

Antrax, plásmidos y patogenicidad

Vidal Rodríguez Lemoine.

Laboratorio de Biología de Plásmidos Bacterianos. Instituto de Biología Experimental
Universidad Central de Venezuela.

Resumen

Presentar un resumen actualizado sobre el ciclo ecológico del *Bacillus anthracis* y los factores responsables de la virulencia en animales y el hombre, con especial énfasis en la biología de los plásmidos que codifican las funciones de patogenicidad.

Presentación

El Anthrax o carbunco es una enfermedad que ocurre fundamentalmente en animales herbívoros (ganado vacuno, caprinos y ovinos), y muy esporádicamente en otros mamíferos y el hombre. Es causada por el *Bacillus anthracis*, una bacteria Gram positiva, capsulada, no-móvil, aeróbica o anaeróbica facultativa, con forma de bastón o bacilar (1.5-2 a 8-11 μ), capaz de formar esporas resistentes que le permiten sobrevivir en ambientes adversos por largos períodos de tiempo. La mayoría de las cepas estudiadas son virulentas y esta capacidad está determinada por funciones codificadas en dos megaplásmidos estables (pXO1 y pXO2), que portan los genes requeridos para la síntesis de las proteínas responsables de la toxicidad (factor edema, *cya*, factor letal, *lef* y el antígeno de protección, *pagA*), los genes relacionados con la germinación (*gerXA*, *gerXB* y *gerXC*), organizados en un operon; y la producción de una cápsula antifagocítica formada por un polímero de ácido D-glutámico. El ciclo de vida de *B. anthracis* transcurre casi exclusivamente en el estomago de mamíferos herbívoros – habitat natural de reproducción- donde las esporas pueden germinar y las formas vegetativas se multiplican y producen las toxinas que en concentraciones elevadas pueden conducir a la muerte del organismo hospedador. Las formas vegetativas no son por si mismas capaces de invadir y reproducirse en hospedadores sanos. La formación de esporas requiere entre otros factores la presencia de oxígeno, y la eficiencia del proceso es dependiente de las condiciones ambientales. Las esporas germinan en los tejidos y órganos de mamíferos, produciendo de acuerdo a la forma de ingreso tres tipos de enfermedades infecciosas: cutánea, intestinal o respiratoria. Esta última produce altas tasas de mortalidad.

Un poco de historia.

Pollender en 1849, fue el primero en revelar la presencia de cuerpos en forma de bastón en la sangre de animales que padecían una enfermedad conocida desde la antigüedad como: fiebre esplénica, pústula maligna, enfermedad de los escaudadores de la lana, carbunco o ántrax, sugiriendo una conexión causal con la enfermedad. Devaine en 1863, demostró que la presencia de las formas bacilares encontradas en la sangre de animales con ántrax era una condición esencial para producir la muerte en animales inoculados. Afirmó que se trataba de bacterias y propuso el nombre de *Bacillus anthracis* para designarlas. Pero las ideas de Devaine no fueron universalmente aceptadas ni sus experimentos concluyentes. La polémica sobre la causalidad se extendió hasta 1876 cuando Roberto Koch, publicó su trabajo sobre “*La etiología del Anthrax basada en la historia de vida del Bacillus anthracis*”. Koch realizó cuidadosas observaciones sobre la morfología y división del bacilo en la sangre y en tejidos de animales, y desarrolló las

