

Toxinas microbianas: aspectos generales y uso potencial como agentes antitumorales.

Microbial toxins: general aspects and potential use as antitumor drugs.

TRABAJO FIN DE GRADO

CARLA MÉNDEZ PÉREZ

Tutorizado por Ángel M. Gutiérrez Navarro

Grado en Biología

Julio 2018

SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 2017/2018	ENTRADA Fecha: Núm:
--	--

Datos Personales

Nº DNI o pasaporte: 43385058.C	Nombre y Apellidos: CARLA MENDEZ PEREZ
Teléfono: 638391876	Dirección de correo electrónico: alu0100907018@ull.edu.es

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

TOXINAS MICROBIANAS: APECTOS GENERALES Y USO POTENCIAL COMO AGENTES ANTITUMORALES

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

D./Dña. ÁNGEL M. GUTIÉRREZ NAVARRO	
Profesor/a del Departamento de MICROBIOLOGÍA Y BIOLOGÍA CELULAR	
y D./Dña.	
Profesor/a del Departamento de	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
Fdo. 	Fdo.:

La Laguna, a 29 de JUNIO de 2018

Firma del interesado/a



SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA SECCIÓN DE BIOLOGÍA

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
INTRODUCCIÓN	2
TIPOS DE TOXINAS	4
• Endotoxinas	4
• Exotoxinas	4
➤ Superantígenos	5
➤ Toxinas A-B	5
➤ Toxinas citolíticas	7
PRINCIPALES EXOTOXINAS	8
• Principales exotoxinas producidas por bacterias Gram positivas	9
➤ Toxina diftérica	9
➤ Neurotoxinas	10
❖ Neurotoxina botulínica	10
❖ Neurotoxina tetánica	11
➤ Toxinas de <i>Bacillus anthracis</i>	12
❖ Carbunco cutáneo	13
❖ Carbunco gastrointestinal	14
❖ Carbunco pulmonar o por inhalación	14
• Principales exotoxinas producidas por bacterias Gram negativas	14
➤ Toxina colérica	15
➤ Toxina de Shiga	16
PERSPECTIVAS DE USO DE LAS TOXINAS COMO AGENTES TERAPÉUTICOS ANTICANCEROSOS	18
• Utilización de toxinas nativas	19
➤ Toxina de <i>Clostridium difficile</i> (CdtB) y cáncer de mama	19
➤ Toxinas de <i>Bacillus anthracis</i> y melanoma	20
• Utilización de inmunotoxinas	21
➤ α -sarcina de <i>Aspergillus giganteus</i> y cáncer de colon	21
➤ Exotoxina A de <i>Pseudomonas</i> y tumores sanguíneos	22
CONCLUSIONES	24
BIBLIOGRAFÍA	26

RESUMEN

En el presente trabajo se hace una breve descripción de los diferentes tipos de toxinas y sus mecanismos de actuación, centrandó la atención en las principales exotoxinas sintetizadas por bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas. Entre las primeras se describen la toxina diftérica, las neurotoxinas botulínica y tetánica y las productoras del carbunco; entre las otras se destacan la toxina colérica, la de Shiga y la toxina A de *Pseudomonas*. En la segunda parte de la memoria, se describen los principales avances en el uso de las toxinas como agentes terapéuticos anticancerosos. No solo se comenta el uso de toxinas nativas, es decir, toxinas que se emplean para el tratamiento tal como son producidas por el microorganismo, sino también el de las inmunotoxinas, moléculas quiméricas conformadas por la parte activa de una toxina y por un fragmento de una inmunoglobulina que le aporta especificidad frente a la célula diana. La mayor ventaja que ofrecen las inmunotoxinas frente a las terapias actuales es que las primeras, atacan únicamente a las células cancerosas mientras que las últimas actúan sobre cualquier célula y son responsables de los graves efectos secundarios que tienen los tratamientos.

Palabras clave: toxinas, exotoxinas, cáncer, inmunotoxinas.

ABSTRACT

In the present work the various types of microbial toxins and mechanisms of action are briefly commented. The attention is focused on the main exotoxins synthesized by both Gram positive and Gram negative bacteria. The first ones include diphtheria toxin, botulism and tetanus neurotoxins and the producer of anthrax. Among those produced by Gram negative bacteria are cholera toxin, Shiga toxin and *Pseudomonas* A toxin. In the second part of this report, the main advances in the use of toxins as anti-cancer therapeutic agents are exposed. Not only the use of native toxins, that is, toxins that are used for the cancerous treatment as they are produced by the microorganisms, as well of immunotoxins are commented. The immunotoxins are chimeric proteins formed by the active part of a toxin and by a fragment of an immunoglobulin that provides specificity against the target cell. The greatest advantage of immunotoxins over the current therapies, is that the former attack only the cancer cells while the latter invade any cell and, because of that, there are responsible of the severe secondary effects of the treatments. Ç

Keywords: toxins, exotoxins, cancer, immunotoxins.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias son microorganismos que se adaptan a multitud de condiciones ambientales sin ver afectada su integridad. Esta capacidad les permite colonizar lugares u organismos donde cualquier otro ser vivo vería amenazada su existencia. De hecho, algunas de ellas son patógenas, es decir, poseen la información génica necesaria para colonizar tejidos vivos de otros organismos invadiéndolos y produciendo sustancias tóxicas que pueden dar lugar a enfermedades (Betancor et al., 2006).

Una vez que el hospedador se expone al patógeno, comienza la patogénesis con la adherencia, pudiendo unirse el microorganismo a la piel o a la mucosa, aunque muchas veces las infecciones microbianas se producen por la presencia de algún corte o herida que facilita la entrada del microorganismo patógeno en el hospedador. Seguidamente tiene lugar la invasión a través del tejido epitelial. Aunque la mayoría de los patógenos se ven obligados a penetrar en el epitelio para llevar a cabo la invasión, ciertos microorganismos son patógenos únicamente por el tipo de toxinas que producen y, por lo tanto, no necesitan llegar expresamente a los tejidos del hospedador. Cuando el patógeno accede a un tejido determinado, es capaz de multiplicarse y colonizarlo. Normalmente, el inóculo de partida es insuficiente para provocar daño al individuo infectado, con lo que el patógeno ha de encontrar los nutrientes y las condiciones ambientales adecuadas para lograr su crecimiento en el seno del hospedador. Factores como la temperatura, el pH y la disponibilidad o ausencia de oxígeno influirán en el crecimiento y desarrollo del agente infeccioso, aunque el factor más importante es la mencionada disponibilidad de nutrientes (Madigan et al., 2015).

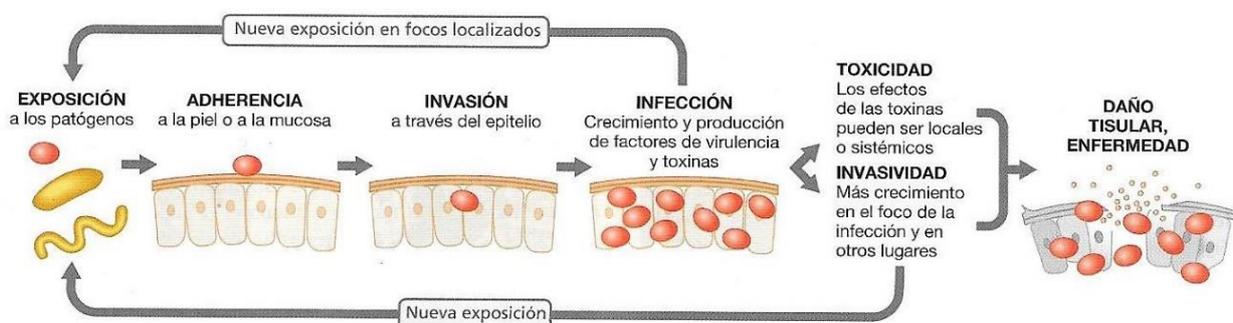


Figura 1. Patogénesis microbiana. Tras la exposición a un microorganismo patógeno, los procesos controlados por el patógeno pueden ocasionar una enfermedad (tomado de Madigan et al., 2015).

Habiendo sido colonizado el hospedador, comenzado el crecimiento del microbio, y, en consecuencia, su desarrollo, hemos de analizar el grado de virulencia de la especie huésped. Para ello, se lleva a cabo la cuantificación de la virulencia, que no es más que la capacidad relativa de un patógeno para causar la enfermedad. Dicha capacidad se puede estimar a partir de la dosis letal, que es la dosis a la que se puede matar al hospedador. Como vemos, la virulencia se expresa debido a la capacidad del patógeno de producir un daño en el cuerpo anfitrión por medio de la toxicidad y la invasividad. La invasividad hace referencia a la aptitud de un microorganismo patógeno para crecer en los tejidos del hospedador en cantidades tan elevadas que inhiben sus funciones. Por otro lado, la toxicidad es la capacidad que posee un microorganismo para provocar alguna enfermedad por medio de una toxina que inhibe las funciones del hospedador o mata a sus células (Madigan et al., 2015).

Cuando un microorganismo se adentra en un tejido corporal, las primeras células con las que se va a topar son los fagocitos. Si éstos logran destruir al invasor, no habrá daño del hospedador, pero si ocurre lo contrario, si el microorganismo pernicioso logra superar las defensas del organismo anfitrión, va a ser capaz de dañar las células de cuatro maneras distintas, aunque en este caso, solo nos centraremos en la que nos ocupa, por producir toxinas, transportadas por la linfa y la sangre que ocasionan daños en lugares muy alejados del sitio original de la invasión (Tortora et al., 2013).

Ya hemos indicado que la toxigenicidad es la capacidad que tiene un organismo para producir toxinas. Pero ¿qué son las toxinas? Son sustancias específicas venenosas producidas por determinados seres vivos que tienen la capacidad de provocarle cierto grado de daño al individuo donde se alojan (Prescott et al., 2009; Tortora et al., 2013). Por lo común, son capaces de alterar las vías de señalización celular del individuo hospedador provocando la inhibición de la respuesta inmune en las primeras etapas de la infección, además de ocasionar el colapso vascular en etapas más tardías (Moayeri et al., 2015).

Las intoxicaciones son enfermedades que se originan como consecuencia de la entrada en el huésped de una toxina específica (Prescott et al., 2009) y la toxemia hace referencia a la presencia de toxinas en la sangre (Tortora et al., 2013). Cuando éstas son transportadas por la sangre o por la linfa pueden dar lugar a multitud de intoxicaciones, muchas veces con efectos irreparables. Así, ciertas toxinas son capaces de provocar trastornos cardiovasculares, otras, casos de diarrea, otras, shock o fiebre. También las hay que pueden inhibir la síntesis proteica, destruir células y vasos sanguíneos, así como

causar espasmos al alterar el sistema nervioso. Existe alrededor de 220 toxinas bacterianas conocidas, siendo aproximadamente el 40% responsables de enfermedades que dañan las membranas de las células eucarióticas (Tortora et al., 2013).

