (PTC), formado por BoTN/A1, NTNHA/A1 y diversas hemaglutininas, que protege y favorece la presencia de la toxina en el medio interno del huésped.

Figura adaptada de Rosetto et al. (2014).

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.

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. 6). De hecho, la proteína NTNHA y la toxina BoNT forman parte de un complejo multiproteico denominado PTC (“*progenitor toxin complex*”). Curiosamente, todas estas proteínas están codificadas en un grupo génico. Así, precediendo al gen BoNT se encuentra el gen que codifica para NTNHA. Además, existen una o dos series de genes: un grupo o cluster HA, que codifica para tres hemagglutininas (HA17, HA33 y HA70), y el segundo, denominado, cluster OrfX, codifica para las proteínas OrfX1, OrfX2, OrfX3 y P47.

Se ha sugerido que la función de la proteína NTNHA podría ser la de proteger a BoNT en su tránsito intestinal o en otros ambientes inhóspitos. Las proteínas HA están implicadas en establecer interacciones con los carbohidratos de la superficie de las células epiteliales del intestino. En particular, se ha determinado una interacción con la glicoproteína 2 (GP2) de las células M del intestino. GP2 media la transcitosis de microbios y partículas desde el lumen intestinal hasta la lámina basal para exponer a los antígenos extraños a las células inmunitarias.

También se ha visto que el complejo HA favorece la disrupción de las uniones intercelulares al interaccionar con cadherina E. Hasta ahora no se sabe cuál es la función de las proteínas codificadas en el cluster OrfX.

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 (Fig. 7). El segmento más conservado está localizado en la mitad de la cadena L y consta de 19 residuos (Fig. 8). Contiene el motivo de unión a Zinc His-Glu-Xaa-Xaa-His de las zinc-endopeptidasas.

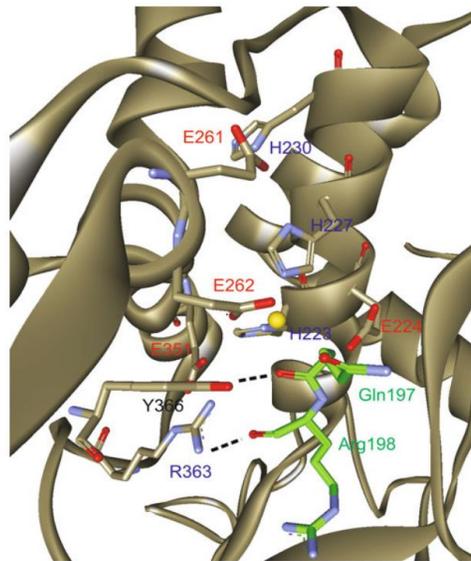


Figura 7. Aminoácidos más relevantes del centro activo de la cadena L de la BoNT. Se destacan los aminoácidos clave en la función metaloproteasa de la toxina tras la determinación de la estructura por cristalografía de rayos X con un péptido sintético derivado de SNAP25 (en verde en la imagen), uno de los blancos celulares de algunos serotipos de la toxina, cuya rotura se producirá entre la Gln197 y la Arg198. Los aminoácidos se representan con el código de una letra y su posición en la cadena; se encuentran conservados en todos los serotipos de BoNT y también en la TeNT.

Figura extraída de Binz (2013).

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 GpI	D P A L I L M H E L I H V L H G L Y G
BoNT/B GpII	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 8. Dominio de unión a Zn de BoNT y TeNT. Alineamiento múltiple de secuencias de los serotipos de BoNT y TeNT, que revela la conservación del motivo de unión a Zn compartido con las Zn-endopeptidasas (zincinas).

Figura extraída de Rossetto et al. (1995).

3.2. Estructura de la cadena H.

La cadena H está formada por dos subunidades funcionales, Hn (en el extremo N-terminal, compuesto por α -hélices y de 50 kDa), implicado en la translocación de la toxina, y Hc (en el C-terminal, de otros 50 kDa). A su vez, Hc está compuesto por dos dominios de 25 kDa, Hcn y Hcc, con estructura conservada, aunque no elevada identidad de secuencia (Fig. 9). Hcn está también implicado en el proceso de translocación, mientras que Hcc es el responsable de la interacción con los receptores celulares tanto en TeNT como en BoNT.

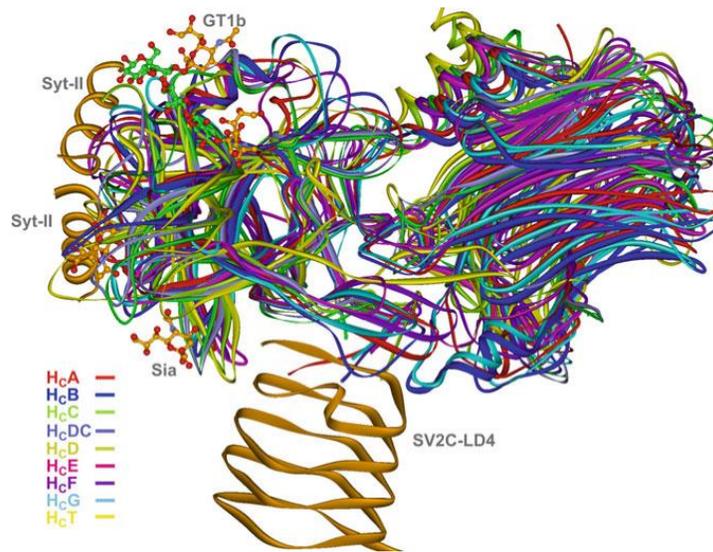


Figura 9. Superposición de las estructuras tridimensionales de la subunidad Hc de las neurotoxinas. Obtenida a partir de las estructuras cristalográficas de todos los serotipos de BoNT (A-G) y de TeNT en complejo con el receptor SV2 y moléculas estabilizadoras.

Figura extraída de Rummel (2017).

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. 10).