técnicas para la obtención de cultivos puros que le permitieron demostrar la producción de esporas a partir del bacilo y de bacilos a partir de esporas, confirmando en forma magistral los trabajos de Ferdinand Cohn. Finalmente, logró reproducir los síntomas de la enfermedad mediante la inoculación de animales sanos con cultivos puros de *B. anthracis*, estableciendo una correlación inequívoca entre el agente infeccioso y la enfermedad. Nació la Bacteriología y rápidamente se transformó en una ciencia experimental. En 1881 Koch publicó los “*Métodos para el estudio de organismos patógenos*” y un año más tarde, el trabajo seminal sobre la etiología de la tuberculosis. En los veinte años siguientes, los bacteriólogos lograron establecer la etiología de las principales enfermedades producidas por bacterias. En 1881, Louis Pasteur desarrolló la primera vacuna empleando cultivos vivos de *B. anthracis* atenuados por calor (42°-43°C). La efectividad de la vacuna en vacas, ovejas y carneros fue demostrada en público en el campo de Pouilly-le-Fort, dejando firmemente establecidos los principios de la inmunización. En Venezuela, se reconoce a Rafael Rangel como el primero en realizar estudios experimentales sobre el ántrax. En 1906 diagnosticó con magistral precisión que el mal conocido como *atarrillamiento* o *tabardillo*, que afectaba al ganado vacuno, o el *vejigazo*, *ampolla del ganado* o *vejiga de vaca* que producía lesiones severas entre los criadores, y *el grito de las cabras* eran todas producidas por el *B. anthracis*. Rangel, junto a Minguet Letteron trabajó en la atenuación del bacilo con miras a la elaboración de una vacuna.

Bacillus anthracis

El *Bacillus anthracis* es el agente etiológico del ántrax o carbunco. Es una bacteria Gram positiva, en forma de bastón de 2 a 11 μm , con lados paralelos y extremos rectos o ligeramente cóncavos, recubierta por una cápsula formada un polímero del ácido D-glutámico. Las células se asocian, protegidas por una envoltura capsular de apariencia uniforme, formando diplobacilos, o en largas cadenas cuando provienen de cultivos, y en parejas o cadenas de tres a cuatro cuando se aíslan a partir de organismos infectados. Forman esporas de aspecto elipsoidal de 1 a 1.5 μm , ubicadas en el centro sin producir deformaciones del cuerpo bacteria.

Plásmidos y ciclo ecológico

En la gran mayoría de las cepas de *B. Anthracis* estudiadas se ha demostrado la presencia estable de dos elementos genéticos extracromosómicos de gran tamaño –megaplásmidos- que le confieren a los individuos de la población ventaja selectiva y capacidad para completar un ciclo que abarca dos nichos ecológicos bien diferenciados, en los cuales se expresan dos estadios fisiológicos alternativos. El primero corresponde a la germinación de la forma “durmiente” e inicio de la forma vegetativa, capaz de multiplicarse en los tejidos y órganos de animales herbívoros, y en menor grado en el hombre-; el segundo corresponde a la formación de esporas fuera del organismo hospedador como respuesta a condiciones ambientales particulares. Los megaplásmidos, identificados como pXO1 y pXO2, tienen tamaños moleculares de 60MDa (96.231 pares de bases) y 110 MDa (181,654 pares de bases) respectivamente. Por su tamaño, amplia distribución entre aislados de la naturaleza, estabilidad genética y las funciones asociadas pueden ser considerados como una parte fundamental -no dispensable- del genoma de este organismo. En conjunto, las funciones plasmídicas responsables de la virulencia, formación de la cápsula y la germinación de las formas esporuladas son esenciales para la sobrevivencia del *B. Anthracis* en los habitats que ocupan durante el ciclo ecológico.

Plásmidos y patogenicidad

Todas las cepas de *B. anthracis* reportadas como virulentas son portadoras de los plásmidos pXO1 y pXO2. Actualmente se conoce la secuencia completa del DNA de estas moléculas, y se han construido los mapas físicos correspondientes. La proporción de bases GC (32.5%) es similar a la del resto del genoma. Llama la atención que la mayoría de los genes putativos (ORF's o marcos abiertos de lectura) codificados en estas moléculas no presentan homología significativa con las secuencias de genes identificados y disponibles en los bancos de datos. Un hecho común es la abundancia de secuencias asociadas con la inserción, integración y transposición de genes, proporcionando en conjunto gran flexibilidad genética.

El plásmido pXO1, con 143 ORF's, contiene los genes estructurales *pagA*, *lef* y *cya*, que codifican para las proteínas conocidas respectivamente como Antígeno de Protección (AP), Factor Letal (FL) y Factor Edema (FE); dos elementos de regulación difusibles (genes *pagR* y *atxA*), una resolvasa, una transposasa, además del operon *gerX* (genes, *XA*, *XB* y *XC*) relacionado con el proceso de germinación de las esporas. Todas estas funciones están reunidas en una "isla patogénica" formada por una región de 44.8 Kbp, delimitada por secuencias repetidas invertidas (secuencia IS1627). Otras regiones contienen genes posiblemente relacionados con los mecanismos de replicación, segregación y control del número de copias del plásmido. La mayoría, sin embargo, no codifican para funciones conocidas.