TIPOS DE TOXINAS

Aunque también las hay producidas por hongos nos centraremos fundamentalmente en las de origen bacteriano. Básicamente, existen dos tipos de toxinas bacterianas: las endotoxinas y las exotoxinas.

• Endotoxinas

Muchas bacterias Gram negativas poseen un lipopolisacárido en la membrana externa de la pared celular que, en ocasiones, es tóxico para determinados hospedadores. Dicho lipopolisacárido recibe el nombre de endotoxina debido a que permanece ligada a la bacteria y solo cuando el microorganismo muere y se lisa, la toxina se libera. El componente tóxico del lipopolisacárido es la parte lipídica, el denominado lípido A, que se manifiesta responsable de todas las propiedades vinculadas con la endotoxicidad de los organismos Gram negativos (Prescott et al., 2009).

Todas las endotoxinas producen los mismos síntomas independientemente de la especie bacteriana de que se trate. Entre los síntomas o signos más comunes destacan fiebre, escalofríos, debilidad, dolor en general y, en ocasiones, shock e incluso la muerte. También son capaces de activar las proteínas de coagulación sanguínea, formando pequeños coágulos que pueden obstruir los capilares y, en consecuencia, provocar una disminución de la irrigación que conduce a la muerte de los tejidos (Tortora et al., 2013).

• Exotoxinas

La mayor parte de las toxinas bacterianas conocidas pertenecen a este tipo. Son proteínas solubles, termolábiles producidas en el interior de ciertas bacterias como parte de su crecimiento y metabolismo. Son secretadas en el propio medio o liberadas después de la lisis de la bacteria productora. Por su naturaleza enzimática, la mayor parte de ellas son muy dañinas incluso en bajas concentraciones; además son capaces de actuar más de una vez pudiendo desplazarse desde el foco de la infección, hacia otros tejidos o células donde expresan sus efectos tóxicos (Tortora et al., 2013; Prescott et al., 2009).

Las exotoxinas a su vez se dividen en tres categorías: **toxinas superantígenos** que estimulan grandes cantidades de células inmunes dando lugar a una inflamación generalizada junto con daño tisular, **toxinas A-B**, así denominadas por estar formadas por dos subunidades, A y B, siendo B el elemento que se suele unir a un receptor celular del hospedador y así permite que A atraviese la membrana de la célula diana logrando dañarla y, por último, **toxinas citolíticas** que provocan la degradación integral de la membrana citoplasmática provocando la lisis celular (Madigan et al., 2015).

Veamos con más detalle cada uno de estos grupos:

➤ **Superantígenos**

Los superantígenos son antígenos que originan una intensa respuesta inmunitaria actuando directamente sobre los receptores de la membrana plasmática de la célula hospedadora corrompiendo las vías de transducción de señales (Alouf y Popoff, 2006). Se trata de proteínas bacterianas que, a través de un conjunto de interacciones con distintas células del sistema inmunitario, estimulan la proliferación de los linfocitos T, que bajo su acción liberan grandes cantidades de citoquinas, pequeñas hormonas proteicas que regulan las respuestas inmunitarias y promueven la comunicación entre las células. Ocurre que, en condiciones de altas concentraciones de citoquinas, éstas van a trasladarse al torrente sanguíneo provocando una serie de síntomas siendo los más frecuentes náuseas, vómitos, diarreas, fiebre y, en los peores casos pueden ocasionar shock y en última instancia la muerte (Tortora et al., 2013).

➤ **Toxinas A-B**

Las toxinas A-B fueron las primeras toxinas estudiadas en profundidad y, de hecho, la mayor parte de las exotoxinas poseen una estructura de este tipo. Conocidas también muchas de ellas como toxinas inhibidoras de la síntesis proteica, constan de dos partes, A y B, que son polipéptidos, siendo la subunidad A el componente activo, la enzima, y B el componente fijo, el que interactúa con carbohidratos u otras moléculas presentes en las membranas de las células epiteliales del hospedador (Tortora et al., 2013; Di Bella et al., 2016).

Existen distintos patógenos productores de exotoxinas A-B inhibidoras de la síntesis proteica; por ejemplo, la toxina diftérica que es producida por *Corynebacterium diphtheriae* y cuyo mecanismo se recoge a continuación:

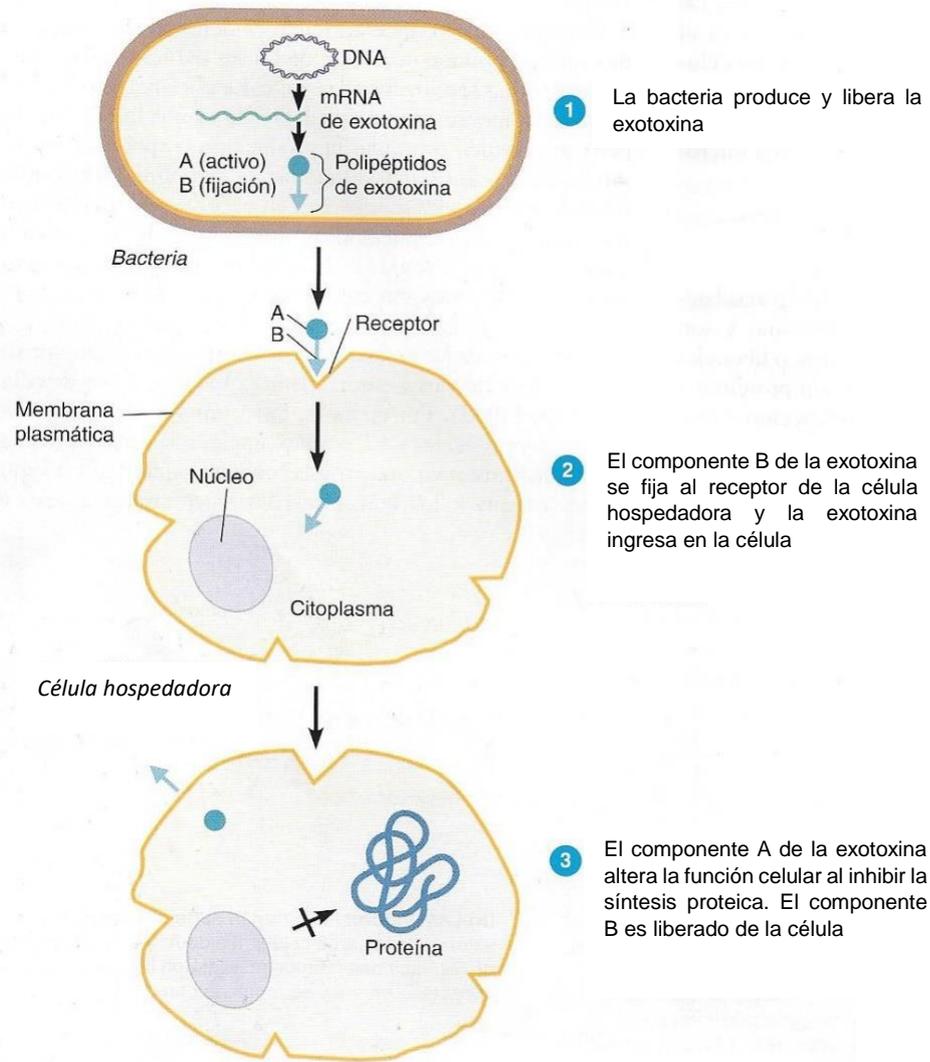


Figura 2. Mecanismo de acción de la toxina diftérica (tomado de Tortora et al., 2013 con elaboración propia).

- En primer lugar, la exotoxina A-B es liberada por *C. diphtheriae*.
- Seguidamente, la subunidad B se acopla a un receptor de la célula hospedadora, que es una proteína, el llamado receptor del factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina, EGFR (Madigan et al., 2015). Una vez se ha fijado el conjunto, la toxina A-B es transportada a través de la membrana plasmática hacia el interior del citoplasma de la célula diana.
- Dentro de la célula, las dos subunidades se separan, siendo la parte A la que va a inhibir la síntesis de proteínas y matar a la célula hospedadora, mientras que B va a ser liberada por la célula (Tortora et al., 2013).

➤ Toxinas citolíticas

Por último, las toxinas citolíticas, también conocidas como toxinas alteradoras de membrana, contribuyen a la virulencia destruyendo las células del hospedador, sobre todo a los fagocitos, y facilitando la salida de bacterias de los fagosomas (sacos ubicados dentro de los fagocitos) hacia el citoplasma de la célula (Tortora et al., 2013).

También las hay que interrumpen la bicapa lipídica de la membrana debido a la formación de poros de diferente tamaño y selectividad molecular (Bischofberger et al., 2009). Esta pérdida de la integridad de la membrana va a impedir la señalización celular (Cossart, 2011).

Existen diferentes ejemplos de toxinas citolíticas en función de las células que destruyan; es el caso de las leucocidinas, toxinas alteradoras de membrana que acaban con los leucocitos fagocíticos. Éstas son activas contra los macrófagos y la mayoría son producidas por estafilococos y estreptococos. Además de las leucocidinas, existen las hemolisinas, que como su propio nombre indica, alteran la membrana de los glóbulos rojos de la sangre por medio de canales proteicos. Estas dos estreptolisinas son capaces de causar la lisis no sólo de los eritrocitos y los leucocitos sino también de otras células del organismo (Tortora et al., 2013).

También son relevantes la toxina alfa de *Staphylococcus aureus* (Gouaux, 1998), la aerolisina de *Aeromonas hydrophila* y la toxina ClyA de *Escherichia coli* (Ludwig et al., 1999; Wallace et al., 2000; Morris y Fernández-Miyakama, 2009).

A modo de resumen, en la figura 3 se muestran esquemáticamente los tres tipos de exotoxinas bacterianas que acabamos de comentar.

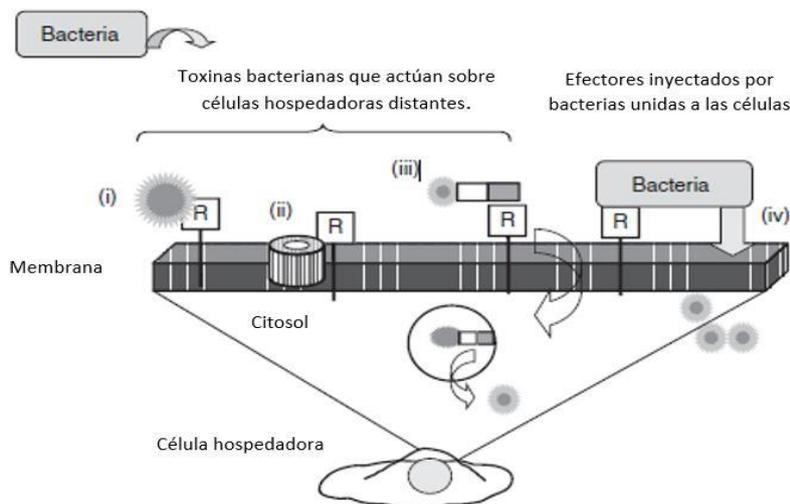


Figura 3. Clases de toxinas proteicas bacterianas. (i) Superantígenos; (ii) toxinas que se unen a la membrana plasmática de la célula hospedadora interrumpiendo la bicapa lipídica debido a la formación de poros o por la expresión de la actividad fosfolipasa; (iii) toxinas A-B; (iv) toxinas citolíticas (tomado de Lemichez y Barbieri, 2017 con elaboración propia).

