

EFECTO CITOTOXICO DE LA TOXINA SHIGA TIPO 2 Y SU SUBUNIDAD B EN CELULAS EPITELIALES TUBULARES RENALES HUMANAS EN CULTIVO*

VIRGINIA PISTONE CREYDT, PABLO NUÑEZ, ELSA ZOTTA, CRISTINA IBARRA

Laboratorio de Fisiopatogenia, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Resumen *Escherichia coli* enterohemorrágica productora de toxina Shiga (Stx) causa diarrea acuosa, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH). En Argentina, el SUH es la principal causa de insuficiencia renal en niños. El objetivo de este trabajo fue estudiar la toxicidad de Stx tipo 2 (Stx2) y su subunidad B (Stx2B) en células epiteliales tubulares renales humanas (CERH), en presencia y ausencia de factores inflamatorios. Los efectos citotóxicos se evaluaron como alteración de la funcionalidad del epitelio; daños histológicos; viabilidad celular; síntesis de proteínas y apoptosis celular. Los resultados muestran que Stx2 regula el pasaje de agua a través de CERH a tiempos menores de 1h de incubación. A tiempos mayores, hasta 72 hs, el estudio de la morfología, la viabilidad, la síntesis de proteínas y la apoptosis demostró que las CERH fueron sensibles a la acción citotóxica de Stx2 y Stx2B de una manera dosis y tiempo dependiente. Estos efectos fueron potenciados por lipopolisacáridos bacterianos (LPS), IL-1 β , y butirato.

Palabras clave: toxina Shiga, síndrome urémico hemolítico, insuficiencia renal

Abstract *Cytotoxic effect of Shiga toxin type 2 and its B subunit on human renal tubular epithelial cell cultures.* Shiga toxin (Stx)-producing *E.coli* causing watery diarrhea, hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome (HUS). In Argentina, HUS is the most common cause of acute renal failure in children. The purpose of the present study was to examine the cytotoxicity of Stx type 2 (Stx2) and its B subunit (Stx2B) on human renal tubular epithelial cells (HRTEC), in the presence and absence of inflammatory factors. Cytotoxic effects were assessed in terms of functionality of the epithelium, histological damage, cell viability, protein synthesis and cellular apoptosis. Results show that Stx2 regulates the passage of water through the HRTEC within an incubation period of 1h. Within longer periods, up to 72 hours, the study of morphology, viability, protein synthesis and apoptosis shows that HRTEC were sensitive to the cytotoxic action of Stx2 and Stx2B in a dose- and time-dependent manner. These effects were potentiated by lipopolysaccharides (LPS), IL-1 β , and butyrate.

Key words: Shiga toxin, hemolytic uremic syndrome, renal failure

En Argentina, el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es endémico y es la principal causa pediátrica de insuficiencia renal aguda¹ y la segunda de insuficiencia renal crónica, siendo responsable del 20% de los trasplantes en niños y adolescentes². Cada año se producen aproximadamente 400 nuevos casos de SUH, registrándose desde 1965 hasta el presente más de 7 000 casos³, con una incidencia anual de 11.5 casos por cada 100 000 niños menores de 5 años. Hasta el presente no existe un tratamiento específico para esta enfermedad y el uso de antibióticos en niños infectados aumenta el riesgo de SUH⁴.

Un hallazgo común en estos pacientes es la destrucción de las células endoteliales de los pequeños vasos del colon, riñón y sistema nervioso central. Como esos órganos se encuentran alejados del tracto gastrointestinal se postula que el daño endotelial es una consecuencia directa de la acción de la toxina Shiga tipo 1 (Stx1) y tipo 2 (Stx2) o sus variantes que, liberadas por *Escherichia coli* enterohemorrágica productora de toxina Shiga (STEC), translocan la barrera intestinal y ganan acceso a la circulación sistémica.

Stx1 y Stx2 están constituidas por una subunidad A y cinco monómeros de subunidad B que forman una estructura pentamérica responsable de la unión de la toxina a las células del huésped a través del receptor globotriaosilceramida (Gb3). Aun en ausencia de subunidad A, las subunidades B forman un pentámero que se une al receptor Gb3⁵. Una vez que la toxina se une al receptor, se internaliza hacia los endosomas siguiendo un transporte de sentido contrario al que utilizan

* Este trabajo fue distinguido con el Premio Cherny en la reunión anual de la SAIC (Sociedad Argentina de Investigación Clínica) en Mar del Plata, noviembre 2004.

Dirección postal: Dra. Cristina Ibarra, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA, Paraguay 2155, 1121 Buenos Aires, Argentina
e-mail: ibarra@fmed.uba.ar

las proteínas secretorias⁶. En el interior de la célula, la subunidad A inhibe la síntesis de proteínas por inactivación de la subunidad ribosomal 60S⁵ y la subunidad B puede estimular la apoptosis celular^{7,8}.

Numerosos trabajos describen la presencia de Gb3 en el epitelio tubular renal, la unión de Stx, su internalización y la producción de citoquinas^{7,9}. También se informó un aumento de factores inflamatorios en suero y orina de pacientes con SUH¹⁰. En estudios de tejidos obtenidos de pacientes con SUH y en modelos *in vitro*, se demostró la estimulación de apoptosis en células de la corteza renal humana, sugiriendo que la toxina puede iniciar la muerte celular programada de estas células por diferentes mecanismos¹⁰⁻¹².

Recientemente hemos observado que la subunidad B de Stx2 (Stx2B) inhibe la absorción de agua en la mucosa colónica humana *in vitro* y produce acumulación de fluido en fragmentos de colon ligado de ratas¹³. Estos efectos podrían ocurrir por una modulación específica de los mecanismos involucrados en el transporte de agua por Stx2B, y/o por efectos de la subunidad B en mecanismos generales relacionados con la viabilidad de las células epiteliales.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la toxicidad de Stx2 y Stx2B en células epiteliales tubulares renales humanas en cultivo (CERH), y determinar el rol de los factores inflamatorios sobre la acción de la toxina.

Se obtuvo Stx2B a partir de la recombinación genética del gen de la subunidad B de Stx2 amplificado por PCR y clonado en el vector de expresión pQE70 que agrega 6 histidinas en el extremo C-terminal de la proteína. Luego se purificó del sobrenadante de suspensión de *Escherichia coli* recombinante bajo condiciones nativas, mediante la técnica de cromatografía de afinidad usando una resina Ni-agarosa (*Ni-NTA*, *QIAGEN*)¹³. Se detectó Stx2B pura en geles de *SDS-PAGE* teñidos con *Coomassie Blue* y en membranas de nitrocelulosas por *Western blot* mediante el uso de un anticuerpo anti-subunidad B y anti-histidina. La holotoxina se obtuvo comercialmente (*Denka Seiken Co.*, Tokio, Japón) y se usó como control positivo.

Los cultivos de CERH se realizaron a partir de cortezas renales obtenidas de nefrectomías parciales de pacientes adultos con su consentimiento informado, quienes fueron intervenidos quirúrgicamente en el Servicio de Urología del Hospital de Clínicas. Las células corticales se aislaron y cultivaron con procedimiento descrito por Karpman y col.¹⁰. Los experimentos se realizaron entre el 3^{er} y 5^o pasaje y en ausencia de suero fetal bovino que determina la condición de arresto de crecimiento celular.

La identificación de los tipos celulares se realizó con anticuerpos monoclonales anti-citoqueratina como marcadores de células epiteliales, anti-EMA (antígeno de membrana epitelial) presente en células de túbulo distales, PECAM1-CD31 presente en células endoteliales

y un anticuerpo anti-fibroblastos (*Dako*). Como segundo anticuerpo se usó IgG conjugado con peroxidasa (*Vectastain Universal Quick Kit*, *Vector*).

Para estudiar la funcionalidad del epitelio renal se analizó la absorción de agua a través de la monocapa de CERH en presencia y ausencia de Stx2. