

Lej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

FACTORES DE VIRULENCIA BACTERIANA

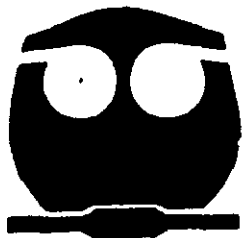
TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION MANCOMUNADO

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

PRESENTAN:

IRMA JESSICA AVALOS GONZALEZ y

SARA MARLEN UGALDE MATEHUALA



MEXICO, D. F.

1999

EXAMEN PROFESIONAL PROC. DE QUIMICA

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

201336



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Profr. RAÚL GARZA VELASCO
Vocal: Profa. MAITE ASTIGARRAGA ZA VALETA
Secretario: Profr. ANTONIO CASTILLO DURÁN
Primer suplente: Profr. LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ
Segundo suplente: Profa. NORMA TREJO MEDINA

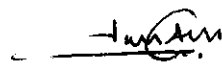
El tema se desarrolló en la Biblioteca de las Facultades de Química y de Medicina de la UNAM, así como en diversas bibliotecas del Sector Salud.

Asesor del tema:



QFB. Raúl Garza Velasco

Sustentantes:



Irma Jessica Ávalos González



Sara Marién Ugalde Matchuala

A nuestro asesor Raúl Garza Velasco

Porque gracias a su dedicación, enseñanza y apoyo fué posible la realización de este trabajo.

A Dios

Por darnos la oportunidad de vivir y de consolidarnos como profesionistas.

A mis padres

Por ser un ejemplo a seguir;
por su amor, esfuerzo,
motivación, comprensión y
confianza en mi formación
profesional y durante la
realización de este trabajo.
Sin su apoyo no lo hubiera
logrado.

A mis hermanos

Por su apoyo, comprensión
y compañía durante esta
etapa de mi vida.

A mis familiares

Por su cariño, apoyo y
estímulo para seguir
siempre adelante.

A Daniel L.G

Por su amor, apoyo y
motivación para alcanzar
esta meta.

Irma Jessica Avalos González

A mi Mamá

Por ser mi más grande
motivación; por el amor, el
apoyo y la comprensión que
me has brindado cada día de
mi vida.

Sin ti, no lo hubiera
logrado.

A mi hermano David

Por aceptarme y quererme
como soy.

A mis familiares

Victor, Martha, Susana,
Rafael, Luis, Víctor,
Sandra, Margarita, Flor y
mi abuelita por su cariño y
apoyo.

A David H.M

Por el amor y el apoyo que
me has dado.

*Gracias por permanecer
junto a mí.*

Sara Marlén Ugalde Matehuala

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
I. PRINCIPALES MECANISMOS DE DEFENSA EN EL HUMANO	
i. Factores y mecanismos constitutivos inespecíficos	4
ii. Defensas específicas inducibles	12
II. EL PROCESO INFECTIVO	
i. El foco infeccioso	15
ii. Las vías de transmisión	16
iii. La penetración bacteriana al organismo del hospedero	19
iv. Las vías de acceso al tejido "blanco" primario	20
v. El establecimiento bacteriano en los tejidos del hospedero	21
vi. Las vías de diseminación	22
III. FACTORES ASOCIADOS A LA INVASIVIDAD BACTERIANA	
i. Adherencia	26
ii. Movilidad y quimiotaxis	39
iii. Liberación de exoenzimas hidrolíticas	41
iv. Producción de IgA hidrolasas	42
v. Procuración del hierro	43
vi. Evasión de fagocitos, anticuerpos y el complemento	44
vii. Invasión y residencia intracelulares	50

IV. TOXIGENICIDAD BACTERIANA	
i. Exotoxinas	58
ii. Endotoxinas	72
V. REGULACIÓN DE GENES DE VIRULENCIA EN LAS BACTERIAS	
i. Retos de adaptación a superar por las bacterias patógenas	76
ii. Importancia de los genes de virulencia	78
iii. Tipos de regulación génica	80
• Amplificación y rearrreglos génicos	81
• Regulación transcripcional	84
• Regulación post-transcripcional	95
VI. EL DISEÑO RAZONADO DE VACUNAS ANTIBACTERIANAS	
i. Panorama general	98
ii. Características de una vacuna óptima	100
• Estimulación de una basta respuesta inmune	100
• Obtención del tipo adecuado de respuesta	101
• Generación de una respuesta protectora	104
• Costo de una vacuna	105
• Seguridad	106
CONCLUSIONES	108
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

INTRODUCCIÓN

Sin lugar a dudas, los padecimientos bacterianos destacan por su frecuencia, gravedad y diversidad; entre ellos figuran los siguientes: a) las numerosas intoxicaciones alimentarias asociadas a la ingestión de toxinas liberadas en los alimentos y en las fórmulas lácteas por especies tales como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*; b) las cotidianas enteritis y gastroenteritis debidas a *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens* y a diversos serogrupos de *Escherichia coli*; c) la faringoamigdalitis estreptocócica, que acosa a los menores de 2 años pudiendo desencadenar cuadros adicionales de fiebre escarlatina, erisipela y/o las enfermedades autoinmunes tales como la fiebre reumática y la glomerulonefritis; d) las afecciones de transmisión sexual, entre las que figuran la clamidiasis genital, la gonorrea y la sífilis; e) otras entidades clínicas como el tracoma -la causa más frecuente de ceguera previsible en el mundo-, tuberculosis, difteria, tosferina, tétanos, botulismo, fiebre tifoidea, síndrome del shock tóxico, colitis pseudomembranosa, brucelosis, lepra, tífus y leptospirosis; f) algunas afecciones de moda, tales como la aterosclerosis y la enfermedad coronaria (por *Chlamydia pneumoniae*), así como la gastritis, las úlceras gástricas/duodenales y el cáncer gástrico por *Helicobacter pylori* (28, 88).

En este sentido, es indispensable profundizar en el conocimiento de los orígenes de dichas afecciones para determinar los tratamientos adecuados -que impidan que la humanidad pierda el combate entre la eficacia terapéutica y el desarrollo de resistencia bacteriana- pero, principalmente, para avanzar de manera ordenada y decisiva en su prevención. Esta última meta incluye el establecimiento y difusión de medidas sanitarias pero, además, debe fundamentarse en el diseño de estrategias científicas que conduzcan hacia el control y/o la eliminación de los focos infecciosos y a la óptima inmunización de la población (30, 53, 67, 79, 88).

El estudio de los factores y mecanismos de virulencia bacteriana representa la base de los objetivos anteriores, ya que su definición da lugar a la búsqueda de soluciones viables en el campo de la salud pública; evidentemente, la detección de las vías de transmisión de un agente etiológico, de su tejido "blanco" y de las estrategias que emplea para sobrevivir y para ocasionar enfermedad, resulta tan indispensable como ventajoso, habida cuenta de que incluye procesos que abren un panorama muy distinto al que se suponía hace apenas algunos años (30, 41, 53, 67, 79, 88).

El presente trabajo describe los hallazgos recientes más significativos en este rubro, intentando despertar una mayor atención hacia los aspectos generales más trascendentales en el campo de la Bacteriología.

OBJETIVOS

- Señalar algunos de los mecanismos de defensa del hospedero, cuyas acciones suelen ser neutralizadas por las bacterias patógenas.
- Mencionar los eventos de mayor relevancia que caracterizan al proceso infeccioso.
- Describir las estrategias asociadas al establecimiento, reproducción, sobrevivencia y toxigenicidad de las bacterias patógenas en el organismo del hospedero.
- Destacar las características más trascendentales que deben presentar las vacunas antibacterianas elaboradas en los tiempos actuales.

I. PRINCIPALES MECANISMOS DE DEFENSA EN EL HUMANO

En general, se acepta que las defensas del organismo humano se pueden dividir en dos categorías (15, 88):

- Constitutivas inespecíficas, las cuales representan la primera línea de resistencia y actúan en contra de cualquier microorganismo, independientemente de su orden, familia, género, especie o tipo.
- Específicas inducibles, que agrupan a aquéllos elementos dirigidos exclusivamente contra una especie o cepa en particular y cuya activación se pone de manifiesto en los 5 a 10 días que suceden al ingreso del agente invasor en el hospedero.

i. Factores y mecanismos constitutivos inespecíficos

La integridad de la piel

Cuando la piel se encuentra íntegra (sin escoriaciones u otras lesiones), constituye una barrera antimicrobiana muy efectiva, debido a su sólida

estructura, pH ligeramente ácido (cerca a 5) y temperatura menor de 37°C. A las características anteriores se suman el continuo proceso de descamación, así como la lubricación y el permanente lavado químico-mecánico de los poros y folículos pilosos, con altas concentraciones de lípidos, cloruro de sodio y lisozima (88).

La integridad de las membranas mucosas

Éstas recubren a los tractos respiratorio, gastrointestinal y genitourinario, y corresponden a la prolongación de la piel dentro del organismo humano; están conformadas por una monocapa de células vivas denominadas epiteliales, aunque realmente se trata de una mezcla constituida por: **a)** células “capa”, que elaboran y secretan mucina; **b)** células “M”, que participan en la detección de inmunógenos; y **c)** células “ciliadas”, que emiten los vellos y cilios implicados en la expulsión del moco (evitando su acumulación) (12, 13, 15, 19, 40, 49, 77).

El hecho de que las mucosas se encuentren integradas por diversos tipos de células favorece al organismo del hospedero -dadas las diversas funciones de todos ellos-, aunque también resulta benéfico para las bacterias que pretenden establecerse en las regiones involucradas, ya que exponen varias clases de receptores asociados al fenómeno de adherencia (12, 15, 77).

Evidentemente, uno de los elementos de protección de los epitelios es el moco; éste es una sustancia espesa y pegajosa de naturaleza glucoproteica que atrapa fácilmente a los agentes microbianos pero, además, su elevado contenido en IgAs (inmunoglobulina A secretoria) incrementa su capacidad adherente y la presencia de lactoperoxidasa complementa sus propiedades antiparasitarias (49, 55).

La membrana mucosa de la boca y de los ojos suma algunos otros elementos de defensa, tales como la ptialina y la lisozima, en tanto que el tracto respiratorio es reforzado por reflejos mecánicos tales como la tos y el estornudo; por su parte, el tubo gastrointestinal también cuenta, a nivel gástrico, con su notable acidez y la acción hidrolítica de la pepsina, tripsina y quimiotripsina; en el intestino delgado, con las sales biliares y el jugo pancreático (lipasas, peptidasas y bicarbonato) y, en el colon, con la microflora simbiote, que compete ventajosamente con los patógenos por los nutrientes, los receptores y el oxígeno (55).

Por lo que se refiere a los epitelios vaginal y cervical, estos también se encuentran colonizados por microorganismos simbiotes y manifiestan un pH

muy ácido (dado el poder altamente fermentativo del bacilo de Döderlein); en cuanto al tracto urinario, el eficiente lavado de los conductos por parte de la orina, se adiciona al resto de los factores antimicrobianos existentes en todas las mucosas (16, 49).

Los agentes quelantes del hierro

Dado que el hierro representa un elemento vital tanto para los agentes bacterianos como para el organismo humano, este último sintetiza moléculas proteicas que lo fijan para que pueda ocurrir la síntesis de citocromos y hemoglobina, al tiempo de que reducen casi a cero sus concentraciones en forma libre. Esta estrategia permite al hospedero limitar el crecimiento bacteriano, con base en la participación de proteínas quelantes tales como la transferrina, ferritina y lactoferrina (17, 19, 24).

La fagocitosis

Este mecanismo de defensa reside fundamentalmente en las características antimicrobianas de los denominados fagocitos profesionales, a los cuales pertenecen los neutrófilos y la serie monocito-macrófago. Ambos tipos de células poseen la capacidad para desplazarse por quimiotaxis hasta los tejidos en

los que se requiere enfrentar al agente invasor, para englobar a este último (mediante la emisión de pseudópodos fagocitarios, previa reacción entre las superficies de ambos protagonistas) y provocar su muerte (exponiéndolo a su contenido lisosomal); sin embargo, el proceso que ocurre en los macrófagos también suele representar el punto de intersección entre las defensas inespecíficas y específicas, ya que después de inactivar al parásito, dichos fagocitos procesan sus componentes estructurales y los presenta como inmunógenos a los linfocitos T (cooperadores o citotóxicos), para dar origen a la respuesta inmune (5, 21, 43, 44, 80, 90, 95).

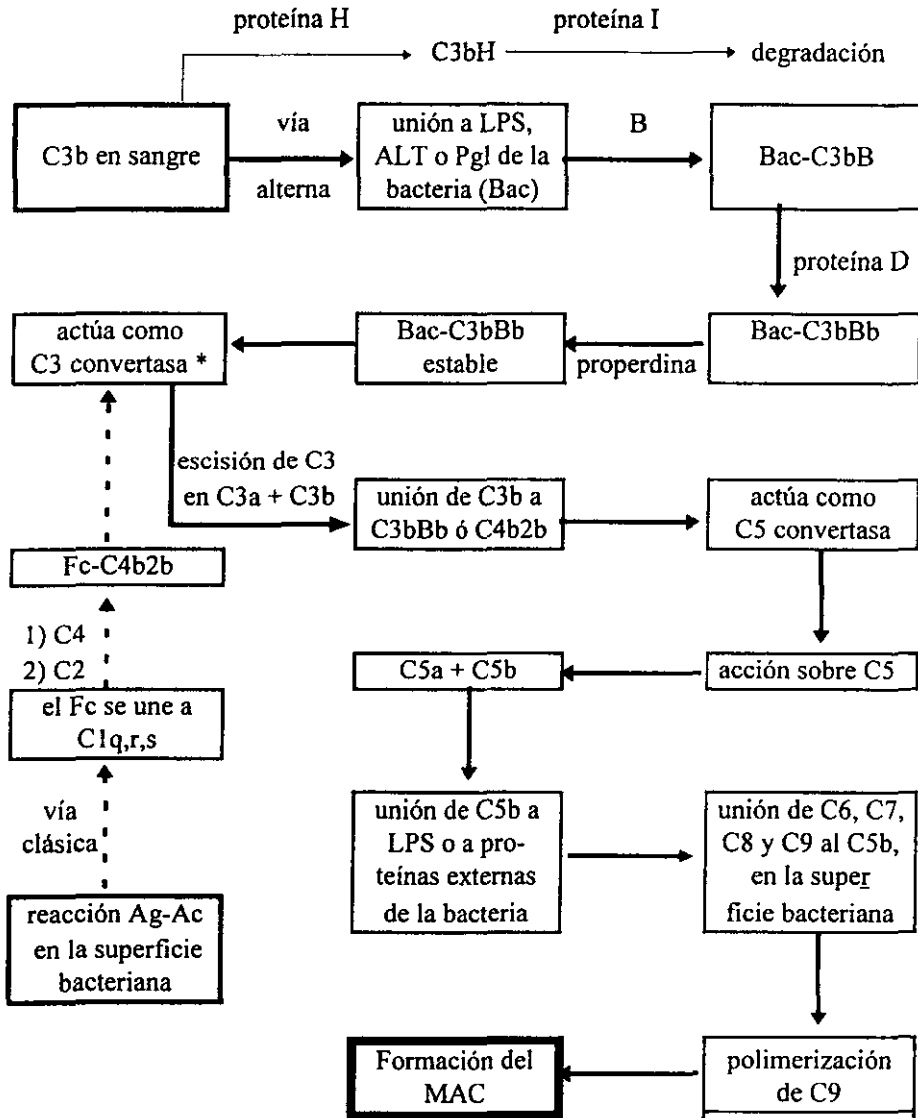
Cabe subrayar que la fagocitosis adquiere mayor eficacia cuando participan las opsoninas (sustancias que la facilitan y promueven) y que, de éstas, el organismo del hospedero elabora al menos dos clases: el péptido C3b, cuya acción es inespecífica porque reconoce a cualquier microorganismo, y los anticuerpos IgG; ambas opsoninas potencian la fagocitosis, dado que pueden unirse muy estrechamente a la superficie del invasor y, además, cuentan con numerosos receptores localizados en la membrana de neutrófilos y macrófagos. En este sentido, la fagocitosis suele catalogarse como un mecanismo inespecífico de defensa, siempre que en ella no participen las IgG (90, 95).

La acción lítica del complemento

El sistema del complemento se constituye por varias proteínas que se activan en forma de cascada hasta generar una molécula lítica denominada “complejo de ataque a la membrana” (MAC), que promueve la destrucción de las células microbianas, lesionando sus estructuras superficiales(73).

La activación de este sistema se concreta a través de dos vías diferentes: la alterna, que se considera inespecífica debido a que ocurre cuando el péptido C3b previamente unido a la membrana externa de cualquier microorganismo reacciona secuencialmente con las proteínas séricas B, D y properdina; en cuanto a la segunda, recibe el nombre de clásica, y se dispara como consecuencia de la reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac). Ambas vías incluyen la síntesis de sus respectivas C3 convertasas y, a partir de los siguientes pasos, siguen un camino común que conduce a la formación del MAC (consultar el diagrama 1) (73).

Diagrama 1. Principales eventos asociados a la activación del complemento (73).



CLAVES: LPS = lipopolisacáridos; ALT = ácidos lipoteicoicos; Pgl = peptidoglicano; * = la activación del complemento por las vías clásica y alterna es compartida a partir de la formación de sus respectivas C3 convertasas; MAC = complejo de ataque a la membrana.

La proteína sérica de alta afinidad por la manosa

Este carbohidrato se localiza en la superficie de numerosas bacterias, pero está ausente en las células del hospedero. En este sentido, se ha observado que los macrófagos que procesan agentes bacterianos liberan interleucina 6 (IL-6), la cual estimula al hígado para que, a su vez, sintetice una proteína sérica que manifiesta una alta afinidad por la manosa; una vez que esta proteína se ha unido a su carbohidrato-receptor, potencia la activación del complemento y, por ende, la destrucción del microorganismo involucrado (44, 73, 83).

La fiebre

Aunque por sí misma ésta puede evidenciar efectos bacteriostáticos o bactericidas sobre algunos agentes invasores, su mayor contribución antimicrobiana consiste en incrementar la reactividad de las diversas moléculas proteicas implicadas en la defensa del hospedero (31).

Al parecer, los incrementos de temperatura experimentados por los hospederos enfermos tienen su origen en la participación de IL-1 y otras moléculas de naturaleza desconocida, liberadas respectivamente por los macrófagos en plena acción fagocitaria y los neutrófilos que entran en contacto con lipopolisacáridos

(LPS) provenientes de la pared celular de las bacterias Gram negativas (5, 15, 43, 80, 90).

Cabe señalar que, debido a que la fiebre elevada representa un riesgo para el propio hospedero y a que los regímenes terapéuticos incluyen algún fármaco para neutralizarla, su clasificación como mecanismo de defensa suele ser cuestionada y hasta ignorada por numerosos autores (31).