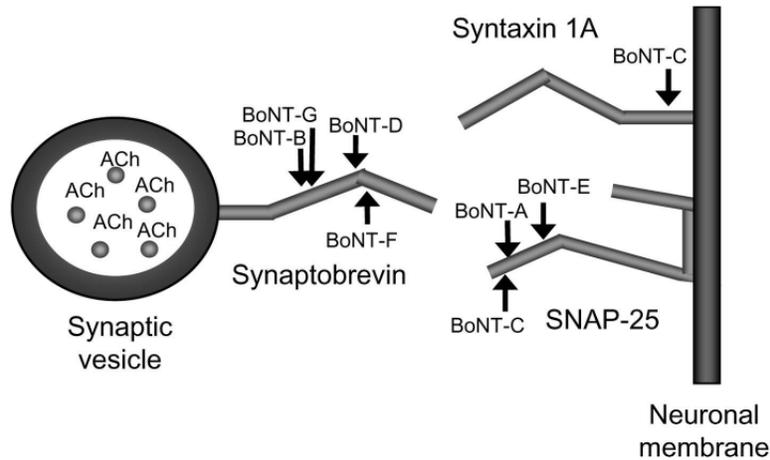


Figura 10. Moléculas blanco de la acción de los distintos serotipos de toxina botulínica. En la figura se muestra la acción de distintos serotipos de toxinas botulínicas sobre sinaptobrevina, SNAP-25 o sintaxina dentro de la neurona. Abreviaturas: ACh-acetilcolina, BoNT-toxina botulínica (la letra indica el serotipo A, C, E...).
Figura extraída de Barr et al. (2005).

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.

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 (Fig. 11). 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.

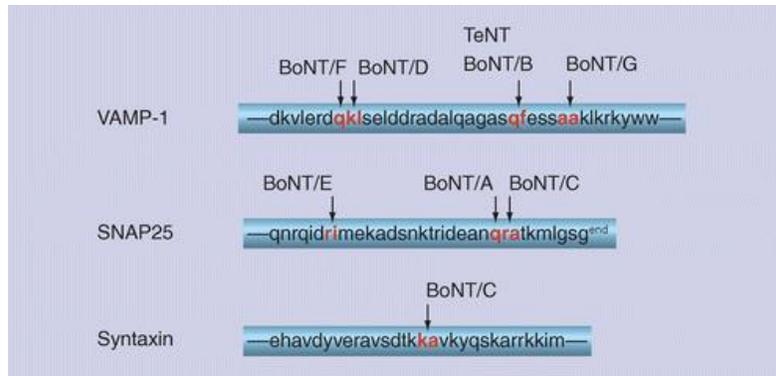


Figura 11. Secuencias de corte de las toxinas sobre sus diferentes moléculas blanco. Se muestran las secuencias de aminoácidos de VAMP-1, SNAP25 y sintaxina sobre las que actúan las distintas toxinas botulínicas y la tetánica. Abreviatura: BoNT-toxina botulínica (la letra indica el serotipo), TeNT-toxina tetánica. *Figura extraída de Popoff & Bouvet (2009).*

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:

- Se producen como precursores inactivos que son activados mediante proteólisis específica seguida por reducción de un enlace disulfuro.
- Actúan en el citosol celular y son muy específicas en términos de proteína blanco y del enlace peptídico que rompen.
- 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 interactúan con receptores de membrana y son translocados al citosol donde actúan bloqueando la liberación de neurotransmisores.

Las BoNTs alcanzan las terminales nerviosas en la unión neuromuscular (Figs. 12 y 13), 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.

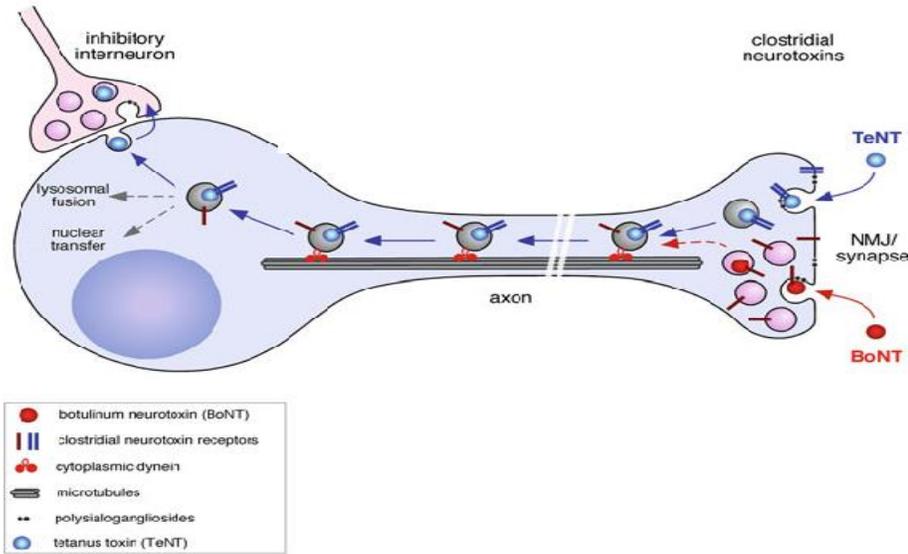


Figura 12. Internalización y transporte de las toxinas a lo largo de la neurona. La internalización de las toxinas en la neurona ocurre a nivel del terminal sináptico; las vesículas con la toxina tetánica experimentan un movimiento retrogrado hacia el cuerpo neuronal para su posterior acción en interneuronas inhibitorias. La leyenda de la parte inferior derecha sirve para interpretar la imagen. NMJ- unión neuromuscular.

Figura adaptada de Bercsenyi et al. (2013).