Las proteínas FL (90 kDa) y FE (89 kDa), no son en sí mismas toxigénicas, y no son capaces de penetrar al citoplasma, actúan formando combinaciones binarias con el Antígeno Protector (83 kDa), generando compuestos toxigénicos, capaces de producir diferentes respuestas patogénicas en animales y cultivos celulares. AP+FL forman la toxina letal, mientras que AP+FE forman la toxina edema, que producen respectivamente la muerte de animales y edema en piel. En el proceso de acción de las toxinas AP se une a un receptor celular y es clivado por proteasas celulares dando origen a proteína de 63kDa la AP63 que posee un sitio de unión de alta afinidad con los factores FL y FE. Los complejos formados son internalizados mediante un proceso de endocitosis que facilita la translocación de los factores al interior celular. El Factor Edema tiene actividad de adenilciclasa, mientras que el Factor Letal es una proteasa que inactiva la enzima MAPKK1. Dentro de la región delimitada por las secuencias IS1627 se encuentra el operon de germinación formado por los genes *gerXA*, *gerXB* y *gerXC*, que codifican proteínas con secuencias (y probablemente funciones) similares a la germinación de esporas en *B. subtilis*.

El plásmido pXO2, con 85 ORF's, contiene los genes estructurales *capB*, *capC*, y *capA*, y el gen regulador *dep*, responsables de la síntesis del ácido poliγD-glutámico, que es secretado y forma una cápsula que envuelve la pared celular y contribuye con la patogenicidad permitiendo la evasión de los mecanismos de inmunidad y defensa, permitiendo el desarrollo de septicemia en organismos infectados.

Consideraciones finales.

Bacillus anthracis ha sido objeto y sujeto de estudio desde los inicios de la Bacteriología y el desarrollo de la Inmunología. Primero como modelo para el establecimiento de la etiología de las enfermedades infecciosas, luego en la producción de la primera vacuna por atenuación de bacilos vivos, aplicada con éxito en el control del ántrax en animales herbívoros. En las últimas décadas ha sido manipulado para la producción masiva de esporas destinadas a la guerra bacteriológica y el

bioterrorismo. En el futuro cercano dispondremos de la secuencia completa del genoma (cromosoma+plásmidos), y el *B. anthracis*, servirá nuevamente de modelo, ahora para otros campos del conocimiento: la transcriptómica y la proteómica.

Bibliografía

1. **Bhatnagar, R., and Batra, S.** (2001). *Anthrax toxin*. Critical Rev. Microbiol. 27(3):167-2000
2. **Brock, T.** (1961). Milestones in Microbiology. Prentice-Hall.
3. **Muir, R., and Ricchie, J.** *Manual of Bacteriology*. Oxford Medical Publications. Seventh Edition, 1921
4. **Mock, M., and Fouet, A.** (2001) *Antrax*. Ann.Rev. Microbial. 55:647-671
5. **Okinaka, R.T., Cloud, K., Hampton, O., Hoffmaster, A.R., Hill, K.K., Keim, P. Koheller, T.M., Lamke, G., Kumano, S., Mahillon, J., Manter, D., Martinez, Y., Ricke, D., Svensson, R., and Jackson, P.J.** (1999). *Sequence and organization of pXO1, the large Bacillus anthracis plasmid harboring the Anthrax toxin genes*. Jour. Bacteriol. 181:6509-6515
6. **Rangel, R., y Minguet Letteron, A.** (1906). *El carbunco bacteridiano en Venezuela. . Primeras observaciones experimentales sobre el carbunco bacteridiano en Venezuela*. Gaceta. Médica de Caracas. 13: 131-134
7. **Thorne, C.** (1993). *Bacillus anthracis*. P. 113-124. In A. L. Sonenshein (ed) *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