La inflamación

El proceso inflamatorio abarca a los diversos factores y mecanismos del hospedero cuya finalidad conjunta consiste en lograr la erradicación de los patógenos y promover la restauración de los tejidos lesionados; es decir, incluye a la fiebre, la fagocitosis, la activación del complemento y la reactividad de la proteína sérica de alta afinidad por la manosa, entre algunos otros, y se dice que sus puntos cardinales (manifestaciones) son el calor, rubor, tumor (o edema) y dolor (5, 12, 15, 31, 41, 73, 80, 90, 95).

ii. Defensas específicas inducibles

Los anticuerpos son proteínas integradas por dos cadenas pesadas (H) y dos ligeras (L), unidas entre sí por puentes disulfuro; cada uno presenta una región

constante (compartida con otros, independientemente del antígeno con el cual reaccionan) y una región variable, en donde reside su especificidad. Con respecto a su origen, son producidos y liberados por las células plasmáticas las cuales, a su vez, corresponden a linfocitos B maduros (46, 88).

Cuando un agente microbiano penetra al organismo del hospedero, se expone a entrar en contacto con macrófagos o con una parte de los linfocitos B que es capaz de sintetizar anticuerpos dirigidos contra alguna de sus determinantes antigénicas. En tal contexto, el microorganismo es inactivado y procesado, y sus epítopes son trasladados hasta la superficie de dichas células¹ -merced al desplazamiento de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC)²-, para ser presentados a los linfocitos T cooperadores(7, 63, 64, 71, 95).

Como consecuencia de los eventos anteriores, los linfocitos T cooperadores se dividen y liberan linfocinas que amplían la información sobre las determinantes antigénicas del agente invasor, activando específicamente a las clonas de

¹ Por tal razón, macrófagos y linfocitos B se consideran "células presentadoras de antígeno"; los epítopes microbianos de naturaleza polisacárida, lipopolisacárida o predominantemente lipídica sólo son presentados por los linfocitos B.

² El MHC de clase II soporta epítopes pertenecientes a parásitos extracelulares y el MHC de clase I realiza la misma función cuando se trata de patógenos capaces de reproducirse intracelularmente; en este último caso, también participan linfocitos T citotóxicos que destruyen a las células hospedadoras en cuyo interior se reproduce o replica el invasor.

linfocitos B que producen anticuerpos contra alguno de los epítopes implicados (7, 46, 63, 64, 71, 95).

Finalmente, una porción de dicha clona permanecerá como “células de memoria” que podrán iniciar el proceso -junto con otros macrófagos- en episodios futuros y, la restante, evolucionará a células plasmáticas formadoras del anticuerpo requerido (64).

Es conveniente precisar que, aunque existen 5 clases de anticuerpos: IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, sólo a las tres primeras se les reconoce plenamente alguna relevancia en la defensa del hospedero: la IgG puede actuar como opsonina, neutraliza toxinas y activa el complemento; la IgM sólo hace esto último y, la IgA, incrementa la adhesividad de la mucina; por ello, las dos primeras predominan en los tejidos, la sangre la linfa y otros líquidos internos, mientras la tercera sólo abunda en los epitelios mucosos y en la leche materna (7, 49, 55, 73, 88).

II. EL PROCESO INFECTIVO

Sin lugar a dudas, tanto la totalidad de las bacterias invasivas como la mayoría de las toxigénicas, requieren de infectar (establecerse y reproducirse en) los tejidos de su hospedero para ejercer su acción patógena. De acuerdo con el diagrama 2, los factores y eventos más relevantes del proceso infeccioso, son los siguientes (4, 53, 68, 79, 87):

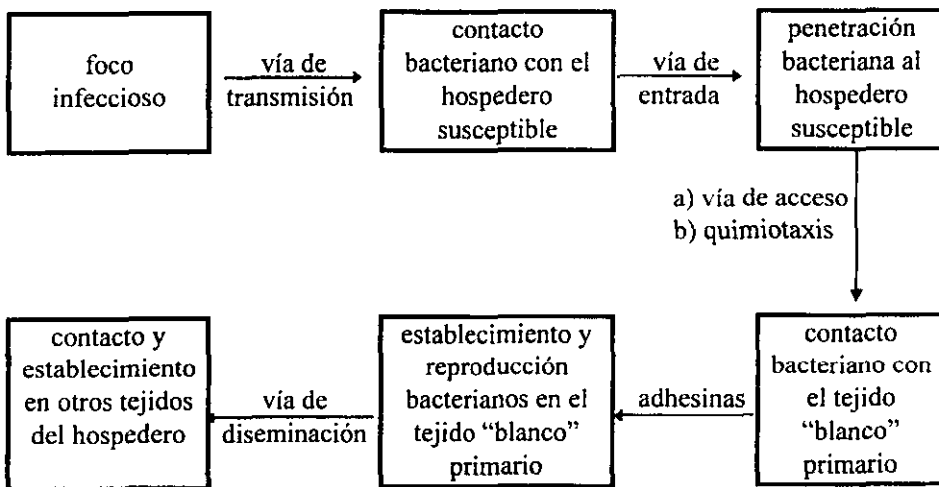
i. El foco infeccioso

Éste es el término que denota al sitio u organismo en donde se encuentra originalmente el patógeno; en este sentido, los focos infecciosos más frecuentes son (22, 53, 87):

- Otros seres vivos infectados, se trate de enfermos o, simplemente, de portadores asintomáticos.
- El material orgánico contaminado; por ejemplo, la materia fecal, orina, expectoraciones, secreciones purulentas, los cultivos de laboratorio, etc.

- Materiales diversos, tales como tinacos, tuberías, instrumental quirúrgico, utensilios de cocina, la basura, etc.

Diagrama 2. El proceso infeccioso (4, 22).



ii. Las vías de transmisión

Éstas involucran a cualquier objeto o mecanismo de los que se vale el parásito para trasladarse desde el foco infeccioso hasta el hospedero susceptible de ser infectado; las principales son (4, 22, 53, 87):

Los vectores inanimados. En este rubro se cuentan el agua, los alimentos, las bebidas, los denominados fomites -varios objetos y ropa de cama con los que entran en contacto los individuos infectados previamente-, así como el aire, el polvo y las microgotas de saliva emitidos mediante la tos y el estornudo; por lo regular, cuando se hace referencia a uno o más de los tres últimos se emplea el término de “vía aérea”.

Los vectores mecánicos. Este grupo incluye a los artrópodos que trasladan al microorganismo sin que éste se reproduzca o cumpla parte de su ciclo vital durante el recorrido, y el ejemplo típico alude a la mosca doméstica, siempre que se trate de la que sólo transporta al agente infeccioso en las vellosidades de sus patas y lo deposita en algún otro transmisor (alimentos, bebidas, etc.) o directamente en la piel lesionada del hospedero susceptible.

Los vectores biológicos. Con este nombre se designa a los artrópodos en los cuales el patógeno se reproduce o cumple parte de su ciclo vital durante el traslado. En concreto, se trata de garrapatas, ácaros, pulgas, piojos, etc., que transmiten a rickettsias y borrelias, entre algunas otras bacterias.

El contacto directo. En este caso, el ejemplo más representativo es el correspondiente a las enfermedades de transmisión sexual, tales como la sífilis, la gonorrea, las clamidiasis genitales, el SIDA, el herpes genital, etc. En todas ellas, los agentes causales suelen ser transmitidos directamente, de un enfermo o portador a otro hospedero susceptible.

La vía transfusional y los trasplantes. Como es sabido, el trasplante de órganos, así como las transfusiones de sangre y sus derivados pueden transmitir a ciertos microorganismos, desde el donador hasta el receptor. Entre los agentes etiológicos involucrados se cuentan los virus de la hepatitis, del SIDA y el citomegalovirus (CMV) y diversas bacterias y protozoarios (*Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, etc.).

La vía transplacentaria. Ésta asocia a los agentes microbianos que se transmiten durante la gestación, de la madre al producto, destacando *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii* y los virus de la rubéola y del SIDA, entre algunos otros.

La vía personal indirecta. En numerosas ocasiones, el mismo individuo se provoca afecciones al llevarse la mano a alguna región anatómica en la que se

encuentra originalmente el parásito y, posteriormente, la posa sobre otra. Por ejemplo, cuando una clamidia que se localiza originalmente en los genitales es trasladada hasta la conjuntiva ocular. Indudablemente, existen otros muchos casos análogos aunque, el de mayor frecuencia, es el representado por el modelo ano-mano-boca.

iii. La penetración bacteriana al organismo del hospedero

Después de haberse concretado el contacto entre el microorganismo y el hospedero susceptible, el paso siguiente es el de penetración del primero en el organismo del segundo; en este sentido, las vías de entrada son las siguientes(4, 22, 53, 87):

- Oral
- Cutánea
- Inhalatoria
- Oftálmica
- Ótica
- Uretral
- Vaginal
- Rectal

Cabe mencionar que, en el caso de la vía cutánea, generalmente se clasifica como “condicionada” -cuando el agente causal requiere de que ocurra la previa lesión de la piel, para poder penetrar a través de ella-, o bien, como “activa”, para aclarar que el microorganismo atraviesa la piel, aunque inicialmente ésta se

encuentre íntegra, ya sea porque el primero produzca enzimas que la hidrolizan o porque penetre a través de glándulas sudoríparas o sebáceas (4, 22).

iv. Las vías de acceso hacia el tejido “blanco” primario

Lógicamente, la vía de entrada determina cuál será el camino que conducirá al agente bacteriano hasta el primer tejido “blanco” en el que intentará establecerse. Por ejemplo, cuando penetra por vía oral, su respectiva vía de acceso será: boca-faringe-esófago-estómago-intestino, como en el caso de los patógenos intestinales; sin embargo, si estos mismos llegan a penetrar por la vía inhalatoria, avanzarán por otra vía: narinas-faringe-laringe-tráquea-bronquios-bronquiolos-pulmones y, consecuentemente, no entrarán en contacto con su tejido “blanco”. Es preciso recordar que, aunque los dos accesos citados incluyen a la faringe, el hecho de que exista la epiglotis prácticamente los separa (13, 87).

Otros ejemplos de vías de acceso, son: uretra-vejiga-ureteros-riñones; vagina-útero-trompas de Falopio; epidermis-dermis-tejido subcutáneo-músculo; y conducto auditivo externo-membrana timpánica-oido medio-oido interno (4, 22).

v. El establecimiento bacteriano en los tejidos del hospedero

De acuerdo con lo antes mencionado, una bacteria patógena requiere penetrar por la vía de entrada adecuada para que le resulte posible recorrer la vía de acceso que la conduzca hasta las proximidades de su tejido “blanco” primario. Sin embargo, ello no basta para que dicho patógeno pueda concretar su proceso de infección; en tal sentido, aún deberá llevarse a cabo su contacto con las células “blanco” y, posteriormente, su adhesión a éstas (4, 22, 53, 87).

Por lo que se refiere al contacto, éste depende en gran medida de que las células del hospedero muestren una atracción química (quimiotaxis) mediada por las sustancias que excretan sobre la bacteria, a fin de que ésta pueda aproximarse a niveles íntimos; en este contexto, el radio de acción dentro del cual puede funcionar la quimiotaxis se denomina “distancia crítica” y se ha calculado en 35 nm (35×10^{-9} m) para *Salmonella typhimurium*, respecto a las células intestinales de ratón (4, 22).

Una vez que ha ocurrido el contacto, el establecimiento del patógeno en el tejido “blanco” primario dependerá de que el primero cuente con adhesinas y, principalmente, de que éstas sean complementarias de los “receptores” que se encuentran en la superficie de las células del hospedero. A este respecto, se ha

comprobado ampliamente que cuando *S. typhimurium* penetra por vía inhalatoria al organismo del ratón, llega hasta los pulmones pero no puede establecerse en ellos, porque las células involucradas no cuentan con “receptores” para las adhesinas de la especie señalada; en gran medida, este tipo de fenómenos también explica la diferente falta de susceptibilidad de especie, raza e individuo hacia los diversos agentes infectantes (13, 53, 87).

Cabe subrayar que la adherencia representa un paso determinante en el proceso infectivo, razón por la cual se profundizará en este tópico en el capítulo siguiente.

vi. Las vías de diseminación

Una vez que el patógeno se ha logrado establecer en su tejido “blanco” primario, existe la posibilidad de que aquél también colonice algunas otras regiones anatómicas, dependiendo de sus características propias, de las condiciones de los mecanismos de defensa del hospedero y de la ausencia de un régimen terapéutico adecuado y oportuno. En este aspecto, la mencionada diseminación puede ocurrir a través de las siguientes vías (4, 13, 22, 53, 87):

Por reproducción sostenida, mecanismo mediante el cual el microorganismo llega a alcanzar tejidos relativamente cercanos; por ejemplo, en la afección denominada “angina de Ludwig”, las células estreptocócicas de *S. pyogenes* se desplazan desde la faringe y amígdalas (en donde se encontraban inicialmente) hasta el suelo de la boca (debajo de la lengua).

Por desplazamiento de las secreciones. En diversos casos, el material mucoso y/o purulento que se genera en los tejidos colonizados por patógenos, se desplaza hacia otras regiones anatómicas obedeciendo, entre otros factores, a:

- Impulsos naturales relacionados con accesos “de bajada”; por ejemplo, una secreción originada en el riñón suele descender por los ureteros hasta la vejiga.
- Atracciones que se ejercen sobre ellas desde los sitios en donde se originan presiones negativas; de esta manera, las secreciones faríngeas suelen llegar hasta el oído medio, al abrirse la trompa de Eustaquio.

Por vía hematológica (sanguínea). Lógicamente, cuando la bacteria provoca procesos inflamatorio severos, puede llegar a presentarse la erosión de los vasos

y capilares sanguíneos; en esos casos, el patógeno penetrará al torrente circulatorio, habilitándolo como una segunda vía de acceso que lo conducirá a otros órganos internos del hospedero.

Por vía linfático-hematógena. En numerosos tejidos desembocan múltiples vasos linfáticos a los que el patógeno puede penetrar fácilmente; en tal sentido, cuando éste logra sobrevivir a la acción antiparasitaria de macrófagos y linfocitos, alcanzará el torrente circulatorio, a través de la vena subclavia localizada en el cuello.

III. FACTORES ASOCIADOS A LA INVASIVIDAD BACTERIANA

De acuerdo con numerosos autores, las dos principales características que confieren patogenicidad a las bacterias son la toxigenicidad y la invasividad; en cuanto a la primera de ellas, aquélla se define como la capacidad para producir toxinas (y se tratará en el siguiente capítulo) mientras que, por su parte, la invasividad se refiere a la facultad para penetrar, establecerse, reproducirse y diseminarse en los tejidos del hospedero (72, 88).

Cabe aclarar que el término invasividad también es utilizado para aludir concretamente a la capacidad de ciertas bacterias que se reproducen intracelularmente y se desplazan de una a otra células del tejido involucrado, ocasionando serios trastornos que pueden conducir a la muerte celular, debido al alto grado de disfunción metabólica que provocan, o inclusive, a la destrucción derivada de la entrada de grandes cantidades de agua a las células (por tendencia al equilibrio de Donnan: al originarse intracelularmente una elevada concentración de proteínas bacterianas, el agua penetra para tratar de equilibrar las concentraciones proteicas fuera y dentro de las células afectadas). Para quienes el término invasividad hace referencia específicamente a la vida

intracelular de los patógenos, el crecimiento y la diseminación de microorganismos virulentos sobre/fuera de las células del hospedero requiere de otras denominaciones: algunos sugieren la de colonización (la cual no permite descartar al fenómeno que implica a la flora habitual) y otros recomiendan la de invasión extracelular (19, 88).

En todo caso, es indudable que numerosas bacterias patógenas que sólo se reproducen extracelularmente también invaden los tejidos y, como ocurre en el caso de las intracelulares, producen factores de virulencia que les permiten adherirse a las células implicadas, reproducirse en su tejido “blanco” y neutralizar los mecanismos de defensa del hospedero (19, 61, 88).

Así las cosas, tanto los invasores extracelulares como los intracelulares comparten las propiedades y mecanismos que se describen a continuación (exceptuando las relativas a la residencia intracelular), para poder desencadenar las enfermedades infecciosas de las que figuran como agentes etiológicos (88).

i. Adherencia

Una vez que una bacteria contacta con su tejido “blanco”, intentará adherirse a la superficie de las células implicadas; este eventual logro resulta

particularmente importante en regiones anatómicas tales como la boca, el intestino delgado y el tracto urinario, ya que las mucosas implicadas son “lavadas” por diversos fluidos que arrastran con cierta facilidad a los microorganismos “libres”. Sin embargo, aún en zonas relativamente estancadas, tales como el colon y el tracto vaginal, el movimiento Browniano puede separar de la superficie tisular a las bacterias que no logran fijarse a las células del hospedador. A este respecto, es oportuno señalar que la mayoría de los patógenos se puede unir de manera más o menos estable a los tejidos humanos (6, 9, 19, 31, 35, 41, 61, 85, 88, 92).

***Pili* o fimbrias**

El mecanismo más conocido de adherencia bacteriana involucra la formación de enlaces mediados por proteínas fibrilares denominadas *pili* o fimbrias; estrictamente hablando, el término “fimbrias” es el correcto para referirse a este tipo de adhesinas, ya que el de “*pili*” se propuso originalmente para otras fibrillas más flexibles, localizadas en la superficie de las bacterias, que participan en la conjugación. Sin embargo, lo anterior es más ignorado que aceptado y, por lo general, como ocurre en el presente texto, ambos términos se emplean indistintamente (16, 48, 72, 88).

Un *pilus* se constituye básicamente por una secuencia ordenada de subunidades de pilina dispuestas de manera que forman una estructura cilíndrica; algunos *pili* aparentan poseer, adicionalmente, un segundo tipo de proteínas insertadas de manera alterna a lo largo de la fibrilla (16, 41).

Los *pili* son largos, flexibles y se extienden hacia el exterior de la superficie bacteriana para interactuar con la célula hospedera; aunque en diversas especies se encuentran distribuidos en todo el perímetro microbiano, en algunas otras sólo se les localiza en una o más regiones del invasor (16, 48, 72).

La punta de los *pili* median la adherencia bacteriana uniéndose a ciertas moléculas ubicadas sobre la superficie de las células de los tejidos; frecuentemente, estos receptores de las adhesinas fimbriales son residuos de carbohidratos, glicoproteínas o glicolípidos, cuya función primaria consiste en mantener unidas a las células de los tejidos, aunque también se acepta que representan señales relacionadas con mecanismos de transducción de dichas células (16, 72).

La unión de los *pili* a su célula “blanco” es tan específica, que los receptores presentes en los tejidos del hospedero determinan el tipo de bacterias que

colonizan la zona implicada. En algunos casos, la unión “específica” entre el carbohidrato superficial de la célula hospedera y el extremo distal del *pilus* depende de otras proteínas localizadas precisamente en la punta de la fibrilla; no obstante, numerosas reacciones de adhesión se basan en la participación directa de la pilina. Evidentemente, lo anterior no es fácil de definir, ya que esta proteína constituye más del 99 % de las fimbrias, por lo que las restantes pueden pasar inadvertidas en los análisis bioquímicos por medio de los cuales se determina la composición fimbrial (35, 48, 72, 85).