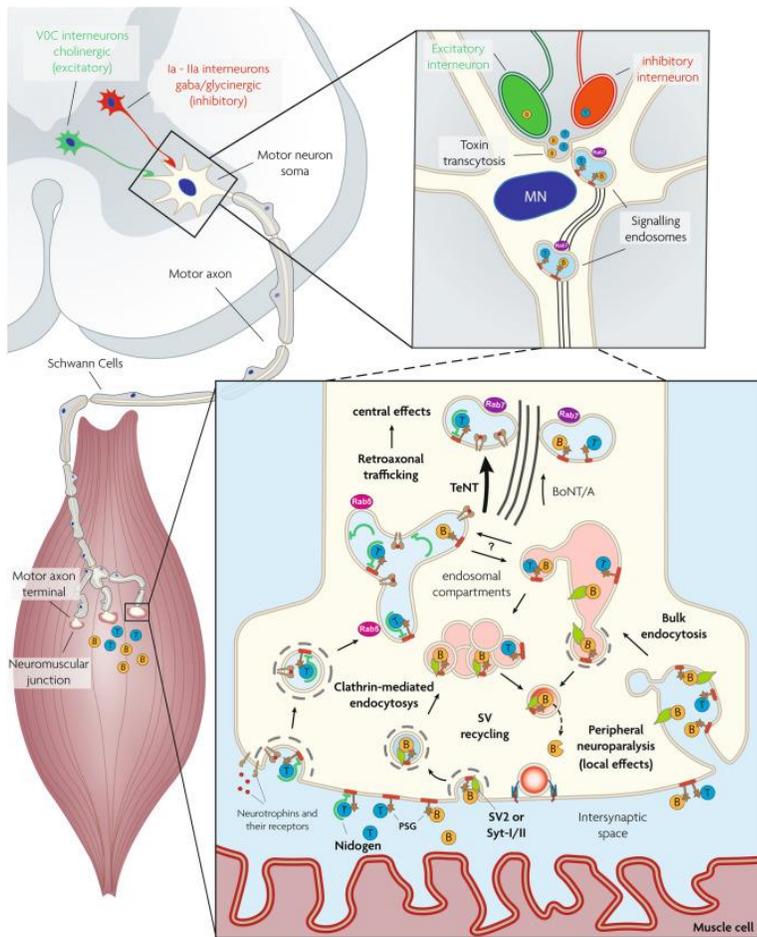


Figura 13. Localización y transporte de las toxinas en las motoneuronas. Representación del transporte y localización preferencial de las toxinas en la motoneurona y tráfico de la toxina tetánica hacia interneuronas. Abreviaturas: SV recycling-reciclado de vesícula sináptica, TeNT-toxina tetánica, BoNT/A-toxina botulínica de serotipo A. *Figura extraída de Pirazzini et al. (2022).*

La TeNT también es tomada por las terminaciones nerviosas en la unión neuromuscular pero no actúa en ese sitio (Figs. 12 y 13). 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.

La toxina botulínica como se ve en la fig.13 (y ligeramente en la fig.12) también puede viajar de forma retrógrada y ser liberada al espacio sináptico entre interneuronas y motoneuronas. En este caso, el efecto lo realizarían sobre interneuronas excitatorias, sin embargo, la proporción y transporte específico de toxinas botulínicas en esta vía es aún desconocido.

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 (Fig. 8).

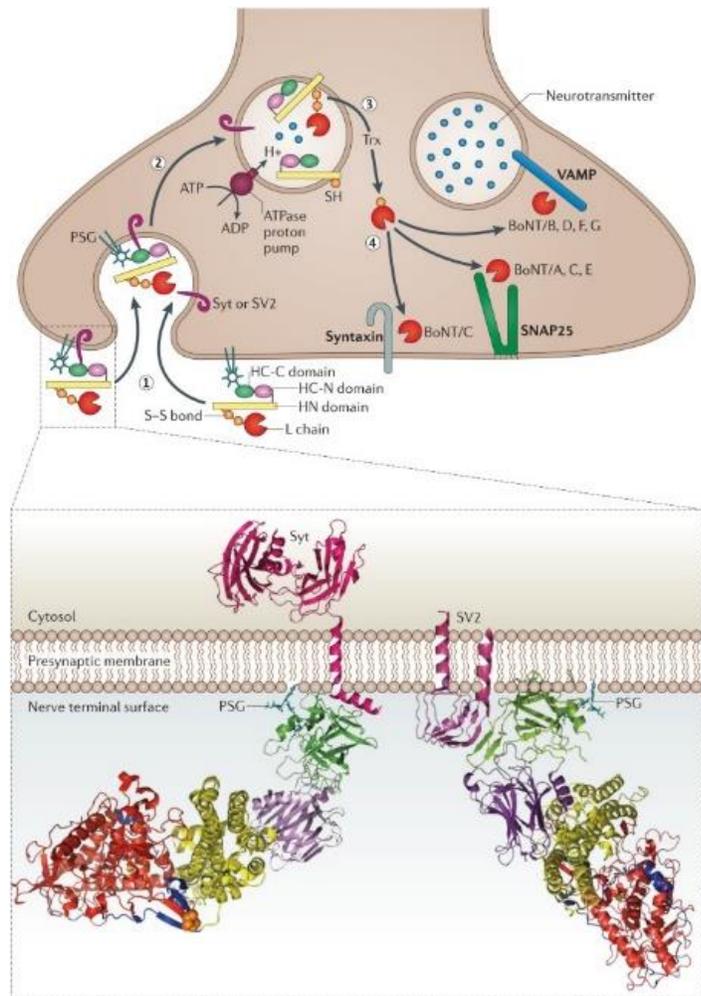
TeNT y BoNTs se unen a polisialogangliósidos (PSGs), muy abundantes en la membrana presináptica de las neuronas; en cambio, las toxinas muestran una actividad reducida en neuronas en las que la síntesis de gangliósidos ha sido inhibida. La interacción es de muy alta afinidad; así, por ejemplo, las toxinas 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, interaccionaría 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. 14). TeNT también utiliza a SV2 como su receptor.

Figura 14. Receptores para las toxinas botulínicas. La parte superior muestra la internalización y mecanismo de acción de las toxinas botulínicas en el terminal sináptico. La parte inferior muestra la estructura de los receptores de las toxinas PSG y SV2. Abreviatura: BoNT- toxina botulínica (la letra a continuación indica el serotipo).
 Figura extraída de Rossetto et al. (2014).



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. 14). 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.

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 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 vesículas) y el relleno con neurotransmisores de las vesículas sinápticas (para introducir la metaloproteinasa 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. 15).

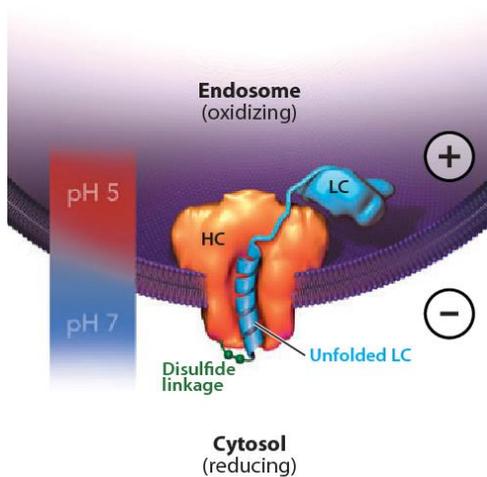


Figura 15. Paso de las toxinas a través de la membrana endosomal hacia el citosol. Mecanismo de translocación de las toxinas hacia el citosol mediante la inserción de la cadena L (LC) a través del poro generado por la cadena H (HC).

Figura extraída de Montal (2010).

En la figura 16 se muestra la sucesión de eventos en el proceso de traslocación.

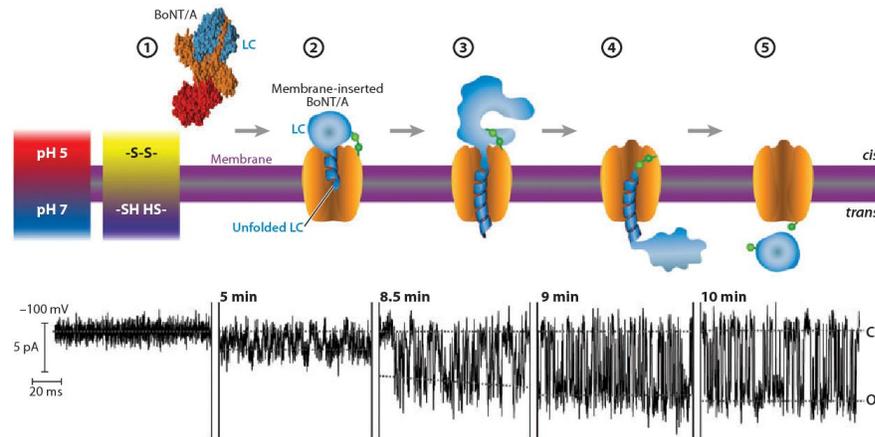


Figura 16. Mecanismo de traslocación de la toxina botulínica del serotipo A (BoNT/A) desde el endosoma al citosol. Mecanismo detallado del proceso de traslocación de la cadena L (LC) de la toxina a través de la membrana endosomal gracias a la cadena H (CH) y reducción del puente disulfuro para la liberación al citosol. La parte inferior muestra los cambios de corriente a -100mV en cada fase, siendo C y O los estados cerrados y abiertos, respectivamente, del canal. *Figura extraída de Montal (2010).*

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).

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.
- Aunque los clostridios podrían sobrevivir y replicarse en ausencia de la producción de toxina, esta supone un vehículo rápido y eficiente de expansión de las dimensiones del ambiente anaerobio rico en nutrientes necesario para su proliferación al acabar rápidamente con la vida

del animal infectado.

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.

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 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.

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, y productos similares).

8. Las toxinas de *Clostridium* como agentes terapéuticos.

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.

Desde la aprobación de la toxina botulínica tipo A (BoNT-A) por parte de la “US Food and Drug Administration” en diciembre de 1989 para tres desórdenes (estrabismo, blefaroespasmos (pestañeo incontrolado) 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 forma específica y poderosa, la actividad muscular involuntaria durante un periodo prolongado. Además, como se inoculan cantidades tan pequeñas, no se inducen anticuerpos que pudieran bloquear su efecto en inoculaciones posteriores.

Como se menciona anteriormente, uno de los potenciales terapéuticos es el tratamiento de las migrañas. El mecanismo de alivio del dolor se debe a la relajación muscular y la subsiguiente hipotensión. La toxina botulínica (BoNT) penetra dentro del nervio e inhibe la liberación de neurotransmisores, tanto proinflamatorios como nociceptivos, lo que lleva a una atenuación de la inflamación, vasodilatación y, finalmente, reduciendo el dolor. A nivel molecular, se han propuesto varios mecanismos de acción, pero el más estudiado es la inhibición de la exocitosis de neurotransmisores por el bloqueo y consiguiente escisión de los receptores SNARE. Estas proteínas, syntaxina, y VAMP/sinaptobrevina, están involucradas en la exocitosis de acetilcolina (ACh), en la sinapsis neuromuscular.

A su vez, BoNT disminuye las concentraciones plasmáticas de neuropéptidos como la sustancia P (SP), glutamato y del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), que son los principales neurotransmisores desencadenantes del dolor y la inflamación y la vasodilatación.

De esta manera, se inhibe la liberación de transmisores, se bloquea la inervación muscular en la unión neuromuscular y provoca una parálisis temporal, efectos beneficiosos en muchos trastornos neuromusculares, y dolores asociados a la tensión muscular. Dentro de la amplia variedad de toxinas, BoNT-A y BoNT-B han demostrado su mayor eficacia en la terapia del dolor neuropático, siendo BoNT-A la más usada debido a sus efectos adversos menos pronunciados y sus resultados duraderos.

No obstante, el número de síndromes que se pueden beneficiar del tratamiento con BoNT continúa aumentando. Además, se está investigando la posibilidad de utilizar esta toxina para tratamientos de alteraciones del sistema nervioso central (SNC). 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.

Por último, la toxina botulínica puede emplearse para fines cosméticos. Actualmente es uno de los tratamientos más conocidos en estética, usados en la prevención de arrugas, o el bótox.

8.1. Bótox facial

El uso más común de la toxina botulínica en cosmética es el denominado BOTOX. Este es ampliamente utilizado para eliminar las arrugas faciales del tercio superior de la cara y las patas de gallo. También es utilizado en los 2 tercios inferiores; sin embargo, es más complejo y se utiliza como una aplicación más avanzada.

La formación de arrugas se encuentra asociada a la edad. Las arrugas se forman por atrofia dermal causada por la activación repetitiva de los músculos subyacentes. Los músculos faciales, al contraerse, mueven la piel de la cara, generando arrugas “dinámicas” (solo presentes durante la contracción muscular) perpendiculares a la dirección de la contracción. Las arrugas pueden considerarse “estáticas” cuando en reposo la marca sigue presente.

La administración de pequeñas dosis de esta toxina se utiliza como tratamiento al relajar estos músculos y permitir la relajación y “alisado” de la piel. Una sola dosis elimina las arrugas dinámicas mencionadas anteriormente durante unos meses (3-4 normalmente), mientras que en las “estáticas”, suelen requerirse 2 o 3 dosis, y probablemente el resultado sea una reducción, pero no completa eliminación.

A pesar del nombre genérico de BOTOX, existen 3 tratamientos distintos bajo esta denominación (Fig. 17). Todos ellos se basan en la administración de toxina botulínica del serotipo A, pero se diferencian en el resto de proteínas componentes que rodean a esta. Son estas proteínas las que se suponen son responsables de la distinta antigenicidad y respuesta inmunitaria inducida por el tratamiento. También existe un tratamiento basado en el serotipo B.

Nombre comercial	Compañía	Nombre genérico (Serotipo de toxina)	Otros componentes
Botox	Allergan, Inc.	OnabotulinumtoxinA (BoNT/A)	Albúmina humana, NaCl
Dysport	Medicis Pharmaceutical Corporation	AbobotulinumtoxinA (BoNT/A)	Albumina humana, lactosa monohidrato y proteína bovina.
Xeomin	Merz Pharmaceuticals	IncobotulinumtoxinA (BoNT/A)	Albumina humana y sacarosa.

Figura 17. Productos basados en toxina botulínica usados para el tratamiento de arrugas. Tabla con los 3 productos comerciales más comunes usados para el BOTOX facial y sus características. *Figura adaptada de Small (2014).*

Actualmente, se está popularizando el término “microbotox”. Esta variación consiste en el tratamiento con microgotas de estos compuestos a un nivel más superficial (intradermal). Este tratamiento se ha visto que causa una debilidad muscular menor y distinta a la causada con los tratamientos de BOTOX tradicionales. Esta alternativa produce resultados más seguros para el tratamiento de cara y cuello, además de obtener resultados más naturales y menor apariencia de rigidez. Además, se ha visto una reducción de la sudoración con este tipo de tratamiento, permitiendo su uso para el tratamiento de hiperhidrosis (sudoración anormal o excesiva).

9. Toxinas producidas por *Clostridium difficile*.

C. difficile está presente en pequeños números en el 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.

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. 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. Este locus de patogenicidad parece haberse adquirido por transferencia génica horizontal, ya que las cepas no toxigénicas de esta especie carecen del mismo.

Las toxinas TcdA y TcdB tienen una longitud de 2710 y 2366 aminoácidos, respectivamente, y muestran un 48% de identidad de secuencia (Fig. 18). 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.

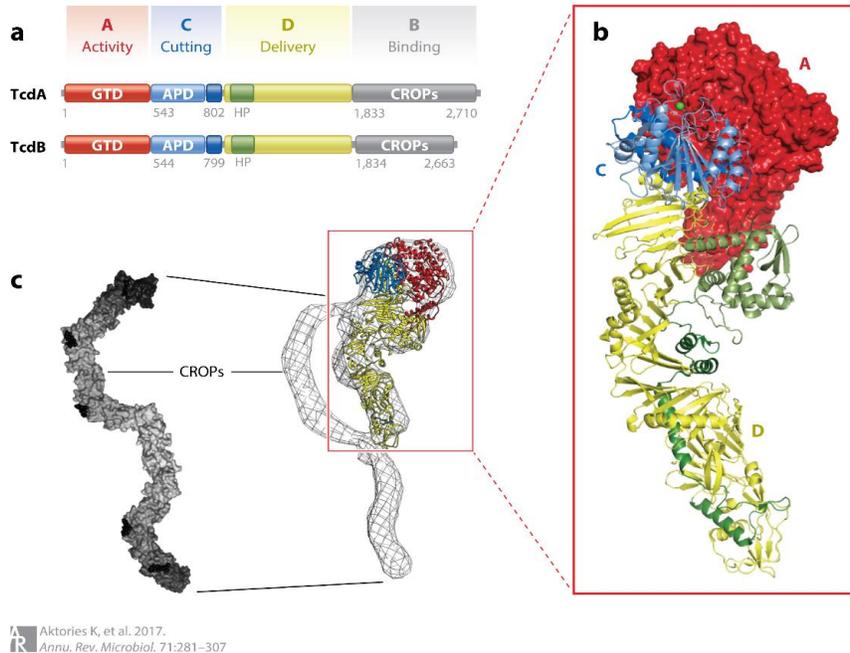
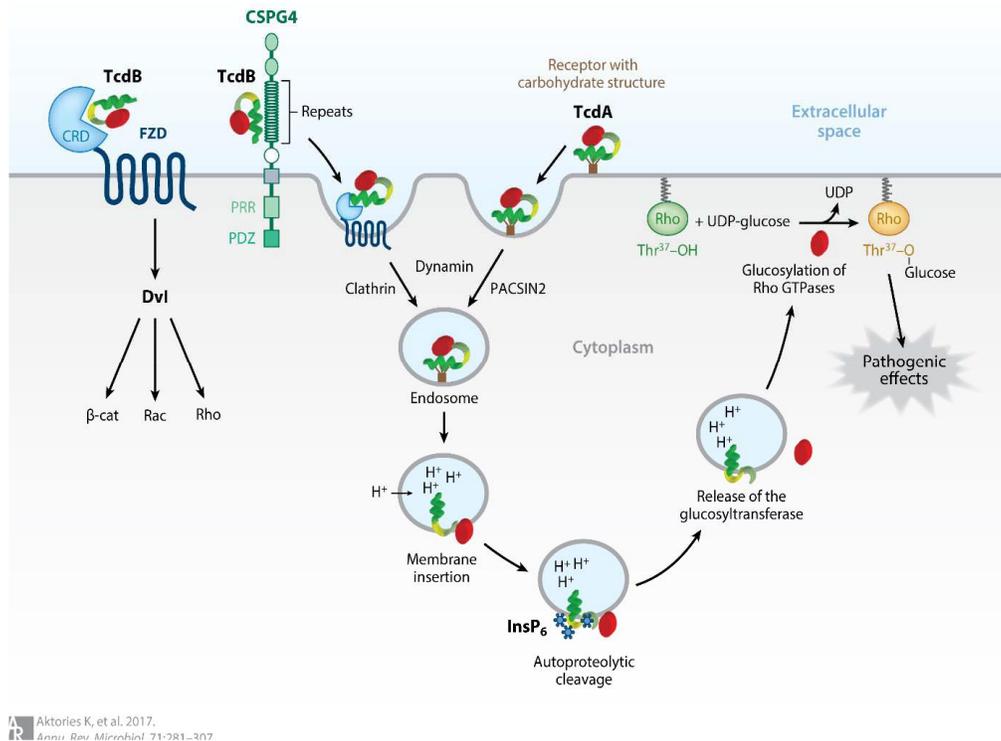


Figura 18. Esquema de la analogía de secuencia de dominios funcionales de las toxinas TcdA y TcdB (a) de *C. difficile*. Se representa en rojo el dominio A con actividad glucosiltransferasa (GTD), el dominio B en gris, implicado en la unión al ligando, denominado CROPs. El dominio C en azul (APD), es una proteasa y está involucrado en el procesamiento de las toxinas y el D, en verde (delivery domain), está implicado en la traslocación al citosol. En la imagen b se muestra la estructura tridimensional de los dominios A, C y D. La imagen c representa la estructura completa de las toxinas.

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”). Si bien, cada toxina parece interactuar con receptores específicos. La toxina TcdA interactúa con alta afinidad con glicano, y en las células humanas interactuaría con la estructura N-acetil galactosa y N-acetil glucosa (GalNAc-(1,3)-β-Gal-(1,4)-β-GlcNAc); si bien, la molécula que actúa como receptor no

se conoce.



Aktories K, et al. 2017. *Annu. Rev. Microbiol.* 71:281–307

Figura 19. Esquema del mecanismo de entrada y modo de acción de las toxinas TcdA y TcdB (a) de *C. difficile* sobre la célula huésped. El proceso comienza con la interacción con los receptores, siendo CSPG4 para tcdB y PACSIN2 para tcdA, lo que produce la endocitosis de las toxinas. En los compartimentos endosomales, la acidificación promueve cambios conformacionales que provocan la inserción de la toxina en la membrana endosomal, donde interacciona con inositol hexakisfosfato (InsP₆). Como consecuencia, se produce la autoactivación del dominio C, proteasa, induciendo la rotura de la toxina, para liberar el dominio GTD al citoplasma. A continuación, las proteínas Rho son glicosiladas causando efectos patológicos en el hospedador.

Figura adaptada de Aktories et al. (2017)

Como receptor para la toxina TcdB se ha identificado al condroitin sulfato proteoglicano 4 (CSPG4). CSPG4 (también conocido como HMWMAA (“*high molecular weight melanoma-associated antigen*”), NG2 (“*nerve/glial antigen 2*”) o gp240 es una proteína transmembrana (Fig. 19). CSPG4 se expresa en varios tipos de células progenitoras (mesenquimáticas, perivasculares, mioblásticas, condroblásticas y oligodendrocíticas) y se encuentra sobreexpresado 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*”).

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) promueve su actividad autoproteasa, produciendo un corte en la toxina y liberando 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.

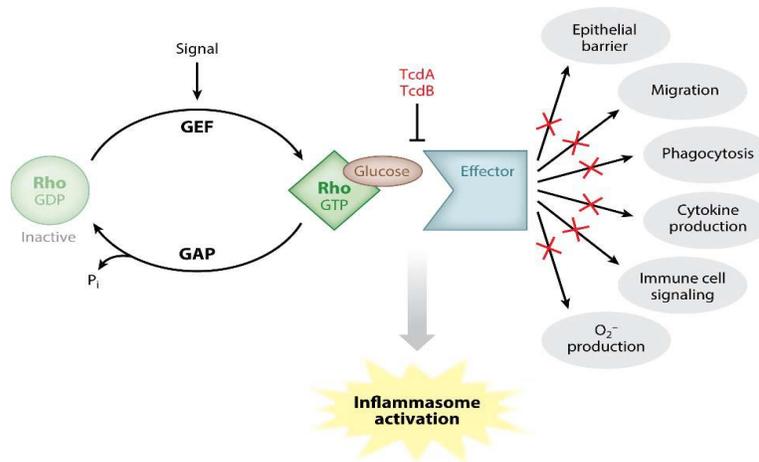
Mediante su actividad glucosiltransferasa, las toxinas TcdA y TcdB transfieren una glucosa a treoninas específicas de las proteínas Rho y utilizan la molécula UDP-glucosa como fuente de glucosa. Esta modificación es irreversible, ya que las células humanas no poseen en su citoplasma glucosidasas con 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 and TcdB, muestran una preferencia distinta por cada una de los 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 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. 20). 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 GAPs (‘GTPase-activating proteins’).

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. 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.



Aktories K, et al. 2017. Annu. Rev. Microbiol. 71:281–307

Figura 20. Esquema del ciclo de activación GTPasa de la proteína Rho y su inhibición por las toxinas TcdA y TcdB de *C. difficile*. Las proteínas Rho se activan mediante GEF con el intercambio de GDP/ GTP. Las proteínas GAP producen la hidrólisis de GTP/ GDP, inactivando a las proteínas Rho. Sin embargo, las toxinas glucosilan la proteína Rho, bloqueando interacciones con diferentes efectores. De esta manera, se inhiben procesos como fagocitosis, migración, producción de citoquinas, de la barrera epitelial, señalización de células del sistema inmunitario y la producción de O_2^- . Por otro lado, la inhibición por glucosilación promueve la formación del inflamasoma induciendo piroptosis y muerte celular.

Figura extraída de Aktories et al. (2017).

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. En estudios recientes, se han propuesto diversos mecanismos moleculares por los que las toxinas inducen apoptosis. Uno de ellos es mediante los canales Panx1, que están sobreexpresados en las membranas de las células infectadas por *C. difficile* (Fig. 21). Estas proteínas, forman canales que comunican el ambiente extracelular con el citosol, de manera que, las toxinas puedan invadir las células de manera más eficaz. Además, la activación de estos canales es esencial para la liberación

de moléculas que actúan como señales de peligro celular, como ATP y liberan otros mediadores que inducen muerte y una respuesta inflamatoria. En concreto en este ejemplo, los canales Panx1 están asociados a las vías de la activación de las caspasas tanto de apoptosis intrínseca como extrínseca, que convergen en la activación de las caspasas 3/7. Su activación tiene como diana alteración de proteínas de los tres componentes del citoesqueleto, produciendo muerte celular.

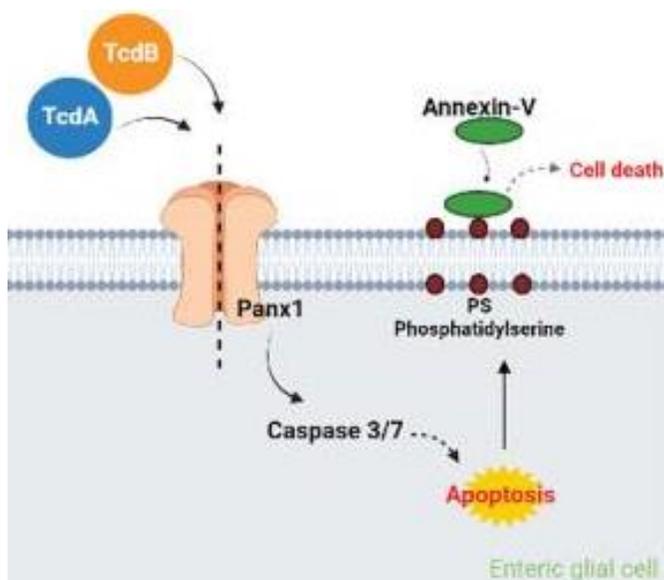


Figura 21. Esquema del mecanismo de acción de las toxinas TcdA y TcdB para inducir apoptosis en las células gliales entéricas. Las toxinas entran en las células mediante los canales Panx1 y su activación es esencial para la liberación de diversas moléculas de señalización y regulación de distintos mecanismos, entre las que se encuentra la caspasa 3/7. Como consecuencia, se produce la exposición de fosfatidilserina (PS) en la membrana, induciendo la muerte celular apoptótica.

Figura extraída de Loureiro & Moura-Neto (2022)

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 las toxinas producidas por *Bacillus anthracis* causantes del carbunco. 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. 22). El componente CDTa posee actividad ribosil-transferasa.

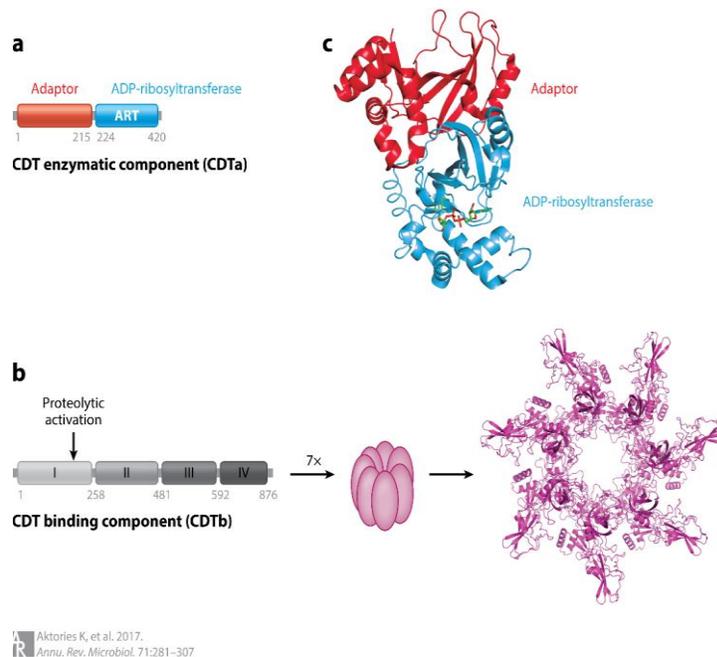
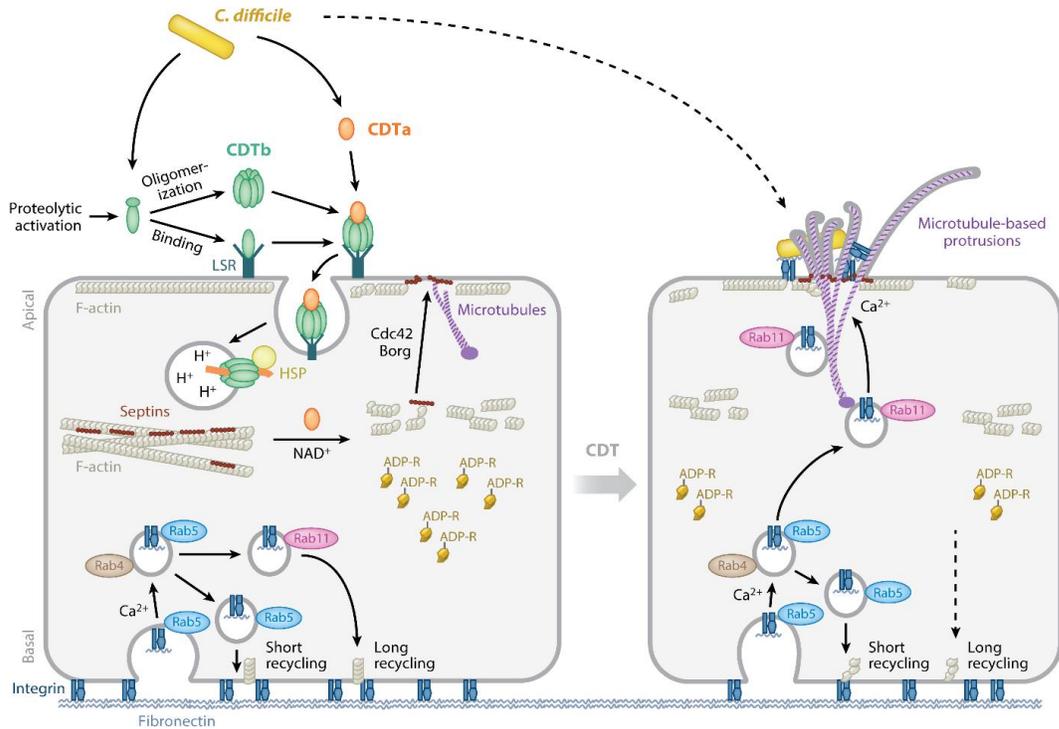


Figura 22. Esquema de la estructura de la toxina binaria CDT de *C.difficile*. **(a)** La cadena con actividad enzimática denominada CDTa, tiene dos dominios, en C-Terminal, en azul, el ADP-ribosiltransferasa (ART) y en la región N-terminal, en rojo, el dominio adaptador que interacciona con la cadena CDTb. **(b)** Esta segunda cadena, CDTb, es el componente de unión con el receptor de lipoproteínas (LRS) de la célula huésped. Tras su activación proteolítica en la región N-terminal, CDTb oligomeriza formando un heptámero, siete protómeros generan un complejo con un poro central, por donde se favorece la entrada de CDTa a la célula huésped. **(c)** Estructura tridimensional de CDTa con sus dos dominios, ADP-ribosiltransferasa (azul) y el adaptador (rojo).