Ahora que hemos acabado de explicar brevemente las diferencias entre endotoxinas y exotoxinas, ofrecemos un cuadro a modo de resumen para distinguir las características de cada una de ellas.

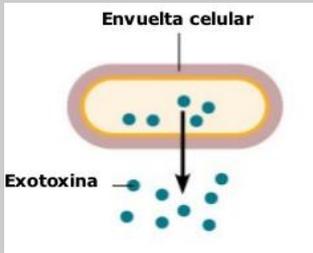
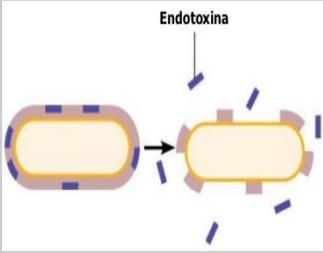
Propiedad	Exotoxina	Endotoxina
		
Fuente bacteriana	Principalmente bacterias Gram positivas	Bacterias Gram negativas
Relación con el microorganismo	Producto metabólico de la célula en crecimiento	Presente en los lipopolisacáridos de la membrana externa de la pared celular y liberada con la destrucción de la célula o durante la división celular
Composición química	Proteínas, en muchos casos, con dos subunidades [A-B]	Porción lipídica (lípidos A) de los lipopolisacáridos de la membrana externa
Efecto sobre el organismo	Afectan a funciones celulares, nervios o tracto gastrointestinal	Fiebre, debilidad, dolores y shock
Estabilidad al calor	Inestable, por general se destruye a 60-80°C	Estable, soporta la esterilización en autoclave
Toxicidad	Alta	Baja
Dosis letal	Pequeña	Alta
Enfermedades más comunes	Gangrena gaseosa, tétanos, botulismo, difteria, escarlatina	Fiebre tifoidea, infecciones urinarias y meningitis meningocócica

Tabla 1. Características generales de los dos tipos de toxinas bacterianas (tomado de Tortora et al., 2013 con elaboración propia).

PRINCIPALES EXOTOXINAS

Después de hacer una descripción general de los tipos de toxinas y sus mecanismos, nos centraremos en las exotoxinas, ya que, como ha quedado indicado la mayor parte de las toxinas bacterianas son de este tipo.

Las exotoxinas son sintetizadas por dos modelos básicos. En el primero, es un gen determinado (que puede ser de localización cromosómica, plasmídica o incluso formar parte del genoma de un fago), el que posee la información necesaria para llevar a cabo la síntesis de lo que vamos a denominar pretoxina, que mediante proteólisis va a dar lugar a la toxina activa. Este proceso proteolítico puede tener lugar tanto en el interior bacteriano como en el medio extracelular o en la célula hospedadora. En este modelo concreto de toxina, se produce un heterodímero con dos subunidades unidas covalentemente por medio de puentes disulfuro. Las exotoxinas más comunes que poseen un modelo de este tipo son la toxina diftérica, producida por *C. diphtheriae*, la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, la toxina del tétanos producida por *Clostridium tetani* y la toxina botulínica de *Clostridium botulinum* (García, 1995).

En el segundo modelo, la síntesis de la toxina está controlada por dos genes que constituyen un operón, cada uno de los cuales contiene la información para la síntesis de una de las subunidades. Éstas que se sintetizan independientemente, son secretadas al espacio periplásmico o al medio extracelular donde ocurre el ensamble de la toxina. A este tipo responden, por ejemplo, la toxina colérica de *Vibrio cholerae*, la toxina termolábil de *E.coli* o la toxina de Shiga (García, 1995).

• Principales exotoxinas producidas por bacterias Gram positivas

➤ Toxina diftérica

C. diphtheriae es una bacteria Gram positiva patógena para los seres humanos responsable de provocar la difteria, una enfermedad que se produce por acción de la toxina diftérica, codificada por el gen *tox* (Sing et al, 2011) y, siendo además una de las enfermedades con mayor mortalidad a nivel mundial (Jamal, 2017) aunque la existencia de vacunas ha reducido notablemente su incidencia.

La toxina diftérica inhibe la síntesis de proteínas de células eucarióticas (Madigan et al., 2015). Esta toxina es una sola cadena polipeptídica de 535 aminoácidos que consta de dos subunidades unidas por puentes disulfuro (Murphy, 1996).

Su mecanismo de síntesis parte de un gen que posee la información necesaria para llevar a cabo la síntesis de la pretoxina, la cual será procesada por proteólisis para provocar, posteriormente, la activación de la toxina (García, 1995). Uno de sus

componentes, la subunidad B, se une a una proteína de las células del hospedador, EGFR. Después de la unión, tiene lugar la mencionada escisión proteolítica que separa las subunidades A y B, provocando la entrada de la primera a través de la membrana plasmática. Una vez dentro de la célula, la subunidad A provoca la detención de la síntesis de proteínas debido a que se bloquea la transferencia de un aminoácido desde el ARNt a la cadena polipeptídica en formación ya que la toxina cataliza la transferencia de la mitad ADP ribosa desde el NAD⁺ al EF-2 inactivándolo (Madigan et al., 2015).

➤ Neurotoxinas

Las neurotoxinas son un tipo de exotoxina que actúa sobre el tejido nervioso destruyéndolo o impidiendo su normal funcionamiento (Diccionario Enciclopédico Vox 1., 2009). La toxina botulínica, al igual que la tetánica, actúan bloqueando la liberación de los neurotransmisores cuya función es el control muscular, aunque sus mecanismos de acción y sus síntomas son muy distintos.

❖ Neurotoxina botulínica

La neurotoxina botulínica impide que se transmitan los potenciales de acción en la unión neuromuscular de la unidad motora y a nivel preganglionar. La toxina evita la unión de la membrana presináptica con la membrana de la vesícula presináptica. Este mecanismo impide que la acetilcolina se libere al espacio sináptico produciendo en consecuencia, la conocida parálisis flácida del músculo o inhibiendo la función de la glándula exocrina correspondiente (Koussoulakos, 2009). Aparte de inhibir la liberación de la acetilcolina, se bloquea la secreción de neurotransmisores como glutamato, adrenalina o la sustancia P, involucrada en la percepción del dolor. (Koussoulakos, 2009; Madigan et al., 2015).

Si bien posee la capacidad de provocar graves daños, se emplea cada vez más para aplicaciones terapéuticas o con fines estéticos (Davies et al., 2018).

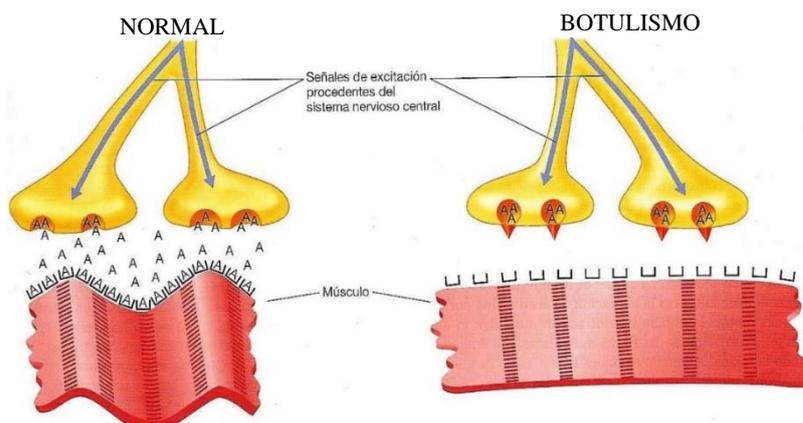


Figura 4. Mecanismo de acción de la toxina botulínica (tomado de Madigan et al., 2015).

❖ Neurotoxina tetánica

Clostridium tetani también produce una neurotoxina denominada tetanosespasmina que en este caso es codificada por un gen de localización plasmídica. Se sintetiza en la fase estacionaria de crecimiento y es liberada cuando la célula se lisa. Es concretamente una exotoxina A-B conformada por dos subunidades, una más ligera, también llamada cadena A, y una más pesada o cadena B, unidas por un enlace disulfuro y por fuerzas no covalentes y que se separan mediante una proteasa endógena en el momento en el que la célula libera la neurotoxina. La parte carboxilada de la cadena pesada se une a un receptor de la superficie en las propias membranas de las neuronas, y la cadena ligera se desplaza desde las terminaciones nerviosas hasta el sistema nervioso central. Las toxinas se transportan por medio de vesículas endosómicas desde el axón de la neurona hasta el soma de una neurona motora situada en la médula espinal. En este compartimento se acidifica el endosoma provocando un cambio conformacional en el extremo amino-terminal de la cadena pesada, haciendo posible con ello la inserción en la membrana endosómica y permitiendo la entrada de la cadena ligera en el citoplasma (Murray et al., 2017).

La neurotoxina tetánica bloquea la liberación de glicina sobre las neuronas motoras provocando la liberación de la acetilcolina y causando una contracción irreversible de los músculos acompañado de una parálisis espástica (Madigan et al., 2015).

La toxina se une de forma irreversible y, por lo tanto, la recuperación depende de que se formen nuevos terminales axonales (Murray et al., 2017).