La secreción, el ensamble y el anclaje de cada *pilus* bacteriano representa un proceso complejo que requiere de la presencia de numerosas proteínas auxiliares. En el primero de los tres pasos mencionados, ocurre la secreción de pilina y de otras moléculas proteicas, a través de la membrana interna y en dirección hacia el espacio periplásmico; lógicamente, la secreción de las proteínas fimbriales requiere del transporte activo de dichas moléculas, desde el citoplasma (a través de las membranas externa e interna) hasta la superficie celular o el medio extracelular (6, 19, 34, 35, 48, 74).

Cabe señalar que, a la fecha, sólo se han detectado cuatro sistemas de secreción proteica en las bacterias Gram negativas, conocidos como I, II, III y IV, todos

los cuales emplean energía proveniente de la hidrólisis del ATP. A continuación se describen brevemente las principales características de cada uno (33, 34, 57).

Sistema de secreción tipo I. Éste se considera “sec-independiente”, ya que no requiere de la eliminación de la “secuencia señal” (la región amino-terminal) de la proteína a secretarse, ni involucra intermediarios periplásmicos; es decir, la secreción tiene lugar mediante un proceso continuo, en el que participan tres proteínas accesorias que forman el canal transmembranal por donde atraviesa el producto; las citadas proteínas accesorias incluyen a tres ATPasas: una de membrana interna, otra de membrana externa y la de fusión membranar (cuyo radio de acción abarca desde la membrana interna hasta el espacio periplásmico) (19, 34, 57).

Sistema de secreción tipo II. Se clasifica como “sec-dependiente”, ya que le es indispensable la presencia de una “secuencia señal” amino-terminal (conformada por aproximadamente 30 aminoácidos) en la proteína a secretarse; tal secuencia es eliminada de la molécula cuando ésta llega al periplasma -antes de cruzar la membrana externa- y el proceso global también incluye la participación de proteínas accesorias que originan canales por donde el producto puede desplazarse (19, 33, 34, 57).

Sistema de secreción tipo III. Corresponde a un sistema “sec-independiente” especializado en la exportación de factores de virulencia hacia las células hospederas, y generalmente se dispara hasta que el patógeno entra en contacto con su tejido “blanco”(8, 19, 33, 52, 57, 76).

La fase de crecimiento y diversas condiciones fisicoquímicas resultan determinantes en el proceso, y las moléculas a secretarse suelen provocar alteraciones en el funcionamiento de las células hospederas, facilitando la sobrevivencia y crecimiento del invasor (11, 34, 42, 57).

Se constituye por aproximadamente veinte proteínas situadas en las membranas externa e interna, aunque otras moléculas proteicas conocidas como “carabineras” o “chaperonas” también desempeñan papeles críticos: se unen al producto en el citoplasma, a fin de estabilizarlo, de evitar su plegamiento y de impedir su asociación a otras proteínas (11, 52, 57).

Los genes que codifican para la síntesis de las proteínas que promueven la exportación se localizan en el cromosoma bacteriano e indirectamente le confieren al microorganismo una gran variedad de propiedades, entre las cuales se cuentan la capacidad para adherirse, adquirir hierro y penetrar en las células

hospederas. Por ello, a los segmentos de DNA involucrados en su elaboración y en la producción de factores de virulencia se les denomina “islas de patogenicidad”, independientemente de que la información genética provenga de plásmidos, transposones o bacteriófagos (19, 27, 30, 34, 42, 51, 57, 68, 93).

Sistema de secreción tipo IV. Tal como ocurre en el tipo II, este sistema también es “sec-dependiente”; sin embargo, difiere de aquél en cuanto a que el transporte hacia la membrana externa no requiere de proteínas accesorias, ya que el mismo producto a secretarse genera poros en las membranas por las que debe cruzar para ser liberado al medio ambiente; por tal motivo, al proceso se le considera como “de autotransporte” (19, 33, 34).

Secreción proteica en las bacterias Gram positivas. En este grupo de microorganismos, la secreción de proteínas es aparentemente menos compleja; de hecho, una “secuencia señal” parece ser suficiente, aunque las moléculas encargadas de anclarse deben presentar diversas secuencias repetidas y, a continuación, un grupo carboxi-terminal, un hexapéptido, una extensión hidrofóbica de aproximadamente veinte aminoácidos y una “cola” cargada positivamente (14, 19).

Ensamble fimbrial. Tal como se mencionó con anterioridad, una vez que se han elaborado las proteínas fimbriales, éstas son protegidas por las “carabineras” o “chaperonas”, las cuales además las transportan hacia la membrana externa. En este sitio, la proteína “C” regula el ensamble: la porción adherente es desplazada hacia el exterior y las subunidades de pilina se van incorporando a su otro extremo (el interior), empujando a la punta adherente hasta que la fibrilla adquiere la longitud adecuada; finalmente, otra proteína periplásmica señala el final del proceso y, al parecer, origina el anclaje del extremo posterior a la pared celular (19, 74).

La producción de fimbrias es continua y permanente, no sólo para sustituir las fibrillas que se van perdiendo durante el desplazamiento de la bacteria o después de que ha sucedido la adherencia sino, adicionalmente, para evadir la acción neutralizante de los anticuerpos anti-*pili*; en este último sentido, se ha comprobado que varias especies son capaces de elaborar subsecuentemente otras clases de fimbrias, químicamente diferentes a las originales (fenómeno conocido como “variación antigénica”), para provocar la obsolescencia de los anticuerpos “bloqueadores” inducidos por las que hayan sintetizado con anterioridad (10, 62, 75, 88).

Es importante subrayar que algunos autores proponen que el verdadero papel de las adhesinas podría ser el de estabilizar el contacto bacteriano con sus células “blanco”, en tanto se forman enlaces más estables entre otras sustancias de superficie de uno y el otro protagonistas (19).

Los Pili P como modelos fimbriales. Algunos patógenos llegan a elaborar más de una docena de adhesinas diferentes, tomando en cuenta a las producidas por la misma clona en diferentes lapsos y a las elaboradas por diversas cepas de una misma especie; sin embargo, un considerable número de tales estructuras presenta propiedades comunes (19, 72).

Una de las características compartidas por los diferentes tipos de *pili* reside en la maquinaria molecular que se encarga de la biogénesis, el ensamble y el anclaje de cada *pilus* sobre la superficie bacteriana. A este respecto, los análisis de la denominada familia de *pili* P (*pili* asociados a pielonefritis), presente en cepas de *Escherichia coli* -y en muchos otros géneros Gram negativos-, han conducido hacia el mayor entendimiento de los procesos implicados (6, 8, 25, 37, 72).

En este sentido, el operón *pap* controla la elaboración de los *pili* P, codificando para la síntesis de las proteínas Pap, cuyas funciones son las siguientes (6, 8, 15, 19, 37):

- Pap D funge como la chaperona encargada de transportar diversas subunidades del *pilus*, desde la membrana citoplásmica hasta la membrana externa de la bacteria.
- Pap C recibe las moléculas trasladadas por Pap D y las acomoda en la membrana externa.
- Pap A, la subunidad más grande del *pilus*, es anclada a la membrana externa por Pap H.
- Pap E y la porción que funge como adhesina: Pap G, forman parte de la punta del filamento fimbrial.
- Pap F y Pap K se encuentran involucradas en la síntesis de la punta de la fibra.

Si bien los diferentes *pili* bacterianos cuentan con receptores distintos en sus respectivos tejidos “blanco”, varios aspectos del operón *pap* aplican para numerosos sistemas fimbriales, e inclusive, las proteínas implicadas llegan a ser intercambiables. Por ejemplo, una gran familia de por lo menos trece

chaperonas periplásmicas muy similares a Pap D median el ensamble de los *pili* K88, K99 y el producido por *Haemophilus influenzae*, entre muchos otros (6, 8, 16, 37, 38).

Adicionalmente (6, 19, 38):

- Las secuencias genómicas de *pili* pertenecientes a distintos patógenos se han logrado localizar, al alinearse a operones implicados en la biogénesis de fimbrias conocidas.
- Secuencias muy parecidas a las del operón *pap* también se han detectado en los genes asociados a diversas cápsulas bacterianas y a los LPS.
- Chaperonas análogas a las Pap son necesarias para diversas adhesinas no fimbriales, incluidos la hemaglutinina filamentosa (FHA) y el antígeno pH 6 de *Yersinia pestis*.

Adhesinas no fimbriales

Algunas bacterias poseen proteínas superficiales cuya estructura y proceso de ensamble difieren de los observados en los *pili*, aunque también funcionan

eficazmente como determinantes de adherencia; dichas sustancias reciben genéricamente el nombre de “adhesinas no fimbriales” y su participación suele ser independiente de la ausencia o presencia de *pili*, si bien en algunas cepas podría suceder a la de estos; además, buena parte de ellas reconocen como sus receptores a ciertas proteínas superficiales en los “tejidos blanco”, en lugar de unirse a carbohidratos (19, 85).

Dado que prácticamente todos los estudios asociados a los *pili* se han realizado en bacterias Gram negativas, aún persisten diversas dudas acerca de las estructuras de adherencia de las Gram positivas. Ciertamente, algunas especies de este último grupo también se encuentran recubiertas por proyecciones semejantes a las fimbrias; no obstante, dichas estructuras podrían no fungir como determinantes de adherencia; en este aspecto, se ha comprobado recientemente que: a) numerosas mutantes experimentales de *Streptococcus pyogenes* carecen de fibrillas constituidas por proteína M, pero su capacidad adherente no desaparece ni disminuye; y b) la principal adhesina de *S. pyogenes* es su proteína F no fimbrial, cuya receptora es la fibronectina presente en los eritrocitos y en muchas otras células humanas (18, 19, 85).

Biopelículas (*Biofilms*). Además de las proteínas no fimbriales, también se han detectado densas capas de microorganismos que aparecen sobre las superficies colonizables; en dichas biopelículas sólo la capa más interna se encuentra unida a la superficie “blanco”, ya que las exteriores se fijan a las anteriores por medio de matrices de polisacáridos (9).

Las biopelículas se han observado en micrografías electrónicas del tracto intestinal, boca, pulmones y vagina, así como de sondas, catéteres y prótesis empleados en medicina clínica. En cuanto a los perjuicios que provocan al aparecer en estos últimos dispositivos empleados en medicina clínica, debe tomarse en cuenta que (9):

- Numerosos fragmentos liberados de las biopelículas pueden ingresar a riñones y al torrente circulatorio, agravando notablemente los cuadros patológicos de los individuos implicados.
- Sus compactas estructuras suelen impedir la acción de los antibióticos y de los fagocitos, por lo que es indispensable retirar los materiales plásticos colonizados que se hayan insertado en el organismo del enfermo³.

³ Dada la gran cantidad de problemas intrahospitalarios generados por el desarrollo de biopelículas en las sondas, catéteres y prótesis, actualmente se realizan diversas investigaciones tendientes a encontrar otros materiales que inhiban la adhesión bacteriana.

Finalmente, es preciso mencionar que, aún cuando algunos patógenos carecen de adhesinas o cuando éstas no resultan complementarias de los receptores presentes en una mucosa, la eventual acumulación del moco -ya sea por síntesis excesiva del mismo o por ineficacia de los vellos y cilios- llega a promover el establecimiento y la reproducción bacterianos (55, 85, 88).

ii. Movilidad y quimiotaxis

Algunas mucosas humanas, tales como las del intestino delgado y el tracto urinario, se encuentran aún más protegidas de la colonización bacteriana, ya que presentan peristaltismo o son irrigadas constantemente por fluidos de desplazamiento rápido. Por tal motivo, las bacterias móviles suelen contar con mejores oportunidades para entrar en contacto con las células epiteliales; de hecho, para intentar su posterior adherencia a los tejidos, los microorganismos inmóviles dependen casi exclusivamente de los segmentos curvos y de las contracciones -que provocan el traslado de los contenidos luminales- asociadas a los tractos correspondientes (72).

Además, la movilidad resulta determinante para el avance bacteriano a través de la capa de mucina que recubre al epitelio de las mucosas pero, principalmente, es necesaria para que la dirección del desplazamiento dependa de las señales

quimiotácticas originadas en las células “blanco” y basadas en los gradientes de concentración de los carbohidratos y aminoácidos existentes (29, 72).

El flagelo bacteriano representa una eficaz máquina de propulsión que guía al patógeno; por lo regular, un sistema flagelar plenamente funcional presenta dos componentes principales: una estructura susceptible de ser observada al microscopio, que incluye un filamento helicoidal rígido, regulado desde la base por un dispositivo rotatorio complejo, y un control integrado por una red bioquímica que transmite la información química y física -proveniente del medio externo-; las señales bioquímicas generadas por dicha red influyen en la dirección de la rotación flagelar y, por lo tanto, en la conducta migratoria de la bacteria (29, 72, 75).

La movilidad a través de flagelos es la más estudiada por los investigadores, quienes han comprobado debidamente que aquélla es aún más relevante cuando la bacteria se encuentra en nichos externos al cuerpo humano, como los existentes en los ríos y los lagos; sin embargo, es claro que existen otras clases de movilidad bacteriana, incluyendo a la de las espiroquetas *Treponema pallidum*, *Borrelia recurrentis*, etc., que se desplazan atravesando piel y mucosas girando sobre su propio eje (como sacacorchos) y el simple

movimiento Browniano que permite a *Staphylococcus*, *Streptococcus* y otros géneros -supuestamente inmóviles- trasladarse dentro de los diversos tractos hasta lograr su contacto con los tejidos “blanco”. Asimismo, de acuerdo con lo que se ha mencionado con anterioridad, las bacterias intracelulares no flageladas, entre las que destaca *Shigella*, adquieren la propiedad de trasladarse tanto intracelularmente como de una a otra células, cuando quedan unidas al extremo de las fibras de actina situadas en la superficie de estas últimas (29, 72).

iii. Liberación de exoenzimas hidrolíticas

Las bacterias patógenas suelen liberar numerosas enzimas hidrolíticas las cuales degradan sustancias que, habiéndose elaborado por el hospedero para su propio beneficio, terminan siendo utilizadas por el agente invasor, para lograr su establecimiento, reproducción y/o diseminación; de hecho, no se clasifican como exotoxinas sólo por un mero formulismo, ya que indudablemente dañan células y/o tejidos eucariotes (19, 31, 88).

Entre las hidrolasas bacterianas que lesionan al hospedero destacan las hialuronidasas, elastasas y colagenasas, las cuales destruyen la matriz extracelular que une las células de una gran cantidad de tejidos; ambos tipos de enzimas, junto con las fibrinolisinias, se consideran “factores de diseminación”;

no obstante, también existen otras que ocasionan la muerte de los fagocitos, como las DNAsas, fosfatasas y la leucocidina, las que inactivan la acción de los antibióticos (β -lactamasas, acetil-transferasas y otras) y las IgA hidrolasas, que degradan a los anticuerpos de la clase IgAs (49, 55, 72, 88).

iv. Producción de IgA hidrolasas

Las especies bacterianas que pretenden colonizar las superficies mucosas enfrentan el riesgo de quedar inmobilizadas en la capa de mucina, cuyo poder atrapador reside en su consistencia pero, principalmente, en su contenido en IgAs; estas moléculas diméricas se encuentran fijadas a la mucina por su fracción Fc, por lo que sus Fab libres funcionan como elementos “pegajosos” a los que, previa reacción inmunoespecífica, se fijan los microorganismos vía sus determinantes antigénicos (49, 55, 72).

En este sentido, la estrategia bacteriana correspondiente consiste en producir IgA hidrolasa, que escinde a la inmunoglobulina -a nivel de la bisagra-, con lo cual la célula bacteriana implicada se puede separar de la mucina, junto con los fragmentos del anticuerpo que se han adsorbido a su superficie y dejando el Fc ligado al moco. *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae* figuran entre las especies que sintetizan IgA hidrolasa con mayor regularidad. Es preciso

mencionar que este tipo de enzimas sólo exhibe su capacidad hidrolítica sobre el isotipo IgA1, pero éste es el que predomina en casi todas las superficies mucosas (19, 20, 33, 49, 55, 72).

v. Procuración del hierro

Como es sabido, el hierro representa un elemento indispensable para el crecimiento bacteriano, pero sus concentraciones son particularmente bajas dentro del organismo humano, en donde prácticamente casi todo se encuentra ligado a transferrina, ferritina, lactoferrina y hemina (17, 19, 24).

De acuerdo con ello, la sobrevivencia bacteriana depende de la capacidad de cada especie para captar hierro libre o enlazado a otras moléculas; en este aspecto, se han detectado tres posibles mecanismos: uno implica la síntesis de sideróforos o “proteínas extracelulares de batalla” que, además de unirse al metal, cuentan con receptores propios en la célula del microorganismo; en el segundo, otros receptores superficiales de hierro fijan a este último, aunque se encuentre ligado a sideróforos sintetizados y liberados por otras especies microbianas, e inclusive, a transferrina o a lactoferrina; finalmente, el tercero parece involucrar la producción de exotoxinas que destruyen a las células del hospedero -incluidos los eritrocitos- para que éstas liberen sus reservas del metal: varios estudios efectuados *in vitro* han evidenciado que este tipo de

toxinas sólo se llega a sintetizar cuando el microorganismo desarrolla en medios carentes de hierro (17, 19, 24, 72).

Lógicamente, una vez que el metal se fija a la célula bacteriana, aquél debe ser desligado de la molécula a la que se había unido; sin embargo, los procedimientos relacionados a dicha elución aún son desconocidos (19).

Por otra parte, debe tomarse en cuenta que diversos trabajos tendientes a determinar la trascendencia de los sideróforos bacterianos, han mostrado que en especies mutantes carentes de los genes asociados a su elaboración, la virulencia no disminuye, o bien, esto último llega a ser imperceptible; esta clase de hallazgos sólo reafirma que las bacterias patógenas cuentan con varias estrategias para captar hierro y que, cuando alguna llega a ser anulada, las restantes cumplen su compartido objetivo (72).

vi. Evasión de la acción de fagocitos, anticuerpos y el complemento

- **La acción anticomplementaria y antifagocitaria de la cápsula bacteriana**

Las cápsulas corresponden a redes poco compactas de polímeros que recubren la superficie de diversas bacterias. En su gran mayoría, las más estudiadas están

constituidas por polisacáridos, aunque también las hay conformadas por péptidos, proteínas o glucoproteínas y, por lo general, su papel consiste en proteger al microorganismo de la respuesta inflamatoria del hospedero (19, 31, 41, 44, 88, 94).

En cuanto a las acciones anticomplementarias de las cápsulas, se ha detectado que (88, 94):

- Limitan la vía alterna, impidiendo la libre difusión de C3b y de las proteínas B, D y *properdina* -hacia la superficie bacteriana-, indispensables todas ellas para la formación y estabilización de la C3 convertasa (C3bBb). En otras palabras, aunque cierta cantidad de C3b y de las proteínas mencionadas puedan alcanzar la cubierta bacteriana, la escasa formación de la C3 convertasa limitará que la cascada activadora se manifieste plenamente; en este aspecto, es oportuno tomar en cuenta que, a menor integración de C3bBb, se producirá menor cantidad de C5b y, con ello, la síntesis del MAC sobre la superficie bacteriana resultará proporcionalmente menor. Evidentemente, el proceso mencionado protege en forma relativa al invasor, pero no llega a nulificar la formación del MAC, por lo que no es posible asegurar que las bacterias capsuladas son resistentes a la acción bactericida del suero.

