

Acción de la enterotoxina citotóxica en la patogénesis de *Aeromonas hydrophila*

✉ Rosabel Falcón¹, Hernández F Carvalho², Paulo Pinto²,
Maria S V Gatti², Tomasa Yano²

¹Departamento de Bacteriología-Micología, Microbiología,
Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"
Autopista Novia del Mediodía Km 6^{1/2}, PO 601, Marianao, Ciudad de La Habana, Cuba
E-mail: rosabel@ipk.sld.cu; Fax: (53 7) 24 6051

²Departamentos de Biología Celular, Histología y Embriología, Microbiología e Inmunología,
Instituto de Biología, Universidad Estatal de Campinas, Sao Pablo, Brasil

RESUMEN

La enterotoxina citotóxica (Ent-ctx) de *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*) se caracteriza por sus múltiples actividades biológicas, entre las que se destacan su capacidad hemolítica, citotóxica y enterotóxica. Catalogada como el principal factor de virulencia asociado con la enteropatogénesis de *Aeromonas*, poco se conoce sobre los mecanismos de acción de esta toxina que desencadena enfermedades gastrointestinales asociadas con esta especie. En el presente estudio se pretende profundizar en la caracterización de las alteraciones morfológicas e intracelulares causadas por la Ent-ctx de *A. hydrophila* en las células epiteliales intestinales humanas, así como verificar las vías activadas por esta toxina para la inducción del efecto citotóxico. Los ensayos de la actividad citotóxica de la Ent-ctx mostraron una rápida cinética de actuación sobre las células HT29 y Caco-2. Las alteraciones morfológicas intracelulares fueron drásticas e irreversibles; la dosis letal citotóxica es 5 µg/mL. Los análisis microscópicos revelaron una intensa vacuolización citoplasmática, condensación cromatínica y nuclear, así como la formación de fragmentos con contenido citoplasmático y nuclear. La fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN) se confirmó mediante técnicas electroforéticas (gel de agarosa al 2%) e inmunocitoquímicas (TUNEL). Por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) se confirmó que no existe ninguna asociación entre los genes responsables de la enteropatogénesis en la *Escherichia coli* y la muestra de *A. hydrophila* productora de la Ent-ctx. La interpretación de los resultados permitió afirmar que la enterotoxina induce apoptosis en las células epiteliales intestinales humanas. Este análisis contribuye de manera significativa a la comprensión de los mecanismos intracelulares posiblemente activados por esta toxina, que causan la muerte celular.

Introducción

La *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*) se considera entre los principales agentes enteríticos. Ampliamente distribuida en la naturaleza, esta especie es capaz de producir infecciones en peces y anfibios de interés comercial, lo cual causa importantes pérdidas en la esfera económica [1]. Se estima que la *A. hydrophila* es uno de los más frecuentes microorganismos causales de trastornos intestinales, como cuadros clínicos diarreicos en los seres humanos a partir de intoxicaciones por alimentos y/o ingestión de aguas contaminadas [2, 3]. Este microorganismo puede transmitirse, además, a través de heridas abiertas, y actuar como oportunista, principalmente en hospederos inmunológicamente debilitados [4].

La enterotoxina citotóxica (Ent-ctx) sintetizada por esta especie, posee la capacidad de lisar eritrocitos, provocar daños irreversibles en diversas líneas celulares, inducir acumulación de fluidos en el intestino de diferentes modelos animales y llegar a ser letal cuando se inocula por vía intravenosa. Reconocida como el principal factor de virulencia asociado con la entero-patogénesis de la *Aeromonas* [5, 6], poco se conoce acerca de los mecanismos por los cuales esta toxina actúa en los enterocitos y desencadena las enfermedades gastrointestinales asociadas con esta especie.

Con el objetivo de ofrecer evidencias actualizadas al respecto, este trabajo pretende profundizar en el estudio y caracterización de los mecanismos de acción

de la Ent-ctx de la *A. hydrophila* en las células epiteliales intestinales humanas.

Materiales y métodos

Para la obtención y purificación de la Ent-ctx, se utilizó una cepa de *A. hydrophila* (AH191) aislada de leche contaminada, proveniente de la Fundación André Tosello, Campinas, SP, Brasil [2]. La caracterización del efecto citopático inducido por la toxina purificada se realizó en las líneas celulares de origen epitelial intestinal, HT29 y Caco-2. Para evaluar las dimensiones de este efecto, se hicieron análisis microscópicos y diferentes ensayos biológicos que comprendieron la determinación de la dosis letal citotóxica [7], el estudio de la cinética del efecto citopático y la comprobación de la inducción de apoptosis, con el empleo de técnicas electroforéticas e inmunocitoquímicas [8]. La presencia de genes responsables de la enteropatogenicidad en *Escherichia coli* (ST, LT, VT) en la muestra productora de la enterotoxina de *A. hydrophila*, se investigó por medio de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) [9].

Resultados y discusión

Muchos estudios han demostrado que la enterotoxina citotóxica de la *A. hydrophila* provoca daños en las células de los mamíferos [6, 10, 4]. Estas alteraciones pueden causar la pérdida de iones y pequeñas moléculas y ocasionar afectaciones en el

1. Report of the Food Drugs Administration, 2003 [sitio en Internet]. Disponible en <http://www.vf.cfsan.fda.gov>. Último acceso el 24 de marzo de 2004.

2. Martins LM, Falcón RM, Yano T. Incidence of toxic *Aeromonas* isolates from food and clinical cases. FEMS Immun. Med Microbiol 2002;32:237-42.

3. Borchardt MA, Stemper ME, Standridge JH. *Aeromonas* isolates from human diarrheic stool and groundwater compared by pulsed-field gel electrophoresis. Emer Infect Dis 2003;9:224-8.

4. Xin J, Ferguson MR, Popov VL, Houston CW, Peterson JW, Chopra AK. Role of a cytotoxic enterotoxin in *Aeromonas*-mediated infections: development of transposon and isogenic mutants. Infect Immun 1997;66:3501-9.

5. Chopra AK, Houston CW. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. Microbes Infect 1999;1:1129-37.

6. Abrami L, Fivaz M, van der Goot FG. Adventures of a pore-forming toxin at the target cell surface. Trends Microbiol 2000; 8:168-72.

7. Reed LJ, Munch H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am J Hyg 1938;27:493-7.

8. Falcón R, Carvalho HF, Joazeiro PP, Gatti MSV, Yano T. Induction of apoptosis in HT29 human intestinal epithelial cells by the cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila*. Biochem Cell Biol 2001;79: 525-31.

metabolismo celular [11, 12]. Los resultados de este trabajo demostraron que la enterotoxina citotóxica de *A. hydrophila* causó alteraciones morfológicas en las células epiteliales intestinales humanas. Los análisis microscópicos revelaron una intensa vacuolización citoplasmática, así como la pérdida de la unión celular, una condensación cromatínica y nuclear, así como la formación de fragmentos con contenido citoplasmático y nuclear. Similares alteraciones morfológicas se observaron al ensayar esta toxina en fibroblastos de pulmón [10]. En nuestros experimentos además se observó que la Ent-ctx causa intensa picnosis, fragmentación nuclear e internucleotídica de ADN [8]. El porcentaje de células apoptóticas presentes en las células epiteliales intestinales tratadas con la Ent-ctx fue seis veces mayor que en las células controles (ver tabla). Los ensayos de actividad citotóxica mostraron una rápida cinética de actuación (1 h) de esta toxina sobre las diferentes líneas celulares evaluadas, por lo que causa un efecto drástico e irreversible (ver figura). La dosis letal citotóxica obtenida fue de 5 µg/mL. Los aspectos morfológicos observados y la confirmación de la fragmentación nuclear permitieron afirmar que la enterotoxina citotóxica de *A. hydrophila* induce apoptosis en las células epiteliales intestinales humanas. Estos resultados confirman que la Ent-ctx, al igual que otras toxinas bacterianas ("Shiga-toxin", verotoxina de *E. coli*) son inductoras de procesos apoptóticos que provocan la muerte celular, lo cual pudiera interpretarse como un posible mecanismo de defensa del microorganismo bacteriano o una vía de acceso para la invasión y posterior replicación [13, 14]. No obstante, la técnica de RCP no reveló ninguna asociación entre los genes responsables por la enteropatogénesis en *E. coli* y la muestra de *A. hydrophila* utilizada en estos experimentos.

Table. Porcentaje de células apoptóticas en células epiteliales intestinales cuantificadas con el empleo de la técnica de Feulgen.

Células HT29	Células apoptóticas (%)	Desviación estándar
Control celular (sin tratamiento)	2.197	1.21
Células tratadas con la Ent-ctx	19.565	5.12

9. Blanco M, Blanco JE, González EA, Mora A, Jansen W, Gómez T, Zerbini LF, Yano T, Pestana de Castro AF, Blanco J. Genes encoding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic pheno-types. *J Clin Microbiol* 1997;35:2958-63.

10. Thelesman M, Ljungh A. Membraneda-maging and cytotoxic effects on human fibroblasts of α -and- β hemolysins from *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun* 1981;34:949-56.

11. Ferguson MR, Xing-Jing X, Houston CW, Peterson JW, Coppenhaver DH, Chopra AK. Hyperproduction, purification, and mechanics of actions of the cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun* 1997;65:4299-308.

12. Abrami L, Fivaz M, Glauser PE, Parton RG, van der Goot FG. A pore forming toxin interacts with a GPI-anchored protein and causes vacuolation of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 1998;140:525-40.

13. Zychlinsky A, Thirulamai K, Arondel J, Cantey JR, Aliprantis AO, Sansonetti PJ. *In vivo* apoptosis in *Shigella* infections. *Infect Immun* 1996;64:5357-65.

14. Fernández-Prada CM, Hoover DL, Tall BD, Venkatesan MM. Human monocyte-derived macrophages infected with virulent *Shigella flexneri* *in vitro* undergo a rapid cytolytic event similar to oncosis but not apoptosis. *Infect Immun* 1997;65:1486-96.

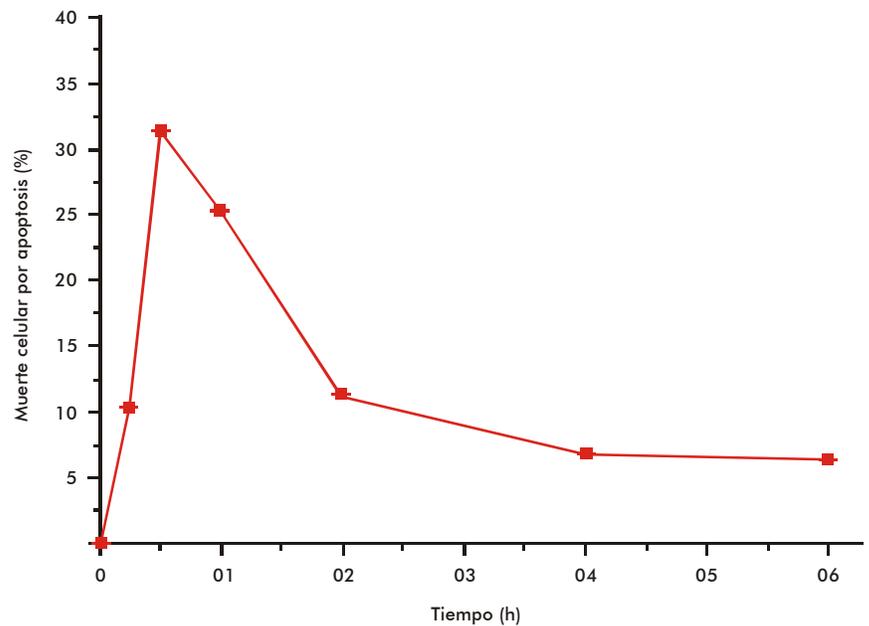


Figura. Cinética de la muerte celular (%) mediante apoptosis inducida por la enterotoxina citotóxica de *Aeromonas hydrophila*. La cuantificación se realizó con el empleo del ensayo inmunocitoquímico de TUNEL.

La realización de este trabajo permitió describir detalladamente aspectos relacionados con las alteraciones morfológicas e intracelulares provocadas por la Ent-ctx de *A. hydrophila* en células epiteliales humanas, lo cual demuestra que esta toxina, además de sus propiedades biológicas, es capaz de inducir la muerte celular mediante apoptosis. La interpretación de estos resultados contribuirá a enriquecer los conocimientos acerca de los mecanismos de acción de las toxinas formadoras de poros, que causan efectos citotóxicos irreversibles en diferentes líneas celulares. También se podrá dilucidar la posible función de la Ent-ctx en las enfermedades gastrointestinales asociadas con esta entidad bacteriana.

Agradecimientos

A Ana Stella Menegon y a Ana Lúcia Rodrigues por la asistencia técnica brindada y a la Fundación de Amparo a Investigaciones, del Estado de Sao Paulo (SP, Brasil), por el financiamiento para la realización de este trabajo.