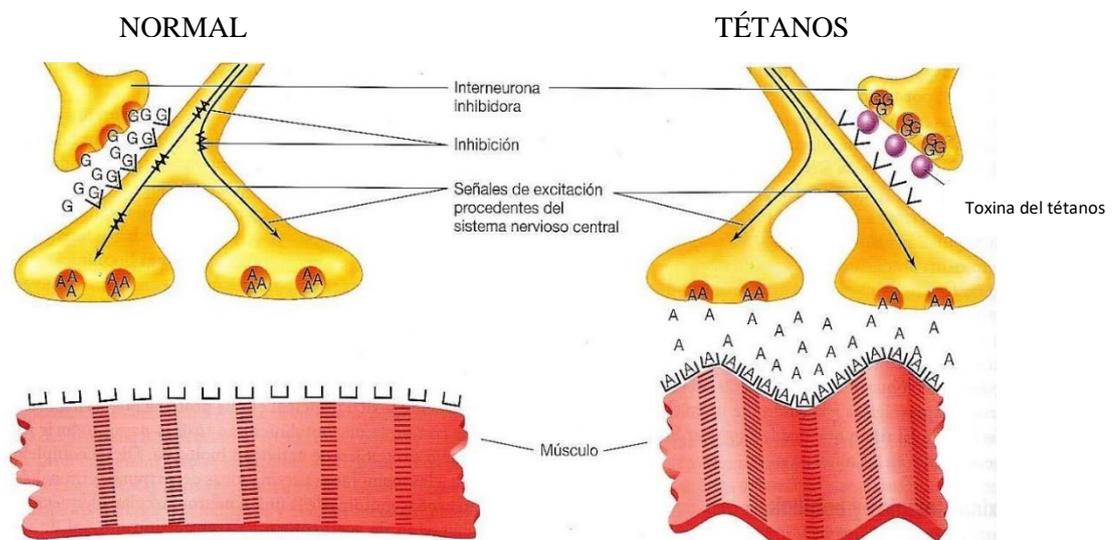


Figura 5. Mecanismo de acción de la toxina tetánica (tomado de Madigan et al., 2015).

➤ Toxinas de *Bacillus anthracis*

B. anthracis es una bacteria Gram positiva aerobia de gran tamaño y formadora de endosporas. Es el agente etiológico del carbunco denominado ántrax cuando afecta a humanos. Este bacilo infecta a su hospedador valiéndose de sus endosporas, que una vez dentro del organismo son detectadas por los macrófagos, en cuyo interior la espora germina y se convierte en una célula vegetativa. Éstas van a multiplicarse hasta que provocan la muerte del macrófago. Las bacterias pasan al torrente sanguíneo reproduciéndose rápidamente y segregando toxinas (Tortora et al., 2013).

Dos de los principales factores de virulencia de *B. anthracis* son dos exotoxinas, una de ellas es la toxina edemática (EdTx) que a su vez está constituida por dos elementos: el antígeno protector (PA) que provoca en el hospedador una respuesta inmune protectora frente a la bacteria y el factor edema (EF), que junto con el anterior incrementa los niveles de AMP cíclico (AMPc) provocando la aparición de un edema en el tejido, interfiriendo además en la fagocitosis llevada a cabo por los macrófagos. La otra es la toxina letal (LeTx), que surge de la combinación de PA y factor letal (LF), que actúa específicamente sobre los macrófagos provocando su lisis (Pavan et al., 2011).

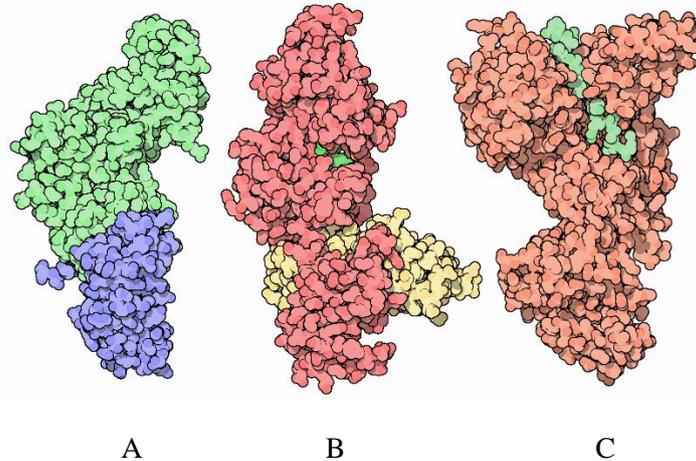


Figura 6. Componentes proteicos de las toxinas del carbunco o ántrax. A: antígeno protector; B: factor edema; C: factor letal (tomado de Goodsell D. Protein Data Bank, 2002).

Es importante destacar que, su alta tasa de mortalidad y su tardía detección, en muchas ocasiones es debida a que la cápsula que posee *B. anthracis* está compuesta por residuos de aminoácidos que, por algún motivo, no estimulan la protección por parte del sistema inmunitario, con lo cual, las bacterias una vez dentro del torrente sanguíneo, proliferan sin ningún tipo de control hasta alcanzar cantidades muy elevadas por mililitro,

provocando en consecuencia la muerte del organismo hospedador debida a un shock séptico (Tortora et al., 2013).

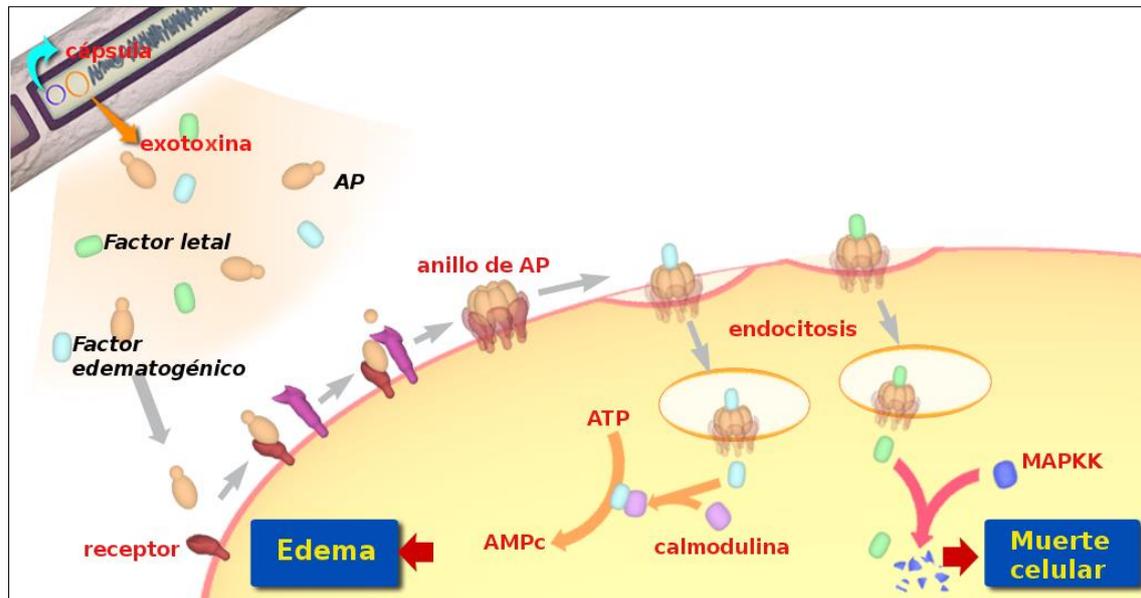


Figura 7. Modelo de acción de la toxina del ántrax.

Es una enfermedad que afecta en mayor medida al ganado bovino y ovino, que ingieren las endosporas que libera la bacteria en los pastos. Teniendo en cuenta lo anterior, es lógico pensar que los seres humanos que poseen un riesgo más elevado de contraer la infección son aquellas personas que están en contacto con animales, así como con sus pieles, lanas y otros productos de origen animal (Tortora et al., 2013).

En el ser humano existen tres tipos de manifestación del carbunco:

❖ Carbunco cutáneo

Se produce por la entrada de las endosporas de *B. anthracis* al organismo por cualquier lesión cutánea. Primero se forma una pápula, luego se desarrollan vesículas que se rompen y forman una úlcera cubierta por una costra negra. El patógeno no suele acceder al torrente sanguíneo, pero, en caso de que ingrese, la tasa de mortalidad puede llegar al 20% sin tratamiento antibiótico, pero con tratamiento la tasa de mortalidad se reduce a menos del 1%.

❖ **Carbunco gastrointestinal**

Se manifiesta cuando los alimentos no son correctamente cocinados y éstos tienen endosporas. Los síntomas son dolor abdominal, náuseas y diarrea sanguinolenta además de manifestaciones ulcerosas a lo largo de todo el tubo digestivo. Es una forma de carbunco con una tasa de mortalidad superior al 50%.

❖ **Carbunco pulmonar o por inhalación**

Es el tipo de carbunco más peligroso para los seres humanos porque las endosporas pueden acceder con mayor probabilidad al sistema circulatorio al ser inhaladas. Una vez que la bacteria entra al torrente sanguíneo y se multiplica, el carbunco o ántrax evoluciona en 2 o 3 días al shock séptico provocando la muerte del afectado. Los síntomas tempranos son fiebre, tos y dolor torácico; en esta fase la enfermedad puede ser detenida a tiempo empleando antibióticos, aunque a no ser que se tenga conciencia de exposición al patógeno, rara vez se administran. En esta forma de carbunco la tasa de mortalidad es extremadamente alta aproximándose al 100% (Tortora et al., 2013).

El uso de las endosporas de *B. anthracis* como arma biológica ha sido motivo de reflexión e investigación en la búsqueda de vacunas que actúen con la suficiente rapidez una vez que las endosporas entran en el organismo. El diagnóstico común del carbunco consiste en realizar un cultivo para identificar la bacteria, pero este es un procedimiento muy lento en la detección de episodios de bioterrorismo. Recientemente la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) ha comprobado que mediante un análisis de sangre se puede detectar los casos de carbunco pulmonar y cutáneo en aproximadamente una hora (Tortora et al., 2013).

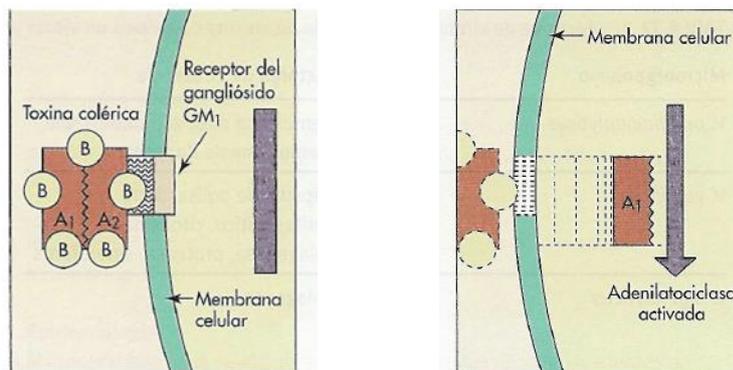
• **Principales exotoxinas producidas por bacterias Gram negativas.**

Aunque por lo dicho hasta ahora pueda deducirse que las exotoxinas sólo son producidas por bacterias Gram positivas, existen también muchos organismos Gram negativos productores de este tipo de toxinas. Así, la exotoxina A liberada por *Pseudomonas aeruginosa* tiene un mecanismo de acción muy semejante a la toxina diftérica. Tanto una como otra actúan sobre el factor de elongación 2 (EF-2) provocando la inhibición de la síntesis de proteínas (García, 1995), aunque recientes investigaciones

han descubierto que la exotoxina A puede ser neutralizada por el péptido neutrófilo humano 1 (HNP1) (Zou y de Leeuw, 2018).

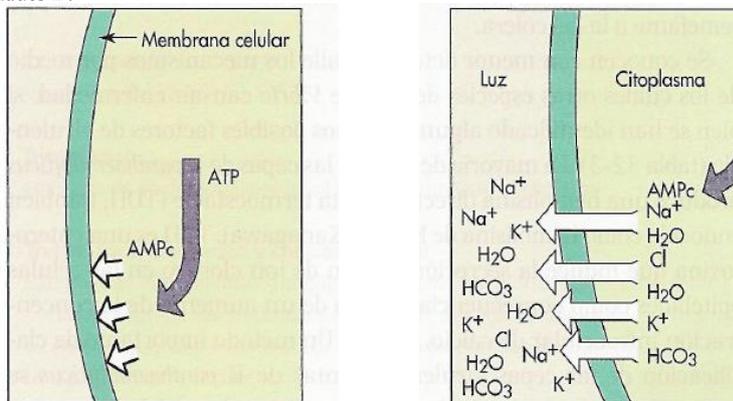
➤ Toxina colérica

Otra exotoxina de tipo A-B es el conocido colerágeno, la toxina del cólera, sintetizada por *Vibrio cholerae*, una bacteria Gram negativa con forma de coma y con un único flagelo polar que le confiere movimiento. De esta bacteria se han descrito varios serogrupos, pero únicamente dos de ellos, los serogrupos O1 y O139, pueden sintetizar la toxina del cólera (Prescott et al., 2009). El anillo conformado por cinco subunidades B idénticas de la toxina colérica se adhiere a los receptores del gangliósido GM₁ en la superficie de las células epiteliales intestinales (Murray et al., 2017) lugar donde va a ser liberada la toxina. A continuación, la subunidad A del complejo A-B, atraviesa las células epiteliales del intestino activando a la enzima adenilato ciclasa por medio de la adición de un grupo ADP-ribosilo, originando así la hipersecreción de agua y electrolitos. Dicho mecanismo es similar al que acontece en el caso de la toxina diftérica.



La toxina se une al gangliósido GM₁ de la membrana a través de la unión de las subunidades B.

La porción activa (A₁) de la subunidad A entra en la célula y activa la adenilato ciclasa.



Esta actividad da lugar a la acumulación de AMP cíclico (AMPc) a lo largo de la membrana.

El AMPc produce la secreción activa de Na⁺, Cl⁻, K⁺, HCO₃⁻ y H₂O desde la célula hasta la luz intestinal.

Figura 8. Mecanismo de acción de la toxina colérica (tomado de Murray et al., 2007 con elaboración propia).

Las personas que enferman por la infección sufren una pérdida importante de líquidos y electrolitos que se manifiesta con diarrea acuosa y vómitos que, en los casos más graves, puede evolucionar a deshidratación severa, acidosis metabólica, hipopotasemia y shock hipovolémico; de hecho, un paciente que padezca la enfermedad puede perder hasta un litro de líquido por hora en el momento de máxima actividad. Con esta información, se podría pensar que, al eliminar tal cantidad de líquido, el organismo expulsaría la bacteria, pero ello no es así porque *V.cholerae* es capaz de adherirse a la capa de células mucosas existentes, haciendo más difícil su salida del organismo hospedador. El cólera se propaga por medio del agua y de la comida contaminada, llegando al estómago, donde los jugos gástricos suponen una barrera para el microorganismo siempre y cuando las cantidades consumidas no superen cierto número de bacterias, que en este caso se estima en más de 10^8 microorganismos patógenos entre 24 y 72 horas, que es el periodo de incubación de la enfermedad (Murray et al., 2017).

➤ **Toxina de Shiga**

La toxina de Shiga es una exotoxina A-B termolábil (Sxt) producida por el bacilo anaerobio facultativo Gram negativo denominado *Shigella dysenteriae*, una bacteria residente del tubo digestivo de los seres humanos y simios. Está muy estrechamente relacionada con la toxina producida por algunas estirpes patógenas de *Escherichia coli*; de hecho, el principal factor de virulencia de las cepas enterohemorrágicas de *E.coli* (EHEC) es la toxina de Shiga, y, por ello, han pasado a denominarse *E.coli* productoras de toxina de Shiga (STEC) (Tortora et al., 2013; Prescott et al., 2009).

S. dysenteriae es una bacteria que se transmite por vía fecal-oral a través de los alimentos, heces, dedos y moscas, situándose su dosis infectiva entre 10 y 100 bacterias, con un periodo de incubación de uno a tres días. *S. dysenteriae* no se suele ver muy afectada por el pH gástrico optimizando su asentamiento y proliferación en el intestino delgado, aunque el máximo desarrollo de la enfermedad tiene lugar en el intestino grueso donde ataca a las células epiteliales (Tortora et al., 2013). Una vez localizadas en el intestino grueso, la propia bacteria induce su fagocitosis provocando la alteración de la membrana del fagosoma y liberándose en el citoplasma de la célula diana para reproducirse (Prescott et al., 2009). La bacteria se multiplica hasta dispersarse por las células vecinas y libera finalmente la toxina que acaba con la integridad de los tejidos (Tortora et al., 2013).

Esta bacteria Gram negativa, es una de las cuatro especies del género *Shigella* capaz de provocar la shigelosis o disentería bacilar, una forma grave de diarrea que provoca una reacción inflamatoria aguda del tracto intestinal, concretamente en la mucosa con la peculiaridad de que los macrófagos no son capaces de destruir la bacteria sino que, por el contrario, es la propia bacteria la que los destruye (Tortora et al., 2013). La enfermedad puede llegar a ser mortal a edades tempranas, aunque el tratamiento puede limitarse a la reposición de líquidos y electrolitos (Prescott et al., 2009), en los casos muy graves puede utilizarse ampicilina y tetraciclina (Gutiérrez-Navarro A.M., comunicación personal).

La estructura de la toxina de Shiga comprende una proteína A rodeada por cinco monómeros de la proteína B. Éstos últimos se adhieren a las células vasculares del hospedador para introducir toda la toxina en el citoplasma de la célula diana. A continuación, la subunidad A se desprende de las cinco subunidades B uniéndose a los ribosomas de la célula e inhibiendo la síntesis proteica y, en consecuencia, provocando la muerte celular.

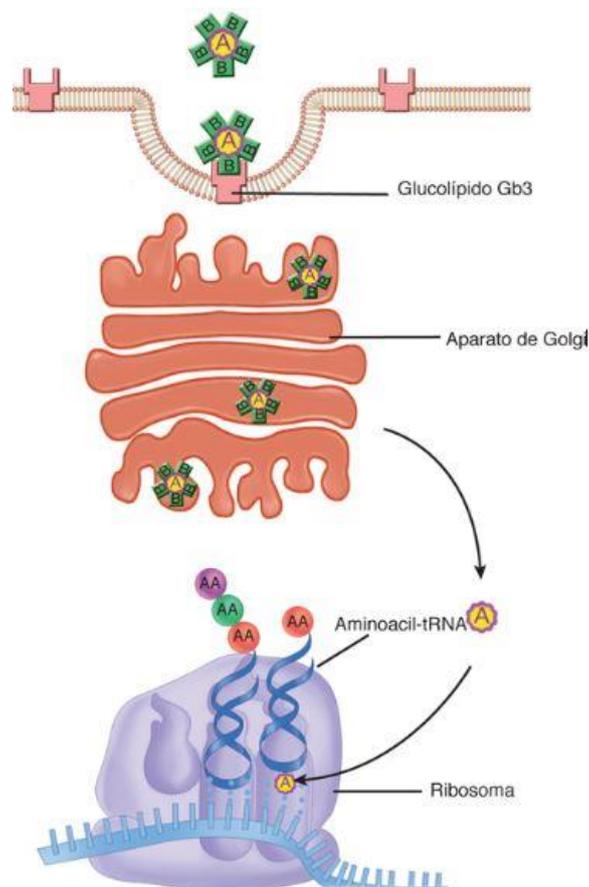


Figura 9. Mecanismo de acción de la toxina Shiga (tomado de Ryan y Ray, 2017).

PERSPECTIVAS DE USO DE LAS TOXINAS COMO AGENTES TERAPÉUTICOS ANTICANCEROSOS

El cáncer es una de las enfermedades en auge del siglo XXI; es una de las que causa mayor número de fallecimientos, no sólo por ser muy común, sino también por su detección tardía y por la asociación de sus síntomas con otros relacionados con enfermedades de menor gravedad (Pineda-Castellanos y Núñez-Valdez, 2011).

Desde el cáncer de piel, pasando por el cáncer del sistema linfático o linfoma, hasta llegar al cáncer de huesos, prácticamente todos los tejidos del cuerpo humano son susceptibles de padecer cáncer.

Algunos tratamientos para eliminarlo consisten en extirpar tumores malignos por medio de cirugía dependiendo del estadio en el que se encuentre el tumor o, si es detectado con mayor margen de tiempo, se puede tratar con distintas terapias, ya sea quimioterapia o distintas formas de radioterapia (ortovoltaje, teleterapia o braquiterapia) (Cárdenas, 2005).

Desde que las sustancias químicas citotóxicas fueron empleadas por primera vez en pacientes con cáncer, los oncólogos han investigado en la búsqueda de mejorar la eficacia de la terapia antitumoral con dichos fármacos citotóxicos (Lambert y Berkenblit, 2018).

Además de los tratamientos mencionados, desde hace ya más de un siglo se conoce la capacidad de algunas especies bacterianas de actuar sobre diferentes tipos de cáncer logrando una regresión del tumor (Bernardes et al., 2010). Recientemente, han aparecido evidencias que ponen de manifiesto que ciertas proteínas bacterianas y péptidos truncados, son de gran utilidad frente a diversas células tumorales ya sea *in vivo* o *in vitro* (Kwan et al., 2009).

Investigaciones llevadas a cabo y publicadas recientemente, ponen de manifiesto la eficacia de las toxinas bacterianas frente a distintas formas de cáncer (Lemichez y Barbieri, 2017). Hay dos formas básicas de utilización de las toxinas microbianas como agentes anticancerosos: la utilización de toxinas nativas o la preparación de inmunotoxinas, moléculas quiméricas formadas por la parte activa de una toxina y un fragmento de una inmunoglobulina que le confiere especificidad frente a la célula diana (Kreitman, 2001; Pastan et al., 2007; Dougan y Dranoff, 2009). En un principio, se preparaban uniendo la toxina a un anticuerpo monoclonal completo, pero, debido a la mayor facilidad de acceder a tumores sólidos de moléculas más pequeñas, pronto se

investigó la posibilidad de utilizar las toxinas unidas sólo a una parte de los anticuerpos que suele ser una de las cadenas de la región variable (*single.chain variable fragment*, scFv) (Li et al., 2004; Madhumati y Verma, 2012; Sapra y Shor, 2013).

- **Utilización de toxinas nativas**
 - **Toxina de *Clostridium difficile* (CdtB) y cáncer de mama**

Uno de los cánceres más extendidos en el mundo occidental es el cáncer de mama, que se caracteriza por su alta mortalidad e incidencia (Ferlay et al., 2012; Alinejad et al., 2017) y, aunque la terapia ha mejorado significativamente en los últimos años y ha logrado un incremento en la supervivencia de los pacientes, hay algunos tipos de cáncer mamario que resisten a la terapia (EBCTGC, 2005). En estos casos se ha investigado la posibilidad de utilizar toxinas bacterianas para provocar la muerte de las células cancerosas.

Sin ir más lejos, investigaciones realizadas este año 2018, han puesto de manifiesto que la toxina B producida por la bacteria *C. difficile* (CdtB), es capaz de inhibir el crecimiento tumoral e inducir la apoptosis de las células cancerosas en el caso del cáncer de mama (Zhang et al. 2018).

C. difficile es un bacilo anaerobio estricto Gram positivo formador de esporas y unas de las principales causas de la diarrea asociada a la administración de antibióticos (Hernández-Rocha et al., 2012).

CdtB es una toxina que promueve la producción de quimiocinas y citoquinas por las células diana siendo también capaz de inducir trastornos inflamatorios (Bobo et al., 2013). Por otro lado, CdtB actúa como un factor de virulencia citotóxico inhibiendo la proliferación celular (Voth y Ballard, 2005; Huang et al., 2014) y acabando con líneas celulares mamarias ya sea por necrosis (Farrow et al, 2013) o por apoptosis (Huelsenbeck et al., 2007). MDA-MB-231 es una línea celular de carcinoma de mama con gran cantidad de receptores (Martínez-Carpio et al., 1999), por lo que es una de las más utilizadas en investigaciones experimentales *in vitro* del cáncer de mama (Amaral et al., 2018).

Para verificar la efectividad de la proteína recombinante de la toxina B de *C. difficile* (rcdtB), los autores clonaron el gen de la toxina en *Bacillus megaterium*, obteniendo la toxina recombinante (rcdtB) y trataron con ella células MDA-MB-231 a concentraciones

crecientes comprendidas entre 50 y 400 ng/ml demostrando que las células quedaban dañadas y su crecimiento, así como su capacidad migratoria eran inhibidos significativamente; además, cuando el tratamiento se prolongaba desde 24 a 72 horas, buena parte de las células experimentaban la muerte por apoptosis.

Para efectuar ensayos *in vivo*, se utilizaron ratones a los que se indujo el tumor mediante la inyección subcutánea de las células MDA-MB-231 (2×10^5) y luego fueron divididos en dos grupos de diez ratones cada uno. Uno de estos grupos fue utilizado como control y el otro fue tratado con rcdtB a la concentración de 400 ng/ml. Los resultados mostraban que la toxina inhibía el crecimiento y provocaba la disminución del volumen del tumor en los ratones tratados, no sólo porque causaba la apoptosis de las células del tumor, sino también porque desencadenaba respuestas inflamatorias contra ellas. Así pues, las propiedades antitumorales de la toxina de *C. difficile* permiten considerarla como una estrategia prometedora en la lucha contra este tipo de cáncer (Zhang et al., 2018).

➤ **Toxinas de *Bacillus anthracis* y melanoma**

Anteriormente hablamos sobre *B. anthracis* y comentamos el mecanismo de acción de las toxinas que produce. Experimentos publicados en el año 2008, han demostrado que ambas toxinas tienen actividad antitumoral en melanoma tanto *in vivo* como *in vitro* (Rouleau et al., 2008; Pineda-Castellanos y Núñez-Valdez, 2011).

Concretamente LeTx mostró actividad antitumoral en melanoma; las líneas celulares de este tipo de cáncer tenían una sensibilidad superior a la media para dicha toxina, mostrando un beneficio terapéutico potencial en posteriores investigaciones. Aunque estudios previos habían puesto de manifiesto que LeTx era efectiva como toxina reductora del tamaño del tumor en este tipo de cáncer de piel, la primera evidencia de actividad antitumoral de LeTx fue vista en modelos constituidos por las líneas celulares de fibroblastos NIH 3T3 (Alabi et al., 2013) transformadas por transfección del gen *ras*, que es un oncogén identificado inicialmente en el virus del sarcoma de rata y posteriormente en humanos en los que se ha encontrado que las células tumorales contienen alelos mutados de dicho gen (Sato et al., 1992). Una vez comprobada su acción sobre células transformadas en cultivo, se procedió a provocar la aparición de nódulos tumorales en ratones mediante su inoculación subcutánea (10^5 células en 100 microlitros) en ratones timectomizados. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de entre 5 y 7 mm se les

administró LeTx diariamente durante cinco días mediante inyección intratumoral local, observándose un retraso en el crecimiento de los nódulos además de una neovascularización disminuida en comparación con los controles (Duesbery et al., 2001)

Otra línea de investigación comprobó, basada en la capacidad de LeTx de inhibir las vías de señalización de la protein kinasa activada por mitógeno (MAPK), que cuando la toxina es administrada a melanocitos normales bloquea el ciclo celular en G1, pero las células no sufren apoptosis. Sin embargo, el tratamiento del melanoma humano en xenoinjertos en ratones timentomizados provoca una regresión significativa e incluso total del tumor, lo que sugiere que la inhibición de la mencionada vía de señalización puede ser una estrategia útil en el tratamiento del melanoma (Koo et al., 2002).

Estudios más recientes publicados en el año 2006 demostraron también la presencia de actividad antitumoral sistémica por inyección intraperitoneal de LeTx en ratones en el modelo de xenoinjerto de melanoma humano SK-MEL-28 (Abi-Habib et al., 2006).

En referencia a todo lo mencionado anteriormente, los datos *in vitro* sugieren que LeTx puede tener amplias indicaciones terapéuticas en el cáncer y los estudios *in vivo* demuestran que LeTx tiene eficacia sistémica en el neuroblastoma y el melanoma (Rouleau et al., 2008) por lo que se sigue indagando en este terreno para tratar por medio de toxinas microbianas, los diferentes tipos de cáncer de piel.

- **Utilización de inmunotoxinas**

Como ya se ha indicado, las inmunotoxinas son agentes citotóxicos compuestos por un anticuerpo y una toxina (Pastan y FitzGerald, 1991). El anticuerpo dirige la toxina a una célula diana y provoca la muerte celular. A continuación, se comentarán algunos cánceres que han sido tratados con dichas moléculas.

- ❖ **α -sarcina de *Aspergillus giganteus* y cáncer de colon**

Un ejemplo de cáncer que ha sido tratado con inmunotoxinas es el cáncer de colon, cuyas células, tanto del tumor primario como de los metastásicos expresan en sus membranas un antígeno, la glicoproteína A33 (Catimel et al., 1996; Ackerman et al., 2008) que es prácticamente inexistente en las células de otros tejidos, tumorales o no y, por ello es un conocido marcador de este tipo de cáncer. Además, muestra un alto grado de internalización después de la formación del complejo antígeno-anticuerpo (Carreras-

Sangrà et al., 2012) y por ambas características constituye una molécula ideal como diana para inmunotoxinas preparadas frente a él.

El tratamiento del cáncer de colon con inmunoterapia está teniendo relativo éxito con tres anticuerpos monoclonales que ya han sido probados para su uso clínico (Eng C, 2010; Sliwkowski y Mellman, 2013; Tol y Punt, 2010). Aunque debido a su diagnóstico tardío y a su rápida progresión metastásica, es importante la obtención de fármacos que sean más eficaces. Por ello, diversos estudios han indagado en el campo de las toxinas microbianas en la búsqueda de un tratamiento más eficiente a la hora de acabar con este tipo concreto de cáncer.

En este caso se trata de inmunotoxinas basadas en la α -sarcina producida por *Aspergillus giganteus* MDH 18894 (Mancheño, 1995; Liu et al., 2002) y perteneciente a la familia de las ribotoxinas, que son ribonucleasas extracelulares fúngicas citotóxicas (Lacadena et al., 2007; Olombrada et al., 2014). La alta especificidad de dicha molécula se debe a la capacidad que posee para hidrolizar un solo enlace fosfodiéster del ARN ribosómico (ARNr) de mayor tamaño situado en una región denominada lazo de sarcin-ricina (SRL) y que es importante a la hora de llevar a cabo la traducción de proteínas, por lo que, una escisión en dicho enlace inhibe la biosíntesis de proteínas y en consecuencia provoca la muerte celular (Olombrada, 2016).

Recientemente se ha reportado la primera inmunotoxina recombinante basada en la ribotoxina scFv contra las células cancerosas colorrectales mediante la fusión del anticuerpo monoclonal antiA33 (scFvA33) humanizado (Tomé-Amat, 2013) y α -sarcina (Carreras-Sangrà et al., 2012). Para ello, se elaboró una proteína de fusión monocatenaria que dirigía la actividad citolítica de α -sarcina a aquellas células que expresan el antígeno tumoral A33 y, demostrando que mata eficazmente a las células del tumor. La fusión del fragmento variable monocatenario (scFv) del anticuerpo monoclonal y α -sarcina fúngica da lugar a una inmunotoxina que muestra una alta toxicidad específica contra las líneas celulares tumorales positivas para GPA33 y que sostiene que scFvA33 α -sarcina es un buen candidato inmunoterapéutico contra carcinomas de colon positivos para GPA33 (Tomé-Amat, 2015).

❖ Exotoxina A de *Pseudomonas* y tumores sanguíneos

Las leucemias y linfomas afectan a un alto porcentaje de la población a nivel mundial. Se ha trabajado en la búsqueda de inmunotoxinas dirigidas contra receptores

sobre-expresados o antígenos de diferenciación para poder hacer frente a estos tumores malignos (Kreitman et al., 1993).

En este caso, el estudio se centra en el uso de la exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) el factor de virulencia más tóxico de *P. aeruginosa* (Michalska y Wolf, 2015). Se investigó la apoptosis de células relevantes para neoplasias hematológicas después de la exposición a las inmunotoxinas anti-Tac (Fv)-PE38 (LMB-2) y RFB4 (dsFv)-PE38.

En LMB-2, el fragmento variable (Fv) se dirige a la subunidad α del receptor de interleucina-2 (IL-2Ra) (Chaudhary et al., 1989) que normalmente se sobre-expresa en células malignas en algunos tipos de leucemias como por ejemplo la leucemia de células T del adulto (ATL), la histiocitosis de células de Langerhans (HCL) o en la leucemia linfocítica crónica (LLC). Lo que se demostró en este caso fue que LMB-2 y sus derivados son altamente citotóxicos frente a las células malignas periféricas de cáncer.

La inmunotoxina recombinante RFB4(dsFv)-PE38 cuenta con los dominios variables del anticuerpo monoclonal anti-CD22 (MoAb) RFB4 unido a un fragmento de PE (Wayne et al., 2010). En este caso Fv reconoce al antígeno CD22 (Mansfield et al., 1997; Kreitman et al., 1999) que forma parte de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF) y que se expresa en la superficie de muchas células B malignas, por ejemplo, en la leucemia linfocítica crónica (LLC), la histiocitosis de células de Langerhans (HCL) y el linfoma de Burkitt al igual que en los linfocitos B maduros normales. RFB4 (dsFv)-PE38 mostró gran actividad antitumoral en el modelo de ratón con linfoma humano (Mansfield et al., 1997; Kreitman et al., 1999).

Lo que ocurre es que la inmunotoxina activa la caspasa-3 provocando la muerte celular apoptótica en líneas celulares de pacientes con neoplasias malignas hematológicas. Aquellas inmunotoxinas que poseen PE inhiben la síntesis proteica provocando la muerte celular debido a la inactivación de EF-2 (Carroll y Collier, 1987) además de por la inducción de la apoptosis (Chang et al., 1989; Keppler-Hafkemeyer et al., 2000).

CONCLUSIONES

1. Existen muchos microorganismos, no solo bacterianos sino también fúngicos que producen toxinas activas frente a células animales y, por lo tanto, también humanas. En el caso de las bacterias, la capacidad de producir toxinas es uno de los factores de virulencia más relevantes.
2. La mayor parte de las bacterias Gram negativas contienen en su pared celular un componente, el lipopolisacárido, con actividad toxica. Dado que forma parte del cuerpo celular y solo se libera tras la lisis de la bacteria, recibe el nombre de endotoxina.
3. Muchas bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas son productoras de exotoxinas, así denominada porque son sintetizadas y excretadas al medio sin lisis celular.
4. Todas las exotoxinas son proteicas y las hay de tres tipos: citolíticas, toxinas A-B y superantígenos. Cada una de ellas tiene un mecanismo de acción concreto.
5. En los últimos años se viene investigando la posibilidad de uso de las exotoxinas como agentes terapéuticos anticancerosos.
6. La toxina de *Clostridium difficile* es prometedora en cuanto agente eficaz frente a determinados tipos de cáncer de mama.
7. Estudios preliminares, tanto *in vitro* como *in vivo* demuestran que las toxinas de *Bacillus anthracis* son eficaces en la lucha frente al melanoma y al neuroblastoma.
8. Las inmunotoxinas, proteínas quiméricas formadas por la parte activa de una toxina y el fragmento variable de un anticuerpo, son consideradas en la actualidad como potenciales agentes anticancerosos específicos.
9. Una inmunotoxina con la porción activa de la α -sarcina (toxina producida por *Aspergillus giganteus*) es eficaz frente a células tumorales GPA33 positivas, características del cáncer colorrectal.
10. LMB-2, una inmunotoxina con la parte activa de la toxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, es eficaz frente a tumores sanguíneos.

CONCLUSIONS

1. There are many microorganisms, not only bacterial but also fungi that produce active toxins against animal cells and, therefore, also human. In the case of bacteria, the ability to produce toxins is one of the most relevant virulence factors.
2. Most Gram-negative bacteria contain a component in their cell wall, lipopolysaccharide, with toxic activity. Since it is part of the cell body and is only released after the lysis of the bacteria, it is called endotoxin.
3. Many Gram positive as well as Gram negative bacteria are producers of exotoxins, so called because they are synthesized and excreted in the medium without cell lysis.
4. All exotoxins are protein and there are three types: cytolytic, toxins A-B and superantigens. Each of them has a concrete mechanism of action.
5. The possibility of using exotoxins as anti-cancer therapeutic agents has been investigated in recent years.
6. *Clostridium difficile* toxin is promising as an effective agent against certain types of breast cancer.
7. Preliminary studies, both in vitro and in vivo, show that the toxins of *Bacillus anthracis* are effective in the fight against melanoma and neuroblastoma.
8. Immunotoxins, chimeric proteins formed by the active part of a toxin and the variable fragment of an antibody, are currently considered as potential specific anticancer agents.
9. An immunotoxin with the active portion of α -sarcin (toxin produced by *Aspergillus giganteus*) is effective against GPA33 positive tumor cells, characteristic of colorectal cancer.
10. LMB-2, an immunotoxin with the active part of *Pseudomonas aeruginosa* toxin A, is effective against blood tumors.

BIBLIOGRAFÍA

- Abi-Habib R, Singh R, Leppla S, Greene J, Ding Y, Berghuis B, Duesberg N, Frankel A. 2006. Systemic anthrax lethal toxin therapy produces regressions of subcutaneous human melanoma tumors in athymic nude mice. *Clin Cancer Res.*, **12**: 7437-7443.
- Ackerman M.E., Chalaouni C, Schmidt M.M., Raman V.V., Ritter G, Old L.J., Mellman I, Wittrup K.D. 2008. A 33 antigen displays persistent surface expression. *Cancer Immunol Immunother.*, **57**: 1017-1027.
- Alabi O, Bakare A, Filippin-Monteiro F, Sierra J, Creczynski-Pasa T. 2013. Electronic waste leachate-mediated DNA fragmentation and cell death by apoptosis in mouse fibroblast (NIH/3T3) cell line. *Ecotox Environm Safety.*, **94**: 87-93.
- Alinejad V, Dolati S, Motallebnezhad M, Yousefi M. 2017. The role of IL17B-IL17RB signalling pathway in breast cancer. *Biomed Pharmacother.*, **88**: 795-803.
- Alouf J.E.; Popoff M.R. 2006. The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins. 3ª edición. Editorial A P. San Diego, California.
- Amaral I, Silva C, Correia-Branco A, Martel F. 2018. Effect of metformin on estrogen and progesterone receptor-positive (MCF-7) and triple-negative (MDA-MB-231) breast cancer cells. *Biomed Pharmacother.*, **102**: 94-101.
- Bernardes N, Seruca R, Chakrabarty A.M., Fialho A.M. 2010. Microbial-based therapy of cancer. *Bioeng Bugs.*, **3**:178-190.
- Betancor L, Gadea M.P., Flores K. 2006. Genética bacteriana. En: Temas de bacteriología y virología médica. 2ª edición. Universidad de la República. Facultad de Medicina. Uruguay: pp 59-65. Disponible en <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/GenéticaBacteriana.pdf>.
- Bischofberger M, González M.R., Van der Goot F.G. 2009. Membrane injury by pore-forming proteins. *Curr Opin Cell Biol.*, **21**: 589-595.
- Bobo L.D., El Feghaly R.E., Chen Y, Dubberke E.R., Han Z, Baker A.H., Li J, Burnham C.D., Haslam D.B. 2013. MAPK-activated protein kinase 2 contributes to *Clostridium difficile*-associated inflammation. *Infect Immun.*, **8**: 713-722.
- Cárdenas A. 2005. Cálculo de la matriz de dosis alrededor de una fuente de IR192 para braquiterapia utilizando el formalismo TG-43. Tesis digitales. Universidad Nacional de San Marcos, Lima.
- Carreras-Sangrà N, Tomé-Amat J, García-Ortega L, Batt C.A., Oñaderra M, Martínez del Pozo A, Gavilanes J.G., Lacadena J. 2012. Production and characterization of a colon cancer-specific immunotoxin based on the fungal ribotoxin α -sarcina. *Protein Eng Des Sel.*, **25**: 425-435.
- Carroll S; Collier R. 1987. Active site of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *J Biol Chem.*, **262**: 8707-8711.
- Catimel B, Ritter G, Welt S, Old L.J., Cohen L, Nerrie M.A., White S.J., Heath J.K., Demediuk B, Domagala T, Lee F.T., Scott A.M., Tu G.F., Ji H, Moritz R.L., Simpson R.J., Burgess A.W., Nice E.C. 1996. Purification and characterization of a novel restricted antigen expressed by normal and transformed human colonic epithelium. *J Biol Chem.*, **271**: 25664-25670.
- Chang M, Bramhall J, Graves S, Bonavida B, Wisnieski B. 1989. Internucleosomal DNA cleavage precedes diphtheria toxin-induced cytolysis. *J Biol Chem.*, **264**: 15261-15267.
- Chaudhary V.K., Queen C., Junghans R.P., Waldmann T.A., FitzGerald D.J., Pastan I. 1989. A recombinant immunotoxin consisting of 2 antibody variable domains fused to *Pseudomonas* exotoxin. *Nature (Lond.)*, **339**: 394-397.
- Cossart P. 2011. Illuminating the landscape of host pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci.*, **108**: 19484-19491.