- Algunas muestran una gran afinidad por la proteína H, por lo que ésta suele alcanzar niveles elevados en el material capsular; en este contexto, cabe recordar que cuando H reacciona con C3b, este péptido es secuencialmente degradado por la proteína sérica I; tal es el mecanismo anticomplementario (y antifagocitario) adicional de las cápsulas ricas en ácido siálico.

Por otra parte, como una de las respuestas efectivas del hospedero contra los microorganismos capsulados reside en la producción de anticuerpos opsonizantes, se han diseñado recientemente algunas vacunas exitosas constituidas por material capsular. No obstante, ciertos agentes causales evitan la defensa en su contra sintetizando cápsulas cuyos componentes polisacáridos son muy semejantes a los generados por su hospedero; a este respecto, *Streptococcus pyogenes* la produce de ácido hialurónico (un carbohidrato que funge como elemento de unión entre las células de diversos tejidos humanos) y *Neisseria meningitidis* la elabora de ácido siálico (un componente común de las glicoproteínas superficiales de las células eucariotes); obviamente, este tipo de cápsulas no son inmunogénicas, ya que se integran por sustancias reconocidas como propias por el organismo del hospedero (41, 94).

- **Otras estrategias para evitar al complemento y a los fagocitos**

Uno de los principales “blancos” del complemento en las bacterias Gram negativas es el lipopolisacárido (LPS), ya que éste actúa como receptor de C3b y de C5b; en este sentido, dos tipos de ajuste bacteriano en el LPS afectan la interacción entre éste y los componentes del complemento: en el primero, el ácido siálico del hospedero se fija al LPS (antígeno O) interfiriendo la síntesis de la C3 convertasa, tal como lo hacen las cápsulas bacterianas; en cuanto al segundo, ocurre un incremento en la longitud de las cadenas laterales del antígeno O, ocasionando que el MAC se forme lejos de la membrana externa bacteriana y no pueda ejercer su acción bactericida; en tal contexto, los microorganismos que no son destruidos por el MAC son clasificados como resistentes séricos y, entre ellos, destacan varios géneros Gram negativos que causan infecciones sistémicas (7, 19, 88).

Otras estrategias bacterianas antifagocitarias están encaminadas a impedir la migración de los fagocitos hacia el sitio en donde se encuentran las bacterias, o bien, a limitar su efectividad. En este aspecto, se ha detectado una enzima que degrada específicamente a C5a, un eficaz quimioatrayente de macrófagos, la cual predomina en cocos Gram positivos tales como *Streptococcus pyogenes*. Adicionalmente, algunos patógenos producen proteínas tóxicas, denominadas

genéricamente “agresinas”, que afectan la acción fagocitaria, ya sea: a) provocando la muerte de los fagocitos; b) impidiendo la fusión fagosoma-lisosoma; o c) neutralizando o reduciendo la intensidad del poder oxidativo del contenido lisosomal (88).

En resumen, ciertos agentes causales han desarrollado la capacidad para sobrevivir dentro de los polimorfonucleares, monocitos y macrófagos, por lo que representan un serio peligro para la salud humana; los recursos más efectivos del hospedero contra las bacterias que pueden sobrevivir dentro de los fagocitos comunes, son las células T citotóxicas y los macrófagos activados (2, 88).

- **Evasión de la acción de los anticuerpos**

De acuerdo con lo observado en algunas bacterias patógenas, éstas también son capaces de evadir la acción de los anticuerpos, a través de diversos mecanismos; entre los más conocidos, se cuentan: a) la modificación de la estructura de importantes proteínas superficiales, incluidas las de la membrana externa y las que constituyen sus *pili* (variación antigénica); b) la síntesis de sustancias de envoltura que semejan a otras localizadas en los tejidos del hospedero (como en el caso de las cápsulas conformadas por los ácidos siálico o hialurónico); y c) el

recubrimiento microbiano con proteínas producidas por el organismo que colonizan (10, 19, 20, 62, 75, 88).

En esta última categoría, los ejemplos más claros incluyen a la fibronectina pero, sobre todo, a los anticuerpos que son adsorbidos por su fracción Fc a la superficie bacteriana, sobre la cual existen receptores alternos para ellos, tales como la proteína A de *Staphylococcus aureus* y la G de *Streptococcus pyogenes*; evidentemente, dicha forma de unión entre el microorganismo y las inmunoglobulinas resulta inútil, tanto para la opsonización como para la activación del complemento pero, además, dependiendo de la concentración de las segundas, impide el reconocimiento de los antígenos superficiales del agente patógeno por parte de los linfocitos B, limitando el importante papel de estos como "células presentadoras de antígeno" (78, 88).

Adicionalmente, un fenómeno análogo podría señalarse a propósito de las moléculas microbianas que fungen como receptoras de la transferrina, ferritina y lactoferrina dado que, cuando éstas recubren la superficie de un invasor que requiere procurarse el aporte necesario de hierro, también lo protegen de los anticuerpos dirigidos contra sus determinantes antigénicas localizadas en la membrana externa (17, 88).

vii. Invasión y residencia intracelulares

Algunas bacterias han desarrollado mecanismos que les permiten ingresar a las células hospederas, incluidos los fagocitos profesionales (neutrófilos y macrófagos); para lograr lo anterior, se adhieren íntimamente a dichas células y provocan cambios significativos en su citoesqueleto, que derivan en el englobamiento del microorganismo, a través de un proceso similar al de la fagocitosis macrofágica, en el que tienen lugar la polimerización y despolimerización de la actina, para dar lugar a los pseudópodos “fagocitarios”. En este sentido, las proteínas bacterianas que estimulan el fenómeno suelen denominarse “invasinas” o “factores de invasión” (1, 19, 23, 34, 40, 60, 65, 87, 88).

Esta clase de ingreso o internalización en las células hospederas diferentes de los fagocitos profesionales puede o no involucrar la formación de estructuras análogas a los fagosomas; en el primer caso, la bacteria pasa directamente al citoplasma de la célula invadida y, en el segundo, requiere de la síntesis de alguna exoproteína que destruye la membrana que la envuelve o forma poros en ella (2, 28, 87).

En todo caso, un microorganismo capaz de sobrevivir y reproducirse en el interior de las células hospederas obtiene importantes beneficios, tales como el de contar con alta concentración de nutrimentos y el de estar protegido contra la acción de los anticuerpos, el complemento y diversos antibióticos. Cabe subrayar que, al liberarse de los fagosomas de los fagocitos profesionales, el agente invasor también evade los efectos antimicrobianos del contenido lisosomal, el cual se vierte sobre sobre dichos fagosomas después de que ocurre la fusión fagolisosomal (19, 21, 23, 34, 60, 87).

La actina presente en las células hospederas no sólo actúa a favor de las bacterias cuando éstas pretenden ingresar en las primeras; de hecho, un extremo de dicha proteína suele quedar ligado al agente invasor, propulsándolo dentro del citoplasma y hacia las células adyacentes del tejido implicado; ello, desde luego, incrementa la invasividad y diseminación de los géneros *Shigella*, *Listeria* y otros patógenos (19, 65, 87).

Desafortunadamente, el estudio de la fagocitosis forzada por bacterias es de alto grado de dificultad, ya que no puede llevarse a cabo en órganos o animales de experimentación: requiere realizarse en cultivos de células provenientes de mamíferos. No obstante, se han podido observar algunos fenómenos interesantes

posteriores a la invasión celular, entre los que destaca el papel de las “integrinas”; éstas corresponden a proteínas de superficie de las células hospederas que reconocen a las “invasinas” bacterianas y, previa reacción con ellas, estimulan el ingreso del agente invasor, su eventual liberación de los fagosomas, e inclusive, su eficaz desplazamiento entre las células del tejido afectado, incluídas las que se ubican más internamente -en la submucosa y la lámina propia- y las denominadas “células M” (19, 36, 77, 88).

Estas últimas actúan como fagocitos naturales que trasladan a las bacterias englobadas hacia el tejido linfoide, en donde los macrófagos las inactivan y presentan sus estructuras antigénicas a los linfocitos T, para dar origen a la respuesta inmune. Sin embargo, cuando se trata de agentes invasores capaces de sobrevivir dentro de los macrófagos, dicho sistema sólo puede fungir como medio para su diseminación linfático-hematógena (4, 19, 22, 76, 88).

Paradigmas de invasión intracelular

Entre los modelos de invasión intracelular estudiados a mayor profundidad destacan los relacionados con *Y. pseudotuberculosis* y *Y. enterocolitica*. En ambos casos, las invasinas implicadas se unen estrechamente a una familia de

integrinas (conocidas como $\beta 1$): éstas corresponden a moléculas enlazadas a proteínas de la matriz extracelular tales como la fibronectina, que se localizan en la superficie lateral de las células epiteliales. Una vez concretada su reacción con las integrinas, las invasinas median el englobamiento bacteriano de manera similar a como se cierra un "zipper": de hecho, las invasinas de *Yersinia* reproducidas genéticamente en cepas de *E. coli* no invasivas, promueven el englobamiento de estas últimas, provocando rearrreglos sencillos y temporales en el citoesqueleto hospedero (19, 31, 34, 36, 40).

Ail y YadA son dos invasinas detectadas en las especies enteropatógenas de *Yersinia*; la primera se relaciona principalmente con la adherencia a las células epiteliales y confiere al microorganismo resistencia a la acción bactericida del suero, aunque también pertenece a una familia de proteínas de membrana externa (junto con la PagC de *S. typhimurium*, la OmpX de *Enterobacter cloacae* y algunas otras) que regulan diferentes funciones de virulencia (8, 19).

Por su parte, YadA está codificada por un plásmido de virulencia y por si sola actúa como un poderoso promotor de la adhesión y la entrada bacteriana al interior de la célula; sin embargo -extrañamente-, las cepas que expresan ambas invasinas y también cuentan con un complemento completo de plásmidos de

virulencia, paralizan los mecanismos fagocitarios normales, permaneciendo en forma extracelular aunque firmemente adheridas a la superficie de la célula hospedera. Es decir, la proteína Yad A puede transformar su papel de invasina al de una simple adhesina y, al parecer, muestra mayor avidez por los macrófagos que por las células epiteliales (19).

De cualquier manera, la unión de las invasinas a las integrinas $\beta 1$ representa un paso clave en el proceso que distingue a *Yersinia* y depende de la secreción de otros factores de virulencia plasmídicos y de la subsecuente translocación de varias proteínas bacterianas al interior del citoplasma de la célula eucariote, con la manifiesta complicidad de estas últimas (19, 36, 40).

Contrastando con lo antes mencionado, la invasión asociada a *S. typhimurium* sí genera una severa deformación en la superficie de las células epiteliales, poco después de la reacción entre invasinas e integrinas. La superficie de la célula eucariote se proyecta hacia fuera (a partir del punto de adherencia bacteriana) con plegamientos de la membrana que facilitan la macropinocitosis; a continuación, se rearreglan los filamentos de actina y otras proteínas de las células “blanco”, fenómenos inducidos por diversas señales que incluyen la presencia de calcio y el flujo de fosfato de inositol. La invasión por *Salmonella*

es rápida y la bacteria aparece dentro de una vacuola unida a la membrana durante los minutos siguientes; no obstante, la definición de la secuencia de eventos que acompañan al proceso ha resultado complicada, ya que no se ha logrado aclarar cuáles de las modificaciones detectadas en las células infectadas son primarias o secundarias. *S. typhimurium* provoca un flujo de Ca^{++} en los cultivos de células epiteliales, lo cual no ocurre cuando se trata de cepas con mutaciones artificiales en los genes de invasión; además, los quelantes intracelulares de Ca^{++} (pero no los extracelulares) bloquean la entrada del microorganismo a las células epiteliales (19, 21, 23, 34, 40, 76).

Finalmente, la penetración de *Shigella* a las células epiteliales se parece a la observada en *Salmonella*: sucede la polimerización de actina y miosina, que origina el plegamiento de la membrana celular en la vecindad del lugar de invasión bacteriana y los filamentos de actina producen la formación de pseudópodos y el englobamiento de los microorganismos, los cuales terminan internalizados dentro de una vacuola. *S. flexneri* también fosforila a la tirosina constituyente de una proteína del citoesqueleto de la célula del hospedero: la cortactina, a través de una cinasa y, a diferencia de lo que se observa con *Salmonella*, requiere de la participación de una GTPasa para concretar la polimerización de la actina de las células HeLa (21, 34, 65, 76).

Sin embargo, los componentes bacterianos necesarios en la invasión por *Shigella* incluyen un sistema complejo involucrado en el transporte y liberación de tres proteínas esenciales: IpaB, IpaC e IpaD, consideradas efectoras, que resultan similares e intercambiables respecto a las Sip/Sic/Ssp de *Salmonella*, lo cual indica que todas ellas participan en el proceso. Sin embargo, la IpaB de *Shigella* estimula el escape microbiano de la vacuola endocítica, mientras que su homóloga en *Salmonella* no presenta esta propiedad, ya que ésta permanece dentro del compartimiento durante toda su vida intracelular (1, 2, 19, 34, 76).

En resumen, ambos géneros comparten algunas características relacionadas con la invasión, pero también evidencian diferencias que podrían explicar sus distintos papeles como agentes etiológicos de sus respectivas enfermedades (19).

IV. TOXIGENICIDAD BACTERIANA

Si bien la toxigenicidad es una característica de diversas bacterias que provocan enfermedad, lo cierto es que se han detectado diferentes clases de toxinas, de acuerdo con sus distintos mecanismos de acción. Sin embargo, desde un punto de vista aún más general, la división básica de este tipo de sustancias tóxicas sólo comprende dos categorías: las exotoxinas y las endotoxinas; la tabla 1 señala las principales diferencias entre ambas (19, 88).

Tabla 1. Características generales de exotoxinas y endotoxinas (88).

Exotoxinas	Endotoxinas
Son excretadas por células viables completas.	Forman parte de la pared celular bacteriana.
Generalmente son producidas por bacterias Gram positivas.	Sólo se detectan en bacterias Gram negativas.
Su naturaleza química es proteica.	Son lipopolisacáridos (LPS).
Su peso molecular es mayor.	Su peso molecular es menor.
En su mayoría son termolábiles.	Son termoestables.
Son inmunógenas.	Sólo actúan como inmunógenos si se unen a proteínas acarreadoras.
Son convertibles a toxoides.	Activan el complemento por la vía alterna.
No son pirogénicas.	Son pirógenas y eméticas.
Cada una actúa sobre ciertas células "blanco"	Presentan acción sobre numerosas células y tejidos.
En general, son más virulentas.	La virulencia varía entre una y otra.

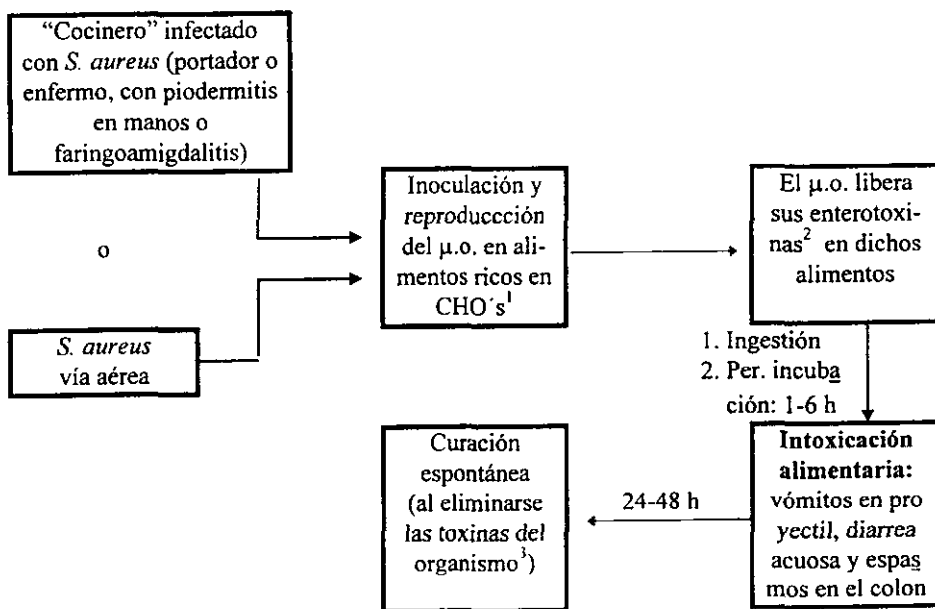
i. Exotoxinas

Por lo regular, las bacterias toxigénicas productoras de exotoxinas pueden ocasionar los padecimientos asociados a ellas, mediante toxi-infecciones o intoxicaciones. En el primer caso, el agente microbiano se establece en su tejido “blanco” (sobre o dentro del hospedero) y, al reproducirse, libera la toxina que actuará sobre las células cercanas, o bien, que deberá recorrer parte del organismo hasta localizar al tejido cuyos componentes presentan sus receptores. En cuanto a las intoxicaciones, las más frecuentes son las de índole alimentario y, en ellas, la bacteria suele no colonizar algún tejido del hospedero, sino excretar las toxinas en los alimentos, de manera que el período de incubación de la enfermedad es relativamente corto (19).

Entre las toxinas relacionadas con toxi-infecciones se cuentan la dermonecrotina y TSST-1 de *Staphylococcus aureus*, la Spe A, B y C de *Streptococcus pyogenes*, la del ántrax, la α de *Clostridium perfringens*, la citotoxina y enterotoxina de *Clostridium difficile*, la tetanospasmina, la diftérica, la TL y TE de ECET, la Shiga de *Shigella sp*, la Vero y Shiga-like de ECEH, la A de *Pseudomonas aeruginosa*, el colerágeno, la TDH de *Vibrio parahaemolyticus*, etc (19, 31, 66).

Por su parte, las principales exotoxinas asociadas a intoxicaciones alimentarias son la elaborada por *Bacillus cereus* en fórmulas lácteas, las botulínicas A, B, C α , C β , D, E, F y G y las enterotoxinas A, B, C₁, C₂, C₃, D y E de *Staphylococcus aureus*. El diagrama 3 muestra los eventos más relevantes de la intoxicación alimentaria provocada por estas últimas (19, 88).

Diagrama 3. Principales aspectos asociados a la intoxicación alimentaria estafilocócica (19, 88).



CLAVE: $\mu.o.$ = microorganismo; ¹ = CHO's: carbohidratos (pastas, pasteles, ensaladas, sandwiches, etc.); ² = las enterotoxinas A y D son las más frecuentes y agresivas; ³ = a través del vómito y la diarrea.

Estructura y función

De acuerdo con su estructura y su mecanismo de acción, las exotoxinas se pueden dividir en tres clases: a) las toxinas A-B, integradas por dos fragmentos, de los cuales el "B" es el que se fija a algún receptor de las células "blanco", en tanto que el "A" es el que se interna en éstas y ejerce su actividad tóxica; b) toxinas que no presentan dos fragmentos separables y actúan desorganizando la membrana de la células del hospedero; c) toxinas que se desempeñan como "superantígenos", carentes de los fragmentos a que se hace referencia en el inciso "a" y sobre-estimulan a las células T provocando que éstas liberen niveles perjudiciales de citocinas (3, 19, 32, 66).

- **Toxinas A-B**

Hasta el momento se han detectado dos géneros de toxinas A-B: las que se sintetizan como un solo polipéptido, presentan una envoltura y una porción enzimática, las cuales se separan durante su procesamiento a través de reacciones proteolíticas, si bien permanecen en cierto contacto merced a algún puente disulfuro que se escinde cuando la fracción A penetra al citoplasma de la célula hospedera; por su parte, el género más complejo presenta un fragmento B

conformado por múltiples subunidades aunque, tal como el antes descrito, se encuentra unido al A por un puente disulfuro, que se desprende del primero al ingresar al citoplasma de la célula "blanco". Es decir, tanto el género simple como el compuesto se unen vía su fragmento B a algún receptor superficial de las células del hospedero cuya naturaleza química es glicoproteica, glicolipídica o, menos frecuentemente, proteica (3, 19, 59, 88).

Dependiendo de lo anterior, la toxina en cuestión sólo es capaz de fijarse a un determinado tipo de células del hospedero, sobre el cual ejerce su acción tóxica; de hecho, aunque el fragmento A posee la capacidad de afectar a gran parte de los tejidos, en realidad únicamente lo hace en los que presentan receptores para la porción B (3, 19, 59, 88).

Una vez que el fragmento B se une a su receptor, la porción A ingresa al citoplasma de la célula hospedera. En este sentido, una de las teorías más aceptadas sugiere que la toxina se interna mediante endocitosis y que, dentro de la vacuola endocítica, la acidez origina la separación de ambos fragmentos y, por ende, el desplazamiento de la porción A. Sin embargo, otro modelo propone que, independientemente de que el fragmento B se fija a su receptor, también

provoca la formación de poros en la membrana de la célula “blanco”, a través de los cuales puede ingresar la porción A (3, 59, 88).

El fragmento A de numerosas toxinas A-B cataliza un mismo tipo de reacción: Separa del NAD^+ al grupo ADP-ribosil y lo une covalentemente a alguna proteína “clave” de la célula hospedera; en tal contexto, la ADP ribosilación de las proteínas ocasiona serios trastornos celulares de acuerdo con la función de éstas; por ejemplo, el fragmento A de la toxina diftérica ADP ribosila al factor de elongación EF2, interfiriendo la síntesis proteica de las células “blanco” (1, 19, 47, 66).

Por su parte, la porción A de la toxina colérica ADP ribosila a una proteína reguladora que controla los niveles de AMPc de las células duodenales, ocasionando una gran variedad de efectos metabólicos, entre los cuales destaca un serio descontrol del flujo iónico y, por ende, la pérdida de agua que se traduce en severas diarreas. En concreto, la Gs es la proteína G (o GTPasa) que regula la actividad de la adenilato-ciclasa en las células hospederas, actuando como si se tratara de un proceso dependiente de hormonas y que, por lo tanto, determina el nivel de AMPc en dichas células. De hecho, la forma activa de Gs

(unida a GTP) incrementa la actividad de la adenilato-ciclasa, mientras que la forma inactiva (unida a GDP) rinde adenilato ciclasa-inactiva (1, 66, 88).

La función de la Gs como “prendedor-apagador” en las células intestinales resulta muy interesante: como respuesta a su estimulación por parte de algunas hormonas y unida a GTP o GDP, activa o desactiva a la adenilato ciclasa, respectivamente, cuando se requiere o no, incrementar los niveles de AMPc (adenosinmonofosfato cíclico); esta última molécula desempeña fundamentales funciones regulatorias en las células eucariotes, pero su acumulación intracelular -en concentraciones relativamente elevadas- resulta muy perjudicial para el metabolismo tisular (1, 19, 47).

Dicha acumulación ocurre cuando el fragmento A1 ADP-ribosila a la proteína reguladora Gs, ya que de esta manera se provoca la activación permanente de la adenilato ciclasa de la célula hospedera (consultar los diagramas 4 y 5) (1, 66).

La reacción global catalizada por la subA₁ de la toxina colérica es la siguiente:

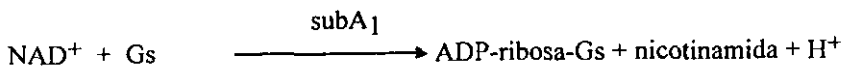
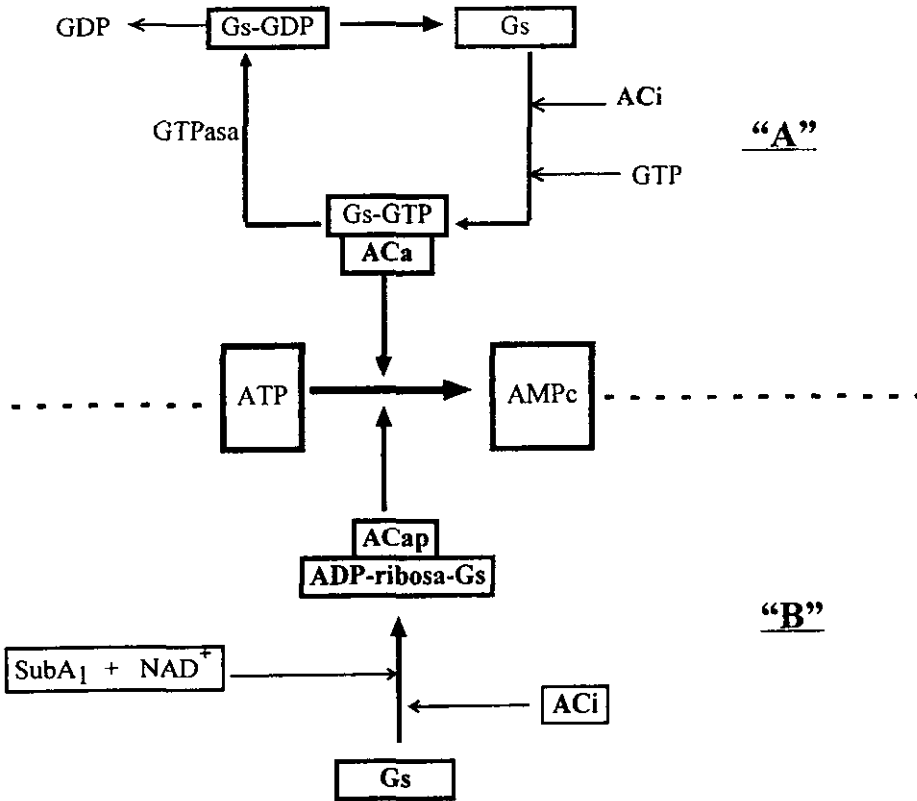
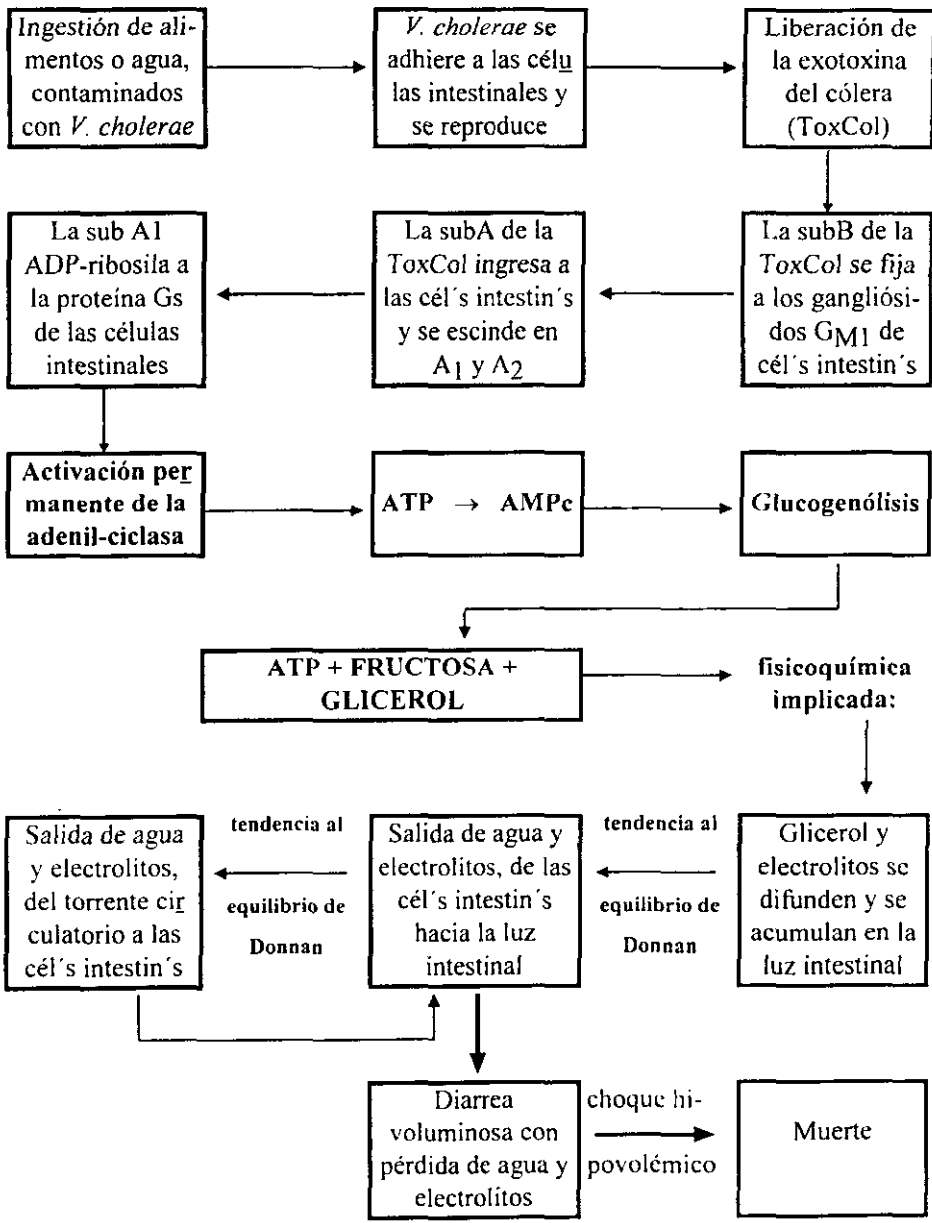


Diagrama 4. Producción de AMPc en las células intestinales: “A” en condiciones de salud; “B” bajo la influencia de la subA₁ de la toxina colérica (1, 47).



CLAVES: GDP = guanosindifosfato; GTP = guanosintrifosfato; ACi = adenilato ciclasa inactiva; ACa = adenilato ciclasa activa; ATP = adenosintrifosfato; AMPc = adenosinmonofosfato cíclico; ACap = Adenilato ciclasa activada permanentemente; NAD⁺ = nicotinamida-adenosin-dinucleótido.

Diagrama 5. Principales eventos implicados en la infección por cólera (1).



CLAVE: cél's intestinales = células intestinales.

Cabe señalar que no todos los fragmentos A de las toxinas A-B catalizan la ADP ribosilación de las células “blanco”; por ejemplo, el de la toxina de Shiga escinde la molécula de RNAr de las células hospederas, con lo cual los ribosomas implicados no pueden llevar a cabo la traducción (1, 19).

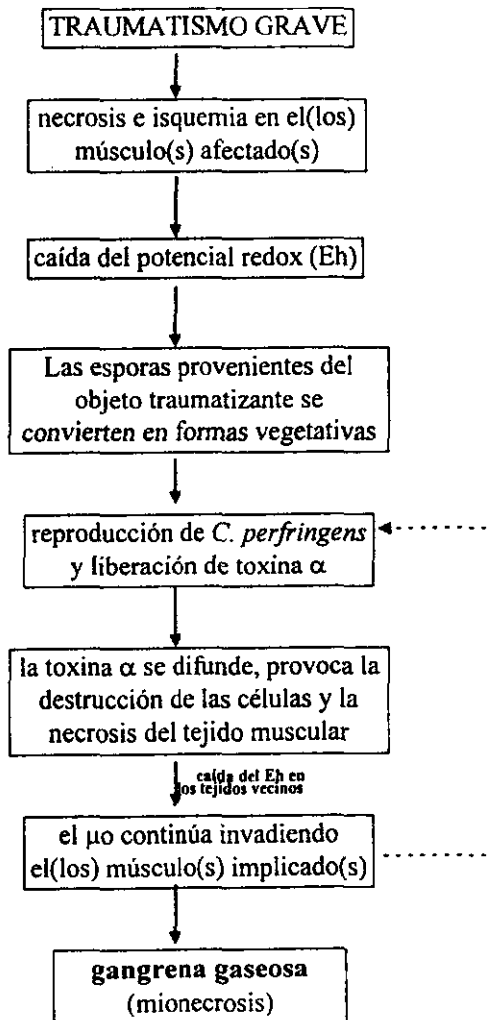
- **Toxinas que interrumpen la continuidad de las membranas**

Esta clase de toxinas habilita como su receptor al colesterol, provoca la lisis celular interrumpiendo la integridad de la membrana plasmática y, tal como se mencionó para las toxinas A-B, se dividen en dos géneros: el primero de ellos abarca a las proteínas que se insertan en la membrana celular y originan la formación de canales o poros que permiten la salida del contenido citoplásmico y la entrada de agua; en otras palabras, como la presión osmótica intracelular es mucho mayor que la del entorno, suele ingresar a la célula “blanco” una gran cantidad de agua, ocasionando el hinchamiento y el estallamiento celular (2, 3, 19, 23, 59, 66, 84, 88).

El segundo género de toxinas que lisan células del hospedero afectando a la membrana plasmática, actúa como fosfolipasa: eliminan a los grupos cargados de los fosfolípidos que estabilizan la estructura bicapa. En este rubro se incluye a las hemolisinas aunque, debido a que no sólo ejercen su acción lítica sobre los

eritrocitos, resulta más conveniente referirse a ellas como citotoxinas. A esta categoría pertenecen las dos hemolisinas de *Pseudomonas aeruginosa* y la toxina α de *Clostridium perfringens*; el diagrama 6 muestra los principales eventos asociados al origen de la gangrena gaseosa ocasionada por esta última especie (1, 3, 59, 66, 81, 84, 88).

Diagrama 6. Eventos implicados en el origen de la gangrena gaseosa debida a *Clostridium perfringens* (1, 66, 81).

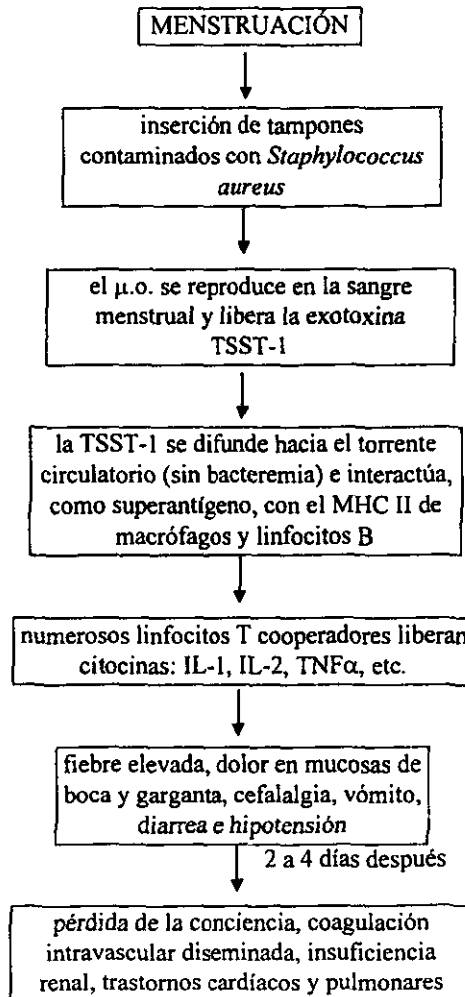


- **Toxinas que actúan como superantígenos**

Esta clase de exotoxinas es menos frecuente que las dos anteriores y ejerce su perjuicio formando un puente de unión entre el MHC de clase II (de las células presentadoras de antígeno) y los receptores especializados de las células T que interactúan con dicha molécula. Es decir que, cuando existe una alta concentración de estas toxinas en el organismo del hospedero, se unen indiscriminadamente al MHC de clase II presente en numerosos macrófagos y linfocitos B -sin haber sido procesadas en el interior de dichas células- y, secuencialmente, a gran cantidad de células T cooperadoras. La reacción generada entre las células presentadoras de antígeno y los linfocitos T es similar a la que ocurre normalmente cuando se trata de presentar antígenos comunes, aunque se da de forma indiscriminada y en mucha mayor cantidad; de hecho, se produce un número excesivamente más elevado de parejas linfocito T-macrófago y linfocito T-linfocito B, por lo cual se estimula a 1 de cada 5 células T, en vez de a 1 de cada 10,000 y, consecuentemente, la concentración que se libera de IL-2 es muy lesiva, presentándose fiebre elevada, náuseas, vómito y malestar general, independientemente de que liberan otras citocinas asociadas al estado de shock (31, 32, 45, 54, 58, 82, 86, 88).

Cabe mencionar que este tipo de toxinas es responsable de las manifestaciones graves en padecimientos tales como el síndrome del shock tóxico, ocasionado por la TSST-1 (toxina del síndrome del shock tóxico-1) de *Staphylococcus aureus* y por la Spe (exotoxina pirogénica estreptocócica) A, B y C de *Streptococcus pyogenes* (18, 19, 31, 45, 54, 58, 88).

Diagrama 7. El síndrome del shock tóxico por *Staphylococcus aureus* (18, 19, 54, 58).



ii. Endotoxinas

Las endotoxinas corresponden a complejos macromoleculares que componen la pared celular de las bacterias Gram negativas; tales complejos están integrados por lipopolisacáridos (LPS), proteínas y fosfolípidos, aunque su actividad endotóxica reside directamente en los primeros, considerados moléculas anfifílicas de alrededor de 10 kDa constituidas por tres regiones (31, 39, 69, 70, 88, 89, 96):

- El lípido A
- El núcleo polisacárido
- El polisacárido O, también denominado antígeno somático O

Lípido A

Éste conforma la región lipídica del LPS, se encuentra embebido en la membrana externa y contiene disacáridos fosforilados de β 1-6 D-glucosamina, unidos a ácidos grasos tales como el láurico, palmítico, mirístico y β -hidroxi-mirístico (31, 39, 69, 70, 88, 89).

El lípido A corresponde prácticamente a la región tóxica de la molécula, ya que estimula la liberación de proteínas bioactivas del hospedero, entre las que destacan las citocinas (69, 88, 89, 96).

Núcleo polisacárido

Corresponde a un núcleo interno ligado al lípido A y, a otro, externo, unido al polisacárido O: su estructura básica está conformada por hexosas sustituidas lateralmente con otros azúcares, etanolamina y fosfatos, así como por el ácido 2-ceto-3-desoxi-D-mano-octanoico (KDO); esta región, junto con el polisacárido O, constituye la porción hidrofílica del LPS (31, 39, 70, 88, 89, 96).

Polisacárido O

Se encuentra ligado al núcleo polisacárido y consta de unidades repetidas de azúcares (3'-5'), siendo las más frecuentes las de manosa, fucosa, ramnosa y galactosamina; además, constituye la región de mayor antigenicidad y variabilidad del LPS y llega a representar una adhesina útil para la bacteria (39, 41, 70, 88, 89, 96).

De hecho, la proteína CD14, presente en la membrana plasmática de la línea monocito-macrófago, funge como “receptora” del LPS y de la proteína conocida como “proteína unida al LPS” (LBP); los complejos CD14-LPS-LBP actúan como mediadores del reconocimiento celular y de diversas respuestas celulares contra el lípido A. En este sentido, la interacción del LPS con su receptor CD14 da lugar a tres importantes eventos lesivos asociados a las endotoxinas (31, 39, 56, 69, 70, 88, 89, 96):

- La producción de citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α y el factor activador de plaquetas) por parte de los monocitos, macrófagos y algunas otras células; dichas citocinas estimulan la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos. La IL-1 provoca la temperatura por sí misma o estimula la liberación de prostaglandinas y, por su parte, la IL-6, la IL-8, el TNF- α y el factor activador de plaquetas, dañan las células endoteliales y trastornan su función normal.
- La activación del complemento, en donde los componentes C3a y C5a actúan sobre el tejido endotelial; particularmente, C5a estimula la migración de polimorfonucleares a los vasos sanguíneos y dañan seriamente las paredes del endotelio, a través de enzimas lisosomales.

- La activación de la cascada de la coagulación, a partir de la cual se forman numerosos coágulos que obstruyen la circulación; el fenómeno se conoce como coagulación intravascular diseminada (CID).

En resumen, la combinación de los tres eventos anteriores conduce al shock séptico, también denominado colapso del sistema circulatorio, después de que se presentan algunos signos previos tales como fiebre, vómito, sofocación, hipotensión y aumento de la permeabilidad vascular y del ritmo cardíaco (56, 70, 88, 89, 96).

V. REGULACIÓN DE LOS GENES DE VIRULENCIA EN LAS BACTERIAS

i. Retos de adaptación a superar por las bacterias patógenas

El organismo humano presenta una gran variedad de nichos ecológicos para las bacterias que ingresan en él, todos los cuales representan oportunidades de colonización, en la medida de que el invasor se pueda adaptar lo suficientemente rápido para aprovechar las ventajas de su nuevo entorno (19, 52, 79).

Con el objeto de valorar los desafíos que enfrenta una bacteria al retar al organismo humano, a continuación se realiza un breve análisis de lo que ocurre con un patógeno aerobio o facultativo que ha sido ingerido al beberse agua contaminada por parte del hospedero (19).

Lógicamente, en el agua, la bacteria en cuestión se encontraba adaptada a un ambiente cuya temperatura era menor de 37°C, las concentraciones de nutrimentos y la fuerza osmótica eran menores, el pH se encontraba cercano a la neutralidad y la presión de oxígeno disponible era suficiente para llevar a cabo su metabolismo respiratorio. Contrastando con lo anterior, al ser ingerida, la

bacteria encuentra abruptamente una temperatura y fuerza osmótica más altas, se expone transitoriamente al pH ácido imperante en el estómago, pero dicha variable se incrementa en el intestino delgado, en donde también existen elevadas concentraciones de sales biliares -que pueden ocasionar rupturas en su membrana externa- y, finalmente, alcanza el intestino grueso, enfrentando un ambiente tendiente a la anaerobiosis; por obvio, dentro de su hospedero, el patógeno encontrará mayores niveles de fuentes energéticas, pero es muy probable que los sustratos difieran de los que prevalecían en el agua. Adicionalmente, las formas “disponibles” de hierro también serán distintas, localizándoseles en el organismo ligadas a moléculas tales como la lactoferrina, ferritina, transferrina y los grupos heme; por último, el agente invasor deberá presentar adhesinas que cuenten con receptores en el tejido intestinal, adicionales -generalmente más pequeñas- a las que le permitían fijarse a las rocas, plantas acuáticas y otras superficies, y competirá con la flora habitual de la región por los receptores, los nutrimentos y el oxígeno (17, 79).

Suponiendo que la bacteria haya cubierto los requerimientos necesarios para continuar viable y colonizar el intestino delgado -lo que resultaría casi toda una hazaña, tomando en cuenta todos los obstáculos que ha debido superar- y proceda a invadir la mucosa hasta alcanzar los tejidos internos y la sangre, una

vez más enfrentará cambios drásticos de ambiente: si bien la temperatura permanecerá igual, ahora se expondrá a la acción de los macrófagos y del complemento; a este respecto, los factores de virulencia tales como las adhesinas e invasinas, que antes permitieron y promovieron la colonización e invasión de las células mucosas, en las nuevas condiciones le serán muy poco útiles, e inclusive, es posible que detenga su producción, sobre todo si estimulan la fagocitosis por macrófagos o neutrófilos; por el contrario, los patógenos que superen la posibilidad de ser eliminados sobreviviendo dentro de los fagocitos, tendrán que adaptarse a las condiciones que prevalecen dentro del fagolisosoma. Ante tales situaciones, no resulta descabellado considerar que las bacterias patógenas han desarrollado una especial capacidad para regular la expresión de sus genes, de acuerdo con los retos que se les van presentando; en otras palabras, entre las características de las bacterias virulentas debe incluirse su capacidad para sintetizar ciertos factores de patogenicidad mientras estos le sean necesarios y para detener su elaboración cuando no se requieran o les resulten perjudiciales (8, 14, 16, 52, 68, 79).

ii. Importancia de la regulación de los genes de virulencia

Sin lugar a dudas, la comprensión de los procesos involucrados en la regulación de los genes de virulencia es fundamental para conocer con cierto detalle cómo

ocurren, evolucionan y podrían prevenirse las enfermedades infecciosas. Evidentemente, una gran variedad de señales suele controlar la expresión de dichos genes; por ejemplo, el hecho de que un determinado patógeno regula sus genes de virulencia en respuesta a diferentes niveles de hierro o calcio indica que alguno de ellos o ambos le(s) es(son) importante(s) en la región en donde se encuentra reproduciéndose, ya sea como “nutrimento” y/o como señal que lo prepara para sobrevivir. Así, la misma bacteria se puede emplear como indicador de los factores ambientales que está experimentando (8, 14, 16, 24, 25, 26, 52).

Otro objetivo del estudio de la regulación radica en el conocimiento de nuevos genes de virulencia: si bien algunos genes de virulencia que codifican para la síntesis de adhesinas, invasinas o toxinas se expresan más notablemente a 37°C que a 25°C, también es probable que el microorganismo en cuestión sobre-exprese otros genes de virulencia al incrementarse aún más la temperatura; por ello, la variación de las condiciones fisicoquímicas durante el crecimiento *microbiano* puede conducir al descubrimiento de otros factores de virulencia (8, 16, 24, 25, 52, 79).

iii. Tipos de regulación génica

Al demostrarse que la concentración de un determinado factor de patogenicidad depende de las condiciones ambientales implicadas, se pudo definir que la producción de dicho factor se controlaba de diversas maneras. En este sentido, actualmente se acepta que los mecanismos regulatorios tienen lugar a tres niveles generales: por la amplificación y el rearreglo de los genes involucrados, a nivel transcripcional (cuando ciertas proteínas se unen al DNA y, por tal motivo, afectan el número de moléculas transcritas a partir del gen) y, finalmente, durante el período post-transcripcional (cuando se afecta la cantidad de producto a partir de cada molécula transcrita) (19).

Evidentemente, los diversos niveles de regulación de un mismo factor de virulencia permiten ejercer mayor control sobre la cantidad de aquél que la bacteria requiere y, además, habilitan al patógeno para responder a señales combinadas (10).

- **Amplificación y rearrreglos génicos**

Amplificación de genes. Corresponde al proceso mediante el cual un gen es reemplazado por copias múltiples de él mismo, fenómeno que suele ocurrir a través de varios mecanismos; los dos principales son los siguientes (19):

a) La recombinación entre dos copias de un cromosoma en replicación, que origina que una de las hebras hijas incorpore dos copias del gen único (localizado en la hebra madre), ubicando a ambas una a continuación de la otra; en este caso, la segunda hebra hija carecería del gen en cuestión, por lo que se habrían producido dos variantes de la misma bacteria y alguna de ellas predominaría, de acuerdo con las condiciones ambientales correspondientes; obviamente, la repetición de este proceso durante la reproducción de la primera variante generaría clonas con copias múltiples del gen amplificado.

b) El segundo mecanismo es más frecuente e involucra la participación de transposones; algunos de estos se replican como parte de su propio proceso de transposición, por lo que los genes de virulencia localizados en este tipo de elementos móviles se multiplicarían eficazmente. Sin embargo, las repeticiones en cascada, ya sea de un gen o de un conjunto de ellos, pueden

resultar inestables bajo determinadas condiciones ambientales, ya que eventualmente llegan a aparecer algunos supresores que eliminan las copias adicionales ubicadas en el DNA bacteriano.

Por lo general, las observaciones de amplificación génica en bacterias aisladas a partir de casos clínicos, con frecuencia demuestran la selección de variantes bacterianas que presentan copias múltiples de los genes que codifican para la síntesis de ciertos factores de patogenicidad (25, 19).

Rearreglos, sustitución y mutación de genes. Esta clase de modificaciones estructurales altera la secuencia de los genes y la expresión de estos últimos. Un ejemplo de rearreglo es el que se ha detectado consistentemente en el promotor invertible del gen que codifica para flagelina en *Salmonella typhimurium*; dicho promotor se localiza en un segmento de DNA que se invierte periódicamente y sólo estimula la transcripción al encontrarse en una de sus dos orientaciones. Esta clase de fenómeno-interruptor se conoce como variación de fase y no sólo tiene lugar cuando se invierte algún segmento del DNA; de hecho, *Neisseria gonorrhoeae* emplea otro mecanismo: el segmento que codifica para una proteína de superficie presenta, en su región amino terminal, una serie de secuencias repetidas cortas cuyo número determina si se sintetiza proteína activa

o inactiva: lógicamente, sólo una parte de la progenie sintetizará proteína activa (10).

Otro tipo de rearrreglo provoca que las bacterias modifiquen la secuencia de un determinado gen y, con ello, que el producto implicado no sea reconocido por los anticuerpos dirigidos contra el original; esta clase de proceso se conoce como variación antigénica y permite al microorganismo evadir la respuesta inmunológica de su hospedero. Un ejemplo clásico de este fenómeno es el correspondiente a la pilina de *N. gonorrhoeae*: distintas versiones del gen implicado se encuentran distribuidas a lo largo del cromosoma, aunque sólo algunas contienen al promotor y se expresan en cualquier momento; la recombinación homóloga entre una versión silenciosa ubicada en otra parte del propio DNA y la que se ha expresado anteriormente, redituará la formación de una versión diferente del gen activo, la cual cambiará la estructura primaria de la pilina (10, 62, 75, 88).

Evidentemente, lo antes mencionado también puede tener su origen en mutaciones espontáneas; sin embargo, la cantidad de éstas en un gen específico llega a ser muy pequeña como para permitir que la bacteria responda

oportunamente a las condiciones adversas y para que se generen productos funcionales diferentes al original (10).

- **Regulación transcripcional**

Organización del gen. Los genes de virulencia se pueden encontrar localizados de tres maneras: en un primer modelo, forman parte del mismo operón y su transcripción es controlada por un cierto promotor. En el segundo modelo, se ubican en distintas regiones pero todos dependen de promotores que responden a las mismas proteínas reguladoras, por lo que se dice que tales genes se encuentran organizados en un “regulón” (que puede incluir operones, aunque también genes simples). Finalmente, el tercer modelo se refiere a un número de genes que responde a las mismas señales regulatorias (temperatura, pH, concentración de Fe^{++} , Fe^{+++} , Ca^{++} o Mg^{++} , etc.), si bien algunos son transcritos en mayor grado que otros: al conjunto de genes que responde a la misma señal, aunque en distinto grado, se le conoce como “estimulón” (8, 11, 19, 34).

La ventaja de las estrategias fundamentadas en estimulones y regulones reside en que la bacteria puede reclutar nuevos genes más fácilmente que en un operón; un gen ubicado en cualquier región del mismo cromosoma o, inclusive,

en algún elemento extracromosomal, puede llegar a formar parte de un “regulón” o de un “estimulón”, mientras estos presenten el tipo adecuado de región promotora. En contraste, para incorporarse a un operón, el nuevo gen tendría que ser integrado en la orientación adecuada a la unidad transcripcional (11).

Activación transcripcional. Para que un gen sea transcrito, la RNA polimerasa se debe unir al promotor y producir la forma -del complejo abierto del DNA- que permita proceder a la síntesis del mRNA. Las proteínas que facilitan la unión de la RNA polimerasa al promotor y/o que ayudan a la formación del complejo abierto, incrementan el número de copias de un gen y se denominan activadores transcripcionales (19).

Estos últimos estimulan la transcripción de diferentes maneras: algunos se enlazan al DNA adyacente a la RNA polimerasa y establecen contacto con ésta formando un complejo compacto que incrementa la fuerza de la unión de la enzima al promotor. No obstante, otros se unen al promotor y sólo logran hacer contacto con la enzima al doblarse el ácido nucleico. En conclusión, todos los activadores se unen a la región operadora del gen, interactúan con la RNA polimerasa y promueven la transcripción.

La RNA polimerasa se constituye por múltiples subunidades, una de las cuales, conocida como factor sigma (σ), permite el reconocimiento de los promotores. Las bacterias emplean diferentes factores σ para estimular la expresión de diferentes conjuntos de genes, dependiendo de las diversas condiciones ambientales presentes; por ejemplo, el utilizado por *Escherichia coli* para estimular la expresión de la mayoría de sus genes es el σ^{70} (19).

Los activadores transcripcionales que interactúan con las RNA polimerasas poseedoras de σ^{70} generalmente se unen al DNA muy cerca del sitio en donde también lo ha hecho la enzima, a fin de establecer contacto con la subunidad α de esta última y aportar una mayor estabilidad al enlace RNA polimerasa-promotor. Cabe señalar que la mayoría de los genes de virulencia parece transcribirse a través de RNA polimerasas σ^{70} , aunque recientemente se han empezado a observar excepciones a esta regla; en este contexto, se ha comprobado que la transcripción de un gen que codifica para la síntesis de pilina en *Pseudomonas aeruginosa* es mediada por una RNA polimerasa σ^{54} ; este factor σ se asoció inicialmente a la transcripción de los genes involucrados en la regulación del nitrógeno pero, en la actualidad, se ha comprobado que desempeña actividades más numerosas. Los activadores de la RNA polimerasa

σ^{54} generalmente se unen a sitios más separados del promotor génico, por lo que se requiere el doblar del DNA para que ocurra el contacto activador-RNA polimerasa; en este caso, el activador podría no incrementar la estabilidad de la unión enzima-promotor, pero sí estimula la formación del complejo abierto del DNA, requerido para que inicie la transcripción (19, 34).

En muchos casos, la regulación de los genes de virulencia parece implicar a toda una cascada de activadores: uno sólo recibe la señal y activa la expresión de otro(s) gen(es) que codifican para la síntesis de proteínas regulatorias que, a su vez, provocan la expresión de los genes de virulencia. La regulación de tipo cascada presenta la ventaja de permitir que las bacterias modulen más adecuadamente su respuesta hacia un estímulo ambiental en particular, lo cual parecería más difícil de lograrse en el caso de que todos los genes fueran controlados por un activador simple (19).

Los activadores difieren en su manera de responder a las señales; en tal sentido, la forma activa de un activador puede ser la que se encuentre unida a algún ligando "X" (producto de las condiciones ambientales), lo que significa que los activadores no unidos a "X" sean incapaces de estimular a la RNA polimerasa para que ésta transcriba los genes que se encuentren bajo su control. Otros

sistemas activadores requieren de dos proteínas: una recibe la señal y activa a la otra, para que ésta estimule la transcripción (sistema regulatorio de dos componentes); evidentemente, en algunos casos la activación también puede necesitar del ensamble de un complejo proteico multicomponente al operador (19).

Sistemas regulatorios de dos componentes. Esta clase de sistemas se ha detectado principalmente en bacterias Gram negativas y controlan numerosas funciones microbianas, incluyendo a las involucradas en la patogenicidad. Por lo general, constan de: a) una proteína sensora, la cual atraviesa la membrana celular, previa fosforilación de algunos de sus aminoácidos; y b) la proteína regulatoria, que puede funcionar como activador transcripcional y/o como represor (19).

Aparentemente, al recibir el estímulo ambiental, la proteína sensora sufre una autofosforilación y después transfiere el grupo fosfato al dominio amino-terminal de la regulatoria, aportando a esta última la capacidad para unirse a secuencias específicas de DNA e iniciar la transcripción de los genes implicados (25).

Varios ejemplos de factores de virulencia bacteriana regulados globalmente por sistemas de dos componentes, se han observado en *Bordetella pertussis* y *Vibrio cholerae*, aunque también influyen de manera particular en la sobrevivencia de *Salmonella* dentro de los macrófagos y en la formación de porinas membranales en *Salmonella* y *Escherichia coli* (19).

Los factores ambientales que estimulan a los sistemas de dos componentes (relacionados con la virulencia) aún son desconocidos. Sin embargo, se ha logrado establecer que el sistema PhoP/PhoQ de *Salmonella typhimurium* es regulado por fosfato y carbono, por el pH y, dentro de los macrófagos, por los niveles de Mg^{++} . PhoP/PhoQ también reprime diversos genes de virulencia en *S. typhimurium*, aunque se estima que sólo el 25 % de los genes PhoP están involucrados directamente en la virulencia. De hecho, cuando PhoP es manipulado para que se active constitutivamente, por lo general se obtiene una bacteria avirulenta. Los trabajos implicados sugieren que los genes PhoP/PhoQ son activados por el medio ambiente y en las etapas tempranas de la infección; empero, una vez que las bacterias entran a las células fagocitarias, PhoP/PhoQ activa la expresión de algunos productos indispensables para la sobrevivencia, mientras reprime a otros, incluidos los implicados en la internalización (19).

Otro sistema de dos componentes parcialmente conocido es el BvgA/BvgS de *Bordetella*; éste regula su propia expresión, así como la de los genes asociados a la FHA, a las fimbrias y a diversas toxinas. BvgS es estimulado por temperatura, sulfato de magnesio y ácido nicotínico; no obstante, también se ha demostrado que cuando se trata de reinstalar al sistema regulatorio BvgA/BvgS -a través de condiciones regulatorias reversas-, la virulencia puede perderse. Este hallazgo reafirma que la regulación de los factores de virulencia y la de otros productos inicialmente reprimidos es tan crítica como compleja (19).