Figura extraída 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 y 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. 23). 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.



Aktories K, et al. 2017. Annu. Rev. Microbiol. 71:281–307

Figura 23. Esquema del mecanismo de acción de la toxina binaria CDT de *C.difficile* sobre los microtúbulos, actina y el tráfico de vesículas. La cadena CDTa puede unirse al componente CDTb solo si este oligómero previamente se ha unido al receptor de lipoproteínas (LSR). Una vez está el complejo CDTa- CDTb-LSR anclado a la membrana, comienza la endocitosis. El bajo pH del endosoma provoca que CDTb se inserte en la membrana y forme un poro a través del cual CDTa se transloca al citosol con ayuda de chaperonas como HSP90 (HSP). En el citosol la G-actina es ADP-ribosilada y queda bloqueada su capacidad de polimerizar. Como consecuencia, la despolimerización de actina afecta al sistema de microtúbulos creando protuberancias celulares o promoviendo el reciclaje de vesículas asociadas a Rab11 que contienen fibronectina y son redirigidas a la membrana apical. Además, las protuberancias extensas de las células infectadas provocarán una adherencia de un mayor número de bacterias a la superficie. *Figura extraída de Aktories et al. (2017).*

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 van a favorecer la adherencia de la bacteria (Fig. 23).

10. Referencias.

- **Aktorics, K., Schwan, C. and Jank, T.** (2017). *Clostridium difficile* Toxin Biology. *Annu Rev Microbiol* 71: 281-307.
- **Barr JR, Moura H, Boyer AE, Woolfitt AR, Kalb SR, Pavlopoulos A, et al.** (2005). Botulinum neurotoxin detection and differentiation by mass spectrometry. *Emerg. Infect. Dis.* 11 (10): 1578–1583.
- **Bercsenyi K, Giribaldi F, Schiavo G.** (2013) The elusive compass of clostridial neurotoxins: deciding when and where to go? *Curr Top Microbiol Immunol.* 364:91-113.
- **Binz T.** (2013). Clostridial neurotoxin light chains: devices for SNARE cleavage mediated blockade of neurotransmission. *Current topics in microbiology and immunology*, 364, 139–157.
- **Cook, T. M., Protheroe, R. T., & Handel, J. M.** (2001). Tetanus: a review of the literature. *British journal of anaesthesia*, 87(3), 477–487.
- **Dima, L., Bălan, A., Moga, M. A., Dinu, C. G., Dimienescu, O. G., Varga, I., & Neculau, A. E.** (2019). Botulinum Toxin a Valuable Prophylactic Agent for Migraines and a Possible Future Option for the Prevention of Hormonal Variations-Triggered Migraines. *Toxins*, 11(8), 465.
- **Dong, M., Masuyer, G., and Stenmark, P.** (2019). Botulinum and Tetanus Neurotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 88, 811–837.
- **Halpern, J.L. and Neale, E.A.** (1995) Neurospecific binding, internalization, and retrograde axonal transport. *Cur. Top. Microbiol. Immunol.* 195: 221-241.
- **Johnson, E.A.** (1999) Clostridial toxins as therapeutic agents: benefits of nature's most toxic proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 551-575.
- **Kandhari, Kaur, I., Gupta, J., & Al-Niimi, F.** (2022). Microdroplet botulinum toxin: A review. *J Cutan Aesthet Surg*, 15(2), 101–107.
- **Kattimani, Tiwari, R. V. C., Gufran, K., Wasan, B., Shilpa, P. H., & Khader, A. A.** (2019). Botulinum toxin application in facial esthetics and recent treatment indications (2013-2018). *J Int Soc Prev Community Dent*, 9(2), 99–105.
- **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.
- **Loureiro, A. V., Moura-Neto, L. I., Martins, C. S., Silva, P. I. M., Lopes, M. B. S., Leitão, R. F. C., Coelho-Aguiar, J. M., Moura-Neto, V., Warren, C. A., Costa, D. V. S., & Brito, G. A. C.** (2022). Role of Pannexin-1-P2X7R signaling on cell death and pro-inflammatory mediator expression induced by *Clostridioides difficile* toxins in enteric glia. *Frontiers in immunology*, 13, 956340.
- **Montal, M.** (2010). Botulinum neurotoxin: a marvel of protein design. *Annu. Rev. Biochem.* 79: 591-617.
- **Montecucco C, Rasotto MB.** On botulinum neurotoxin variability. *mBio.* 2015 Jan 6;6(1), e02131-14.
- **Pirazzini, M., Montecucco, C. & Rossetto, O.** (2022) Toxicology and pharmacology of botulinum and tetanus neurotoxins: an update. *Arch Toxicol* 96, 1521–1539.
- **Popoff, M. R., & Bouvet, P.** (2009). Clostridial toxins. *Future Microbiol.* 4(8), 1021-1064

- **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., Deloye, F., Poulain, B., Pellizzari, R., Schiavo, G., & Montecucco, C.** (1995). The metallo-proteinase activity of tetanus and botulism neurotoxins. *Journal of physiology, Paris*, 89(1), 43–50.
- **Rossetto, O., Pirazzini, M. and Montecucco, C.** (2014). Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 535-549.
- **Rummel A.** (2017). Two Feet on the Membrane: Uptake of Clostridial Neurotoxins. *Current topics in microbiology and immunology*, 406, 1–37.
- **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.
- **Shaterian, N., Shaterian, N., Ghanaatpisheh, A., Abbasi, F., Daniali, S., Jahromi, M. J., Sanie, M. S., & Abdoli, A.** (2022). Botox (OnabotulinumtoxinA) for Treatment of Migraine Symptoms: A Systematic Review. *Pain research & management*, 2022, 3284446.
- **Skarin, H.** (2015). *Genomic organization and diversity of Clostridium botulinum group III* (Vol. 2015, No. 2015: 80).
- **Small, R.** (2014). Botulinum Toxin Injection for Facial Wrinkles. *Am Fam Physician*, 90(3), 168–175.
- **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.

En internet:

- Imagen de *C. tetani*: <https://fineartamerica.com/featured/clostridium-tetani-bacterium-pasieka.html?product=poster>
- Imagen de *C. difficile*: <https://www.rki.de/DE/Content/Institut/OrgEinheiten/Abt3/FG37/ZODIAC.html>