- Davies J, Rees J, Liu S, Acharya K. 2018. High resolution crystal structures of *Clostridium botulinum* neurotoxin A3 and A4 binding domains. *J Struct Biol.*, **202**: 113-117.
- Di Bella S, Ascenzi P, Siarakas S, Petrosillo N, de Masi A. 2016. *Clostridium difficile* toxins A and B: insights into pathogenic properties and extraintestinal effects. *Toxins (Basel)*, **5**: 134-159.
- Dougan M; Dranoff G. 2009. Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol.*, **27**: 83-117.
- Duesbery N, Resau J, Webb C, Koochekpour S, Koo H, Leppla S, Vande Wonde G. 2001. Suppression of ras-mediated transformation and inhibition of tumor growth and angiogenesis by anthrax lethal factor, a proteolytic inhibitor of multiple MEK pathways. *Proc Natl Acad Sci.*, **98**: 4089-4094.
- Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group (EBCTCG). 2005. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *The Lancet*, **365**: 1687-1717.
- Eng C. 2010. The evolving role of monoclonal antibodies in colorectal cancer: early presumptions and impact on clinical trial development. *Oncologist.*, **15**: 73-84.
- Farrow M.A., Chumbler N.M., Lapierre L.A., Franklin J.L., Rutherford S.A., Goldering J.R., Lacy D.B. 2013. *Clostridium difficile* toxin B-induced necrosis is mediated by the host epithelial cell NADPH oxidase complex. *Proc Natl Acad Sci.*, **110**: 18674-18679.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin D.M., Forman D, Bray F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.*, **136**: E359-E386. doi:10.1002/ijc.29210.
- García F. 1995. Recientes avances sobre los mecanismos de acción de las exotoxinas bacterianas que actúan intracelularmente. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas (RCCM)*, **16**: 85-95.
- Gouaux E. 1998. Alpha-hemolysin from *Staphylococcus aureus*: an archetype of beta-barrel, channel-forming toxins. *J Struct Biol.*, **121**: 110-122.
- Hernández-Rocha C, Naour S, Álvarez-Lobos M, Paredes-Sabja D. 2012. Infecciones causadas por *Clostridium difficile*: una visión actualizada. *Rev Chil Infectol.*, **29**: 434-445.
- Huang T, Li S, Li G, Tian Y, Wang H, Shi L, Pérez-Cordón G, Mao L, Wang J, Feng H. 2014. Utility of *Clostridium difficile* toxin B for inducing anti-tumor immunity. *Plos one*, **9**: e110826.doi:10.1371/journal.pone.0110826.
- Huelsenbeck J, Dreger S, Gerhard R, Barth H, Just I, Genth H. 2007. Difference in the cytotoxic effects of toxin B from variant *Clostridium difficile* strain 1470. *Infect Immun.*, **75**: 801-809.
- Jamal S.B., Hassan S.S., Tiwari S, Viana M.V., Benevides L.J., Ullah A, Turjanski A.G., Barh D, Ghosh P, Costa D.A., Silva A, Röttger R, Baumbach J, Azevedo V.A.C. 2017. An integrative in-silico approach for therapeutic target identification in the human pathogen *Corynebacterium diphtheriae*. *Plos one*, **10**: e0186401.doi.org/10.1371/journal.pone.0186401.
- Keppler-Hafkemeyer A, Kreitman R, Pastan I. 2000. Apoptosis induced by immunotoxins used in the treatment of hematologic malignancies. *Int J Cancer.*, **87**: 86-94.
- Koo H, VanBrocklin M, McWilliams M, Leppla S, Duesbery N, Vande Wonde G. 2002. Apoptosis and melanogenesis in human melanoma cells induced by anthrax lethal factor inactivation of mitogen-activated protein kinase kinase. *Proc Natl Acad Sci.*, **99**: 3052-3057.
- Koussoulakos S. 2009. Botulinum neurotoxin: the ugly duckling. *Eur Neurol.*, **61**: 331-342.
- Kreitman, R. 2001. Toxin-labeled monoclonal antibodies. *Curr Pharm Biotechnol.*, **2**: 313-325.
- Kreitman R, Chaudhary V, Waldmann T, Hanchard B, Cranston B, FitzGerald D, Pastan I. 1993. Cytotoxic activities of recombinant immunotoxins composed of *Pseudomonas* toxin or diphtheria toxin toward lymphocytes from patients with adult T-cell leukemia. *Leukemia*, **7**: 553-562.

- Kreitman R, Wang Q, FitzGerald D, Pastan I. 1999. Complete regression of human β -cell lymphoma xenografts in mice treated with recombinant anti-CD22 immunotoxin RFB4 (dsFv)-PE38 at doses tolerated by cynomolgus monkeys. *Int J Cancer.*, **81**: 148-155.
- Kwan J.M., Fialho A.M., Kundu M, Thomas J, Soo Hong C, Das Gupta T.K., Chakrabarty A. 2009. Bacterial proteins as potential drugs in the treatment of leukemia. *Leuk Res.*, **33**: 1392-1399.
- Lacadena J, Álvarez-García E, Carreras-Sangrà N, Herrero-Galán E, Alegre-Cebollada J, García-Ortega L, Oñoderra M, Gavilanes J.G., Martínez del Pozo A. 2007. Fungal ribotoxins: molecular dissection of a family of natural killers. *FEMS Microbiol Rev.*, **31**: 212-237.
- Lambert J.M.; Berkenblit A. 2018. Antibody-drug conjugation for cancer treatment. *Annu Rev Med.*, **69**: 191-207.
- Lemichez E; Barbieri J.T. 2017. General aspects and recent advances on bacterial protein toxins. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, **3**: a013573. doi: 10.1101/cshperspect.
- Li Q, Verschraegen C.F., Mendoza J, Hassan R. 2004. Cytotoxic activity of the recombinant anti-mesothelin immunotoxin, SS1 (dsFv) PE38, towards tumor cell lines established from ascites of patients with peritoneal mesotheliomas. *Anticancer Res.*, **24**: 1327-1335.
- Liu R.S., Huang H, Yang Q, Liu W.Y. 2002. Purification of alpha-sarcin and antifungal protein from mold (*Aspergillus giganteus*) by chitin affinity chromatography. *Protein Expr Purif.*, **25**: 50-58.
- Ludwig A, Bauer S, Benz R, Bergmann B, Goebel W. 1999. Analysis of the SlyA-controlled expression, subcellular localization and pore-forming activity of a 34 kDa hemolysin (ClyA) from *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol.*, **31**: 557-567.
- Madhumati J; Verma R.S. 2012. Therapeutic targets and recent advances in protein immunotoxins. *Curr Opin Microbiol.*, **15**: 300-309.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A. 2015. Brock. Biología de los microorganismos. 14^a edición. Ed. Pearson Addison Wesley. Madrid.
- Mancheño J.M. 1995. Estudio del mecanismo de acción de la citotoxina α -sarcina. Tesis Doctoral. E-prints Complutense. Universidad Complutense de Madrid (UCM), Madrid.
- Mansfield E, Amlot P, Pastan I, FitzGerald D. 1997. Recombinant RFB4 immunotoxins exhibit potent cytotoxic activity for CD22-bearing cells and tumors. *Blood*, **90**: 2020-2026.
- Martínez-Carpio P.A., Mur C, Rosel P, Navarro M.A. 1999. Constitutive and regulated secretion of epidermal growth factor and transforming growth factor- β 1 in MDA-MB-231 breast cancer cell line in 11-day cultures. *Cell Signal.*, **11**: 753-757.
- Michalska M; Wolf P. 2015. *Pseudomonas* Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. *Front Microbiol.*, **6**: 963. doi: 10.3389/fmicb.2015.00963.
- Moayeri M, Leppla S.H., Vrentas C, Pomerantser A.P., Liu S. 2015. Anthrax pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.*, **69**: 185-208.
- Morris W.E.; Fernández-Miyakama M.E. 2009. Toxinas de *Clostridium perfringens*. *Rev Argent Microbiol.*, **41**: 251-260.
- Murphy J.R. 1996. Medical Microbiology. 4^a edición. Ed. Barron's. Texas, EEUU.
- Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi, G.S., Pfaller M.A. 2017. Microbiología Médica. 8^a edición. Ed. Elsevier. Polonia.
- Olombrada M. 2016. Las ribotoxinas fúngicas como herramientas biotecnológicas. Tesis Doctoral. E-prints Complutense. Universidad Complutense de Madrid (UCM), Madrid.

- Olombrada M, Rodríguez-Mateos M, Prieto D, Pla J, Remacha M, Martínez del Pozo A, Gavilanes J.G., Ballesta J.P., García-Ortega L. 2014. The acidic ribosomal stalk proteins are not required for the highly specific inactivation exerted by α -sarcina of the eukaryotic ribosome. *Biochemistry.*, **53**: 1545-1547.
- Pastan I; FitzGerald D. 1991. Recombinant toxins for cancer treatment. *Science*, **254**: 1173-1177.
- Pastan I, Hassan R, FitzGerald D.J., Kreitman R.J. 2007. Immunotoxin treatment of cancer. *Annu Rev Med.*, **58**: 221-237.
- Pavan M, Pettinari M, Cairó F, Pavan E, Cataldi A. 2011. *Bacillus anthracis*: una mirada molecular a un patógeno célebre. *Rev Argent Microbiol.*, **43**: 294-310.
- Pineda-Castellanos M.L.; Núñez-Valdez M.E. 2011. Uso de bacterias y sus productos en la terapia del cáncer. *Gaceta Mexicana de Oncología (GAMO)*, **10**: 366-372.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. 2009. *Microbiología*. 7ª edición. Ed. Mc Graw Hill. Corea.
- Rouleau C, Menon K, Boutin P, Guyre C, Yoshida H, Kataoka S, Perricone M, Shankara S, Frankel A, Duesbery N, Vande Wonde G, Biemann H, Teicher B. 2008. The systemic administration of lethal toxin achieves a growth delay of human melanoma and neuroblastoma xenografts: Assessment of receptor contribution. *Int J Oncology.*, **32**: 739-748.
- Sapra P; Shor B. 2013. Monoclonal antibody-based therapies in cancer: Advances and challenges. *Pharmacol Ther.*, **138**: 452-469.
- Satoh T, Nakafuku M, Kaziro Y. 1992. Function of Ras as a molecular switch in signal transduction. *J Biol Chem.*, **267**: 24149-24152.
- Sing A, Berger A, Schneider-Brachert W, Holzmann T, Reischl U. 2011. Rapid detection and molecular differentiation of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains by lightcycler PCR. *J Clin Microbiol.*, **49**: 2485-2489.
- Sliwkowski M.X.; Mellman I. 2013. Antibody therapeutics in cancer. *Science*, **341**: 1192-1198.
- Tol M.D.; Punt C.D.J. 2010. Monoclonal antibodies in the treatment of metastatic colorectal cancer: A review. *Clin Ther.*, **32**: 437-453.
- Tomé-Amat J. 2013. Inmunotoxinas antitumorales basadas en ribonucleasas extracelulares: Tras los pasos de Paul Ehrlich. Tesis Doctoral. E-prints Complutense. Universidad Complutense de Madrid (UCM), Madrid.
- Tomé-Amat J, Olombrada M, Ruiz de la Herrán J, Pérez-Gómez E, Andradás C, Sánchez C, Martínez del Pozo A, Gavilanes J, Lacadena J. 2015. Efficient *in vivo* antitumor effect of an immunotoxin based on ribotoxin α -sarcina in nude mice bearing human colorectal cancer xenografts. *SpringerPlus.*, **4**: 168-178.
- Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. 2013. *Introducción a la microbiología*. 9ª edición. Ed. Médica Panamericana. China.
- Voth D.E.; Ballard J.D. 2005. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev.*, **18**: 247-263.
- Wallace A.J., Stillman T.J., Atkins A, Jamieson S.J., Bullough P.A, Green J, Artymiuk P.J. 2000. *E. coli* hemolysin E (Hly E, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy. *Cell*, **100**: 265-276.
- Wayne A, Kreitman R, Findley H, Lew G, Delbrook C, Steinberg S, Stetler M, FitzGerald D, Pastan I. 2010. Anti-CD22 immunotoxin RFB4 (dsFv)-PE38 (BL22) for CD22-positive hematologic malignancies of childhood: preclinical studies and phase I clinical trial. *Clin Can Res.*, **16**: 1894-1903.
- Zhang Y, Li Y, Hongli L, Chen W, Liu W. 2018. *Clostridium difficile* toxin B recombinant protein inhibits tumor growth and induces apoptosis through inhibiting Bcl-2 expression, triggering inflammatory

responses and activating C-erbB and Cox-2 expression in breast cancer mouse model. *Biomed Pharmacother.*, **101**: 391-398.

- Zou G; de Leeuw E. 2018. Neutralization of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A by human neutrophil peptide 1. *Biochem Biophys Res Commun.*, **501**: 454-457.