Activadores transcripcionales AraC. Además de los sistemas regulatorios de dos componentes, otros factores regulatorios de virulencia se han logrado detectar recientemente; tal es el caso de los genes equivalentes *AraC* (controladores transcripcionales de la arabinosa en *Escherichia coli*), *VirF*, *ToxT*, *AggR*, *ExsA*, *PerA* y *RNS*, cuyos respectivos productos se unen a secuencias específicas de DNA ubicadas en regiones posteriores a la de los genes de los cuales depende su propia elaboración (19, 52).

Cabe mencionar que la *VirF* de *Yersinia* funciona como regulador global de las Yops, proteínas secretadas y/o localizadas en la membrana, que funcionan como factores de virulencia. *VirF* se une a una secuencia presente en diversos

promotores *Yop* y, como aquélla es regulada por la temperatura, las *Yops* sólo aparecen a 37°C (52).

Por su parte, la *VirF* de *Shigella flexneri* también es termo-dependiente y activa la transcripción de la *VirB* que, a su vez, estimula la síntesis de diversos genes de invasión. La síntesis de la *ToxT* de *Vibrio cholerae*, aparece como consecuencia de la acción de *ToxR* (proteína de la familia de reguladores de dos componentes) y regula la expresión de la toxina-*pili*; la *AggR* de ECEA controla la elaboración de las fimbrias agregativas I; la *ExsA* de *Pseudomonas aeruginosa* regula a la exoenzima S en *P. aeruginosa*; la *PerA* de ECEP controla los factores de virulencia y la *RNS* hace lo propio en ECET (19).

Represión transcripcional. Los represores desempeñan una función contraria a la de los activadores, ya que aquéllos interfieren la transcripción. Por lo general, los genes controlados por represores también cuentan con importantes promotores que se unen eficazmente a la RNA polimerasa; de hecho, los represores actúan uniéndose a los sitios que se superponen a la región ocupada de manera regular por la RNA polimerasa -con lo cual evitan la unión de la enzima al promotor-, o bien, se unen a las partes medias de la propia RNA polimerasa, impidiendo que continúe la transcripción (19).

Los represores también presentan formas activas e inactivas -tal como ocurre con los activadores-, e inclusive, la diferencia entre una y otra formas puede depender de la unión a ligandos específicos; por ejemplo, diversos genes de virulencia, especialmente los que codifican para la síntesis de toxinas, son regulados por hierro; en este sentido, se ha demostrado ampliamente que los altos niveles de toxigenicidad ocurren en concentraciones bajas del metal y, adicionalmente, que los genes dependientes de hierro son regulados por represores que se unen al *DNA* únicamente después de haberse acomplejado con el metal. En otras palabras, cuando existen niveles elevados de hierro, la mayoría de las moléculas del represor se encontrarán en su forma activa (formando complejos férricos y/o ferrosos) y se unirán al operón impidiendo la plena función de la RNA polimerasa; obviamente, en condiciones de ausencia de hierro, la transcripción se llevará a cabo con regularidad. Cabe señalar que, en el fenómeno descrito, la unión hierro-represor representa la forma activa de la molécula; *sin embargo, existen casos excepcionales en los que extrañamente sucede todo lo contrario* (10)

Control de la expresión génica vía la estructura secundaria del RNA. Aún en un operón, en donde lógicamente el mismo promotor simple controla a los

distintos genes implicados, cada uno de estos puede llegar a expresarse en diferentes proporciones que los restantes; ello suele ocurrir con base en la existencia de estructuras “finalizadoras” que provocan que la RNA polimerasa finalice la transcripción en puntos específicos. En concreto, si el orden de los genes es ABC, es posible que la concentración del producto de A sea mayor que el de B y C, cuando un “finalizador” transcripcional se encuentra localizado entre los genes A y B. Este tipo de regulación se ha observado en algunos operones que codifican para la síntesis de pilina; en este caso, la subunidad de pilina que funge como principal se produce en cantidades notablemente mayores a las relacionadas con otras subunidades y con las proteínas de ensamble; evidentemente, el gen asociado a la unidad principal es el primero del operón (19, 25).

Otra clase de regulación que involucra a la estructura secundaria del RNA se denomina atenuación; en este caso, la transcripción del mRNA inicia en una zona denominada región líder -localizada al principio del gen- y, dependiendo de la velocidad con la que los ribosomas se desplacen a lo largo de la región líder del mRNA recién sintetizado, se formarán o no las estructuras reconocidas como señales de terminación por la RNA polimerasa. Cuando sí se forman, la transcripción finaliza antes de que la enzima empiece a transcribir el gen

estructural; en el caso contrario, la transcripción génica procede normalmente (19).

Superenrollamiento del DNA. Este tipo de regulación es aún poco entendido y sólo se ha propuesto como respuesta a los cambios de temperatura, anaerobiosis y osmolaridad; aparentemente, la densidad del DNA superenrollado en un área particular del cromosoma o de un plásmido afecta la capacidad de la RNA polimerasa para unirse a los promotores y dar inicio a la transcripción. Ello podría dar lugar a variaciones en el número de copias producidas a partir de los promotores ubicados en las regiones correspondientes; la extensión de los segmentos en los que el DNA se encuentra superenrollado está determinada por dos enzimas: la DNA girasa y la topoisomerasa I, aunque también parecen influir en ello algunas proteínas parecidas a las histonas. Es decir que, tal como ocurre en el genoma de mamíferos, el DNA bacteriano presenta algunos segmentos más accesibles que otros para la RNA polimerasa (19,26).

En cuanto a las proteínas parecidas a las histonas que se han implicado en la regulación de diversos genes de virulencia, hasta ahora sólo se han estudiado, con escasos resultados, los genes que se sobre-expresan cuando la temperatura de crecimiento se modifica abruptamente de 25°C hasta 37°C (25).

Adicionalmente, la teoría de que el superenrollamiento representa un elemento regulador génico es aún muy cuestionada: puesto que en las bacterias vivas resulta muy complicado medir el grado de enrollamiento de cada región del DNA, las propuestas se han originado en hallazgos indirectos basados en el conocimiento de que la acción del ácido nalidíxico u otros antibióticos quinolónicos afectan a la DNA girasa. Además, reportes recientes establecen que la expresión de genes cromosómicos es afectada en muy pequeña medida por su localización en el DNA; en este sentido, si el superenrollamiento fuera importante, la posición del gen sería determinante en la expresión cromosómica. Sin lugar a dudas, el superenrollamiento, como mecanismo de regulación, es menos controversial para genes plasmídicos (19, 25, 26).

- **Regulación post-transcripcional**

En los años recientes, el predominante número de trabajos sobre regulación transcripcional ha limitado la atención de los investigadores acerca de otros niveles de control génico y, principalmente, de los que tienen lugar después de la transcripción (19, 25).

Sin embargo, es claro que algunos genes de virulencia se controlan en etapas posteriores, tales como la traducción. Por ejemplo, los genes que codifican para las subunidades A y B de la toxina colérica se localizan en un operón simple y son controlados por un promotor sencillo; en la mencionada toxina, la relación de 5 subunidades B por 1 de subunidad A parece deberse -al menos en parte- a que el mRNA asociado a la síntesis de las primeras cuenta con un mejor sitio de unión a los ribosomas que el mRNA que codifica para la subunidad A. Es importante subrayar que la regulación post-transcripcional no sustituye o impide a la transcripcional ni a la que se verifica en otras instancias; de hecho, la producción de las toxinas de la clase A-B se regula frecuentemente a diversos niveles (3, 19).

Más aún, diversos factores de virulencia traducidos a partir del mRNA pueden no encontrarse en su forma activa, sino hasta que son sometidos a procesos post-transcripcionales de modificación y escisión; entre los ejemplos más conocidos figuran la N-metilación de los *pili* constituidos por N-met-fenilalanina y la activación de las toxinas A-B mediante proteasas de corte; no obstante, también debe considerarse a la regulación transcripcional de la subunidad A de la toxina del cólera y a la toxina adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis*: ambas

proteínas son activadas dentro de las células “blanco” -del hospedero- al unirse a proteínas sintetizadas por estas últimas (3,16).

VI. EL DISEÑO RAZONADO DE VACUNAS ANTIBACTERIANAS

i. Panorama general

A partir de la primera mitad del siglo XX, las vacunas han contribuido de manera decisiva a la disminución de los casos de varias enfermedades bacterianas en todo el mundo. Sin embargo, la primera vacuna que demostró su gran eficacia fue la conocida como “triple”, ya que protege a la población contra el tétanos, la tosferina y la difteria; su éxito alcanzó niveles tan insospechados que, posteriormente, han aparecido algunas otras, tales como las tendientes a combatir varios tipos de neumonía y meningitis, cólera, fiebre tifoidea, diarrea infantil, gonorrea, sífilis y sepsis bacteriana, aunque con logros significativamente menores o nulos, dada su carencia de sustento científico. De hecho, algunas de dichas vacunas han resultado más tóxicas que la misma afección contra la cual se intenta proteger y otras no han provocado la esperada inmunidad (91).

En este último sentido, uno de los aspectos más interesantes de la reciente investigación sobre factores bacterianos de virulencia reside en el hallazgo de posibles caminos que conduzcan al diseño racional de vacunas; por ejemplo, el descubrimiento de que la adherencia representa uno de los primeros pasos

fundamentales en las infecciones bacterianas determinó la eventualidad de que las adhesinas de los agentes causales resultaran eficaces componentes de las vacunas; por ello, tales organelos integran los inmunógenos que se prueban actualmente para prevenir el cólera y la tosferina. Análogamente, al detectarse que la cápsula bacteriana posee propiedades antifagocitarias, se empezó a trabajar en la preparación de vacunas constituidas por polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* (contra la neumonía neumocócica) y de *Haemophilus influenzae* (para prevenir la meningitis infantil), pensando en que los anticuerpos inducidos opsonizarían a dichos microorganismos capsulados y, por ende, promoverían que los fagocitos los englobaran y mataran (18, 20, 67, 92, 94).

No obstante, el estudio de la virulencia bacteriana también ha proporcionado datos desfavorables acerca de las vacunas; por ejemplo, la demostración de que algunas especies tales como *Neisseria gonorrhoeae* pueden cambiar sus antígenos de superficie en lapsos cortos estableció que ciertas vacunas resultarían inútiles; asimismo, el conocimiento de que algunas bacterias pueden inducir respuestas autoinmunes alertó a los autores sobre la peligrosidad de algunos de los productos en proyecto (24, 62, 75, 88, 91).

ii. Características de una vacuna óptima

De acuerdo con lo antes mencionado, es claro que el diseño de una vacuna debe considerar numerosos aspectos para que aporte lo que de ella se espera. Si bien se requieren de 5 a 7 días para que aparezcan anticuerpos contra un agente que infecta al organismo por vez primera, ese lapso es de hasta 2 semanas para que dichos anticuerpos alcancen concentraciones eficaces. En este contexto, un segundo contacto con el invasor provoca una respuesta en tan sólo 1 ó 2 días, ya que el sistema inmunológico ha sido estimulado previamente. En otras palabras, una vacuna tiene como finalidades la de actuar como primer exponente, no ser tóxica, inducir una respuesta específica y adecuada muy basta, ser accesible desde el punto de vista económico y, muy segura, en el sentido de que no provoque efectos indeseables, incluidos los signos y síntomas de la enfermedad contra la cual se pretende brindar protección (91).

- **Estimulación de una basta respuesta inmune**

El reto de lograr una respuesta inmunológica que resulte suficiente exige la mayor disposición entre quienes tienen a su cargo el diseño y la experimentación asociados a una vacuna; por ejemplo, a diferencia de las proteínas, los polisacáridos no son buenos inmunógenos pero suelen representar

importantes factores de virulencia en numerosas especies bacterianas que afectan gravemente a infantes y ancianos. Como se señaló en el capítulo I del presente trabajo, la presentación de carbohidratos antigénicos sólo implica a los linfocitos B (y no a los macrófagos), por lo que la memoria inmunológica de largo plazo resulta muy restringida; por ello, la estrategia de mejorar la inmunogenicidad de los azúcares consiste en forzar al sistema inmune para que procese a estas moléculas como si se tratara de proteínas; tal objetivo requiere de que los polisacáridos sean unidos artificial y precisamente a proteínas acarreadoras, con lo cual el diseño del producto -al cual se conoce como vacuna conjugada- se complica notablemente: los enlaces covalentes carbohidrato-proteína llegan a modificar la estructura del azúcar y, por ende, los anticuerpos inducidos pueden no reconocer a la molécula original. Sin embargo, algunas vacunas conjugadas han tenido éxito, tal como ha sucedido con la destinada a proteger contra la meningitis ocasionada por su principal agente etiológico: *Haemophilus influenzae* tipo b (7, 20, 46, 91, 94).

- **Obtención del tipo adecuado de respuesta**

Sin lugar a dudas, otra propiedad de una vacuna adecuada consiste en que ésta debe inducir la clase de respuesta inmunológica más eficaz contra la enfermedad; a este respecto, para evitar que el patógeno colonice las mucosas,

debe estimularse la producción de IgAs, más que de IgG, ya que -en general- ésta sólo genera protección contra microorganismos que suelen ingresar al torrente circulatorio. En este sentido, es conveniente considerar que una vacuna oral sería procesada en el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal y redituaría una respuesta predominante en IgAs, aportando mejores resultados que alguna otra que se administrara por vía parenteral; por ejemplo, actualmente se trabaja en la búsqueda de una vacuna efectiva contra el cólera, pensándose en que ésta debe ser oral y que podría constituirse por el fragmento B de la toxina colérica, ya que dicha fracción no es tóxica pero se encarga de fijarse a las células “blanco”; desafortunadamente, se ha observado que dicho fragmento -en forma individual- no estimula mayormente al tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT), como sí lo hace la molécula entera. Por ello, será indispensable diseñar alguna mutante no tóxica de la toxina completa (40, 55, 91).

Otra manera de lograr vacunas orales eficaces radica en obtener provecho de ciertas bacterias que sí estimulen al MALT intestinal, como ocurre con algunas cepas avirulentas de *Salmonella*, a las cuales podría utilizarse como acarreadoras de antígenos provenientes de cepas patógenas. En tal contexto, resultaría necesario manipular genéticamente a las cepas implicadas para que

éstas expresaran los genes extraños que se le hubieran clonado previamente y la respuesta inducida protegería contra *Salmonella* y, adicionalmente, contra el microorganismo del cual procediera el gen extraño; no obstante, este tipo de estrategia también implica algunas problemáticas a superar: por un lado, es fundamental que el antígeno extraño se exprese superficialmente sin conferir virulencia a la bacteria acarreadora y, por el otro, que esta última logre reproducirse en la placas de Peyer -aunque carezca de patogenicidad- hasta que se produzca una respuesta suficiente de IgAs (24, 40, 55).

Por lo que se refiere a la respuesta de IgG contra antígenos bacterianos, en este rubro se han alcanzado mayores avances; si bien la inyección de antígenos solubles origina respuestas ineficaces, ya que aquéllos no son detectados ni procesados adecuadamente por los macrófagos y otras células presentadoras de antígenos, el revestimiento de dichos antígenos por liposomas (micelas lipídicas creadas artificialmente) o su previa unión a partículas de oro, puede corregir esta desventaja (91).

Adicionalmente, aprovechando la inmunogenicidad de algunos microorganismos tales como el bacilo de Calmette y Guérin (BCG), es posible estimular la inmunidad celular contra determinados antígenos, clonando los

genes correspondientes en el BCG. Evidentemente, aún cuando el uso del BCG resulta polémico como vacuna contra la tuberculosis, su aplicación como vehículo de otros antígenos podría redituvar la elaboración de vacunas efectivas contra otros agentes etiológicos que sólo son neutralizados mediante inmunidad celular (91).

- **Generación de una respuesta protectora**

Como se puede deducir de lo anterior, la práctica original de elaborar vacunas mediante el cultivo *in vitro* y la secuencial inactivación del agente causal, carece de sustento bioquímico y, por ende, representa una opción poco responsable. Quizá el problema principal resida en que el sistema inmunológico responde contra los diversos productos bacterianos con base en sus respectivas inmunogenicidades y sin considerar la virulencia de cada uno. Además, no debe soslayarse el hecho de que los factores de patogenicidad son elaborados por las bacterias de acuerdo con determinadas señales fisicoquímicas que regulan la expresión de los genes involucrados, por lo que el cultivo microbiano en los medios inadecuados no estimula la elaboración de antígenos relevantes. En resumen, el primer paso en la elaboración de vacunas debe ser el de la identificación de los factores de virulencia asociados al agente causal contra el cual se desea conferir protección (8, 14, 16, 52, 91).

- **Costo de una vacuna**

El costo también representa una característica importante de las vacunas útiles, ya que un producto relativamente barato, de fácil administración y que no requiera de refrigeración durante su almacenamiento y traslado, tiene mayores posibilidades de ser distribuído entre millones de personas; desafortunadamente, las vacunas conjugadas y las constituídas por componentes bacterianos purificados resultan mucho más caras que las integradas por bacterias completas. Sin embargo, los avances logrados recientemente podrían hacer compatibles los costos con la eficacia; al parecer, las estrategias implicadas serían la aplicación de la ingeniería genética (para expresar antígenos extraños en microorganismos empleados como simples vehículos) y el empleo de DNA desnudo (91, 92).

Esta última estrategia consiste en inyectar intramuscularmente DNA recubierto por moléculas de oro; hasta ahora, las pruebas correspondientes se han realizado en animales cuyas células musculares terminan por sintetizar las proteínas codificadas en el DNA inoculado; lógicamente, dichas proteínas resultan inmunógenas y, al parecer, dan lugar a la formación de numerosos linfocitos T citotóxicos, por lo que el proceso podría resultar particularmente útil para

proteger a la población contra microorganismos capaces de reproducirse intracelularmente; de hecho, aunque hasta ahora sólo se ha trabajado con DNA viral, no se han encontrado razones para pensar que el proceso no sería factible para el caso de agentes bacterianos. Los costos resultarían relativamente bajos ya que, indudablemente, es más fácil y barato obtener el DNA bacteriano que purificar proteínas constitutivas o libres (20, 91).

- **Seguridad**

Por lo que respecta a este rubro, generalmente es más frecuente que las bacterias enteras provoquen efectos colaterales que las constituidas por componentes definidos. El motivo es que las bacterias muertas contienen LPS u otras sustancias tóxicas en la pared celular; en este sentido, cabe recordar que la vacuna pertussis, integrada por bacterias completas muertas, es muy efectiva para proteger contra la tosferina, pero da lugar a diversos efectos colaterales, algunos de ellos muy serios.; por tal motivo, se ha diseñado una nueva versión, constituida por una adhesina y un toxoide, que aparentemente ha solucionado la problemática (20, 91, 92).

Por su parte, las vacunas elaboradas con microorganismos vivos atenuados también representan un riesgo importante, ya que aquéllos pueden recuperar la

virulencia en el organismo del individuo inoculado y provocar la enfermedad contra la cual se pretende proteger. Ejemplos de lo anterior son: a) una vacuna contra el cólera, constituida por una cepa mutante que no produce toxina colérica, pero sí libera otra toxina -cuya existencia había pasado por desapercibida- que ocasionó diarrea en voluntarios humanos; b) la BCG, avirulenta para numerosas personas, puede causar tuberculosis a individuos inmunocomprometidos, incluidos los enfermos de SIDA (20, 91, 92).

CONCLUSIONES

- La capacidad bacteriana para establecerse, reproducirse y diseminarse en los tejidos del hospedero se sustenta en factores de virulencia tales como las adhesinas, exoenzimas hidrolíticas, sideróforos, lipopolisacáridos, cápsulas y diversas estructuras de superficie.
- Las adhesinas bacterianas incluyen a los *pili* y a diversas proteínas no fimbriales; entre estas últimas destacan algunas, denominadas invasinas, que también promueven la invasión intracelular.
- El proceso de polimerización/despolimerización de la actina localizada en la superficie de las células del hospedero, es fundamental en la invasión intracelular, ya que da lugar a la formación de pseudópodos fagocitarios o estructuras análogas que permiten la internalización de la bacteria.
- Las bacterias patógenas suelen producir enzimas hidrolíticas que promueven la diseminación, interfieren la fagocitosis y/o escinden a los anticuerpos de la clase IgA.

- Diversos agentes bacterianos evaden la acción de los anticuerpos, recubriéndose con sustancias propias, algunas de las cuales semejan a las de su hospedero o, inclusive, con proteínas sintetizadas por este último.
- De acuerdo con su estructura y/o su mecanismo de acción, las exotoxinas se clasifican en: a) toxinas A-B, b) toxinas que *interrumpen la continuidad de las membranas* y, finalmente, c) toxinas que actúan como superantígenos.
- El lipopolisacárido endotóxico de las bacterias Gram negativas se encuentra constituido por el lípido A, el antígeno somático O y un núcleo polisacárido; en el primero de ellos reside su toxicidad y, en el segundo, su capacidad para unirse al receptor CD14 (ubicado en las células de la serie monocito-macrófago).
- Los diferentes mecanismos de control génico que permiten a las bacterias su adaptación y sobrevivencia dentro del hospedero, se clasifican en alguno de los siguientes rubros: a) la amplificación y los rearrreglos génicos, b) la regulación transcripcional, y c) la regulación post-transcripcional.
- El estudio de los factores de virulencia bacteriana se asocia al diseño de vacunas eficaces, seguras y de bajo costo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aktories K.: Rho proteins: targets for bacterial toxins, **Trends Microbiol**, 1997; 5(7): 282-287.
2. Andrews N.W. and Portnoy D.A.: Cytolysins from intracellular pathogens, **Trends Microbiol**, 1994; 2(8): 261-262.
3. Balfanz J., Rautenberg P. y Ullmann U.: Molecular mechanisms of action of bacterial exotoxins, **Zentralbl Bakteriol**, 1996; 284(2-3): 170-206.
4. Beveridge T.J.: Bacterial structure and its implications in the mechanisms of infection, **Can J Microbiol**, 1980; 26(6): 643-653.
5. Brown E.J.: Phagocytosis, **Bioessays**, 1995; 17(2): 109-117.
6. Bullitt E. and Makowski L.: Structural polymorphism of bacterial adhesion pili, **Nature**, 1995; 373(6510): 164-167.
7. Casadevall A.: Antibody-mediated protection against intracellular pathogens, **Trends Microbiol**, 1998; 6(3): 102-106.
8. Cornelis G.R.: Contact with eukaryotic cells: a new signal triggering bacterial gene expression, **Trends Microbiol**, 1997; 5(2): 43-44.
9. Dalton H.M. and March P.E.: Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling, **Curr Opin Biotechnol**, 1998; 9(3): 252-255.
10. Deitsch K.W., Moxon E.R. and Wellems T.E.: Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal, and fungal infections, **Microbiol Mol Biol Rev**, 1997; 61(3): 281-293.
11. Donnenberg M.S., Kaper J.B. and Finlay B.B.: Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells, **Trends Microbiol**, 1997; 5(3): 109-114.

12. Duchmann R., Neurath M., Marker-Hermann E., Meyer Z. and Buschenfelde K.H.: Immune responses towards intestinal bacteria-current concepts and future perspectives, **Z Gastroenterol**, 1997; 35(5): 337-346.
13. Duncan H.E and Edberg S.C.: Host-microbe interaction in the gastrointestinal tract, **Crit Rev Microbiol**, 1995; 21(2): 85-100.
14. Dunny G.M. and Leonard B.A.: Cell-cell communication in gram-positive bacteria, **Annu Rev Microbiol**, 1997; 51: 527-564.
15. Eckmann L., Kagnoff M.F. and Fierer J.: Intestinal epithelial cells as watchdogs for the natural immune system, **Trends Microbiol**, 1995; 3(3): 118-120.
16. Edwards R.A. and Puente J.L.: Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis, **Trends Microbiol**, 1998; 6(7): 282-287.
17. Ellison R.T.: The effects of lactoferrin on gram-negative bacteria, **Adv Exp Med Biol**, 1994; 357: 71-90.
18. Ferrieri P. and Thea H.: Unraveling the mysteries of streptococci and their relations with the host, **Trends Microbiol**, 1997; 5(1): 5-6.
19. Finlay B.B. and Falkow S.: Common themes in microbial pathogenicity revisited, **Microbiol Mol Biol Rev**, 1997; 61(2): 136-169.
20. Foxwell A.R., Kyd J.M. and Cripps A.W.: Nontypeable *Haemophilus influenzae*: Pathogenesis and prevention, **Microbiol Mol Biol Rev**, 1998; 62(2): 294-308.
21. Garcia-del Portillo F. and Finlay B.B.: The varied lifestyles of intracellular pathogens within eukaryotic vacuolar compartments, **Trends Microbiol**, 1995; 3(10): 373-379.
22. Garza V.R y Peniche Q.E.: El proceso infectivo, **Educación Química**, 1991; 2(2): 68-71.
23. Goebel W. y Krefl J.: Cytolysins and the intracellular life of bacteria, **Trends Microbiol**, 1997; 5(3): 86-88.

24. Griffiths E.: Environmental regulation of bacterial virulence-implications for vaccine design and production, **Tibtech**, 1991; 9: 309-315.
25. Guiney D.G.: Regulation of bacterial virulence gene expression by the host environment, **J Clin Invest**, 1997; 99(4): 565-569.
26. Hacker J.: Microbial pathogenicity factors as parts of global regulatory networks, **Acta Microbiol Immunol Hung**, 1996; 43(1): 19-24.
27. Hacker J, Blum-Oehler G., Mühldorfer Y. and Tschäpe H.: Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution, **Mol Microbiol**, 1997; 23(6): 1089-1097.
28. Hackstadt T., Fischer E.R., Scidmore M.A., Rockey D.D. and Heinzen R.A.: Origins and functions of the chlamydial inclusion, **Trends Microbiol**, 1997; 5(7): 288-293.
29. Harshey Rasika M y Toguchi Adam.: Spinning tails: homologies among bacterial flagellar systems, **Trends Microbiol**, 1996; 4(6): 226-231.
30. Heithoff D.M., Conner C.P. and Mahan M.J.: Dissecting the biology of a pathogen during infection, **Trends Microbiol**, 1997; 5(12): 509-513.
31. Henderson B., Poole S. and Wilson M.: Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis, **Microbiol Rev**, 1996; 60(2): 316-341.
32. Henderson B., Wilson M. and Wren B.: Are bacterial exotoxins cytokine network regulators?, **Trends Microbiol**, 1997; 5(11): 454-458.
33. Henderson I.R., Navarro G.F. and Nataro J.P.: The great escape: structure and function of the autotransporter proteins, **Trends Microbiol**, 1998; 6(9): 370-377.
34. Hueck C.J.: Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants, **Microbiol Mol Biol Rev**, 1998; 62(2): 379-433.
35. Hung D.L., Knight S.D., Woods R.M., Pinkner J.S. and Hultgren S.J.: Molecular basis of two subfamilies of immunoglobulin-like chaperones, **EMBO J**, 1996; 15(15): 3792-3805.

36. Isberg R.R. and Tran V.N.G.: Binding and internalization of microorganisms by integrin receptors, **Trends Microbiol**, 1994; 2(1): 10-13.
37. Jacob-Dubuisson F., Heuser J., Dadson K., Normark S. and Hultgren S.: initiation of assembly and association of the structural elements of a bacterial pilus depend on two specialized tip proteins, **EMBO J**, 1993; 12(3): 837-847.
38. Jacob-Dubuisson F, Kuehn M. and Hultgren S.J.: A novel secretion apparatus for the assembly of adhesive bacterial pili, **Trends Microbiol**, 1993; 1(2): 50-55.
39. Jacques M.: Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence, **Trends Microbiol**, 1996; 4(10): 408-409.
40. Jepson M.A. and Clark M.A.: Studying M cells and their role in infection, **Trends Microbiol**, 1998; 6(9): 359-365.
41. Jerse A.E. and Rest R.F.: Adhesion and invasion by the pathogenic neisseria, **Trends Microbiol**, 1997; 5(6): 217-221.
42. Kaper J.B.: EPEC delivers the goods, **Trends Microbiol**, 1998; 6(5): 169-172.
43. Kaplan S.S., Lancaster J.R. Jr, Basford R.E. and Simmons R.L.: Effect of nitric oxide on staphylococcal killing and interactive effect with superoxide, **Infect Immun**, 1996; 64(1): 69-76.
44. Keisari Y., Kabha K., Nissimov L., Schlepper-Schafer J. and Ofek Y.: Phagocyte-bacteria interactions, **Adv Dent Res**, 1997; 11(1): 43-49.
45. Kotb M.: Bacterial pyrogenic exotoxins as superantigens, **Clin Microbiol Rev**, 1995; 8(3): 411-426.
46. Kotwal G.J.: Microorganisms and their interaction with the immune system, **J Leukoc Biol**, 1997; 62(4): 415-429.
47. Krueger K.M. and Barbieri J.T.: The family of bacterial ADP-ribosylating exotoxins, **Clin Microbiol Rev**, 1995; 8(1): 34-47.

48. Kuchn M.J.: Establishing communication via Gram-negative bacterial pili, **Trends Microbiol**, 1997; 5(4): 130-132.
49. Lamm M.E.: Current concepts in mucosal immunity. IV. How epithelial transport of IgA antibodies relates to host defense, **Am J Physiol**, 1998; 274(4 Pt 1): G614-617.
50. Lantz M.S.: Are bacterial proteases important virulence factors?, **J Periodontal Res**, 1997; 32(1 Pt 2): 126-132.
51. Lee C.A.: Pathogenicity islands and the evolution of bacterial pathogens, **Infect Agents Dis**, 1996; 5(1): 1-7.
52. Lee C.A.: Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eukaryotic cells, **Trends Microbiol**, 1997; 5(4): 148-155.
53. Lipsitch M. and Moxon R.E.: Virulence and transmissibility of pathogens: what is the relationship, **Trends Microbiol**, 1997; 5(1): 31-37.
54. Maillard I., Luthi F., Acha-Orbea H. and Diggelmann H.: Role of the immune response induced by superantigens in the pathogenesis of microbial infections, **Parasitology**, 1997; 115(S): S67-S78.
55. Marcotte H. and Lavoie M.C.: Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A, **Microbiol Mol Biol Rev**, 1998; 62(1): 71-109.
56. Marsh C.B. and Wewers M.D.: The pathogenesis of sepsis. Factors that modulate the response to gram-negative bacterial infection, **Clin Chest Med**, 1996; 17(2): 183-197.
57. Mecsas J. and Strauss E.J.: Molecular mechanisms of bacterial virulence: type III secretion and pathogenicity islands, **Emerg Infect Dis**, 1996; 2(4): 270-288.
58. Michie C.A. and Cohen J.: The clinical significance of T-cell superantigens, **Trends Microbiol**, 1998; 6(2): 61-65.
59. Montecucio C. and Papini E.: Cell penetration of bacterial protein toxins, **Trends Microbiol**, 1995; 3(5): 165-167.

60. Moors M.A. and Portnoy D.A.: Identification of bacterial genes that contribute to survival and growth in an intracellular environment, **Trends Microbiol**, 1995; 3(3): 83-85.
61. Mostafavi M., Stein P.C. and Parsons C.L.: Production of soluble virulence factor by *Escherichia coli*, **J Urol**, 1995; 153(5): 1441-1443.
62. Murphy T.F.: Antigenic variation of surface proteins as a survival strategy for bacterial pathogens, **Trends Microbiol**, 1994; 2(11): 427-429.
63. Ojcius D.M., Gachelin G. and Dautry-Varsat A.: Presentation of antigens derived from microorganisms residing in host-cell vacuoles, **Trends Microbiol**, 1996; 4(2): 53-59.
64. Oliveira S.C., Harms J.S., Rech E.L., Rodarte R.S., Bocca A.L., Goes A.M. and Splitter G.A.: The role of T cell subsets and cytokines in the regulation of intracellular bacterial infection, **Braz J Med Biol Res**, 1998; 31(1):77-84.
65. Pollard T.D.: Actin cytoskeleton. Missin link for intracellular bacterial motility?, **Curr Biol**, 1995; 5(8): 837-840.
66. Popoff M.R.: Interactions between bacterial toxins and intestinal cells, **Toxicon**, 1998; 36(4): 665-685.
67. Quinn F.D., Newman G.W. and King C.H.: In search of virulence factors of human bacterial disease, **Trends Microbiol**, 1997; 5(1): 20-26.
68. Read A.F.: The evolution of virulence, **Trends Microbiol**, 1994; 2(3): 73-75.
69. Rietschel E.T., Kirikae T., Schade F.U., Mamat U., Schmidt G., Loppnow H., Ulmer A.J., Zahringer U., Seydel U. and Di-Padova F.: Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity an function, **FASEB J**, 1994; 8(2): 217-225.
70. Risco C. and Pinto S.P.: Cellular functions during activation and damage by pathogens: immunogold studies of the interaction of bacterial endotoxins with target cells, **Microsc Res Tech**, 1995; 31(2): 141-158.

71. Romagnani S.: Biology of human TH1 and TH2 cells, *J Clin Immunol*, 1995; 15(3): 121-129.
72. Rozalski A., Sidorczyk Z. and Kotelko K.: Potential virulence factors of *Proteus* bacilli, *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997; 61(1): 65-89.
73. Sakamoto M., Fujisawa Y. and Nishioka K.: Physiologic role of the complement system in host defense, disease and malnutrition, *Nutrition*, 1998; 14(4): 391-398.
74. Saulino E.T., Thanassi D.G., Pinkner J.S. and Hultgren S.J.: Ramifications of kinetic partitioning on usher-mediated pilus biogenesis, *EMBO J*, 1998; 17(8): 2177-2185.
75. Saunders J.R., O'Sullivan H., Wakeman J., Sims G., Hart C.A., Virji M., Heckels J.E., Winstanley C., Morgan J.A. and Pickup R.W.: Flagella and pili as antigenically variable structures on the bacterial surface, *J Appl Bacteriol*, 1993; 74(S): 33S-42S.
76. Scherer C.A., Hantman M.J. and Miller S.I.: *Salmonella* invasion and delivery of protein effectors to mammalian cell cytoplasm, *Trends Microbiol*, 1997; 5(4): 127-129.
77. Siebers A. and Finlay B.B.: M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections, *Trends Microbiol*, 1996; 4(1): 22-29.
78. Simms H.H. and D'amico R.: Studies on polymorphonuclear leukocyte bactericidal function III: the role of extracellular matrix proteins, *J Surg Res*, 1997; 72(2): 123-128.
79. Smith H.: What happens to bacterial pathogens in vivo?, *Trends Microbiol*, 1998; 6(6): 239-243.
80. Smith J.A.: Neutrophils, host defense and inflammation: a double-edged sword, *J Leukoc Biol*, 1994; 56(6): 672-686.
81. Songer G.J.: Bacterial phospholipases and their role in virulence, *Trends Microbiol*, 1997; 5(4): 156-161.

82. Soos J.M., Schiffenbauer J., Torres B.A. and Johnson H.M.: Superantigens as virulence factors in autoimmunity and immunodeficiency diseases, **Med Hypotheses**, 1997; 48(3): 253-259.
83. Stahl P.D. and Ezekowitz R.A.: The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense, **Curr Opin Immunol**, 1998; 10(1): 50-55.
84. Stanley P., Koronakis V. and Hughes C.: Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: A unique protein lipidation mechanism underlying toxin function, **Microbiol Mol Biol Rev**, 1998; 62(2): 309-333.
85. Svanborg C., Hedlund M., Connell H., Agace W., Duan R.D., Nilsson A. and Wult B.: Bacterial adherence and mucosal cytokine responses. Receptors and transmembrane signaling, **Ann N Y Acad Sci**, 1996; 797: 177-190.
86. Tessier P.A., Naccache P.H., Diener K.R., Glaude R.P., Neote K.S., Clark-Lewis I. and McColl S.R.: Induction of acute inflammation in vivo by staphylococcal superantigens II. Critical role for chemokines ICAM-1 and TNF-alpha, **J Immunol**, 1998; 161(3): 1204-1211.
87. Theriot J.A.: The cell biology of infection by intracellular bacterial pathogens, **Ann Rev Cell Dev Biol**, 1995; 11: 213-239.
88. Todar K.: Mechanisms of bacterial pathogenicity, **Bacteriology at UW-Madison**, 1998; 1-16.
89. Ulevitch R.J.: Recognition of bacterial endotoxins by receptor-dependent mechanisms, **Adv Immunol**, 1993; 53: 267-289.
90. Van Rooijen N., Wijburg O.L., Van der Dobbelen G.P. and Sanders A.: Macrophages in host defense mechanisms, **Curr Top Microbiol Immunol**, 1996; 210: 159-165.
91. Vogels M.T. and van der Meer J.W.: Use of immune modulators in nonspecific therapy of bacterial infections, **Antimicrob Agents Chemother**, 1992; 36: 1-5.
92. Vrane's J.: Inhibition of bacterial adherence possibilities of prevention and therapy, **Lijec Vjesn.** 1996; 118(7-8): 171-177.

93. Waldor M.K.: Bacteriophage biology and bacterial virulence, **Trends Microbiol**, 1998; 6(8): 295-296.
94. Watson D.A., Musher D.M. and Verhoef J.: Pneumococcal virulence factors and host immune responses to them, **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 1995; 14(6): 479-490.
95. Weiss J.: Leukocyte derived antimicrobial proteins, **Curr Opin Hematol**, 1994; 1(1): 78-84.
96. Wyckoff T.J.O., Raetz C.R.H. and Jackman J.E.: Antibacterial and anti-inflammatory agents that target endotoxin, **Trends Microbiol**, 1998; 6(4): 154-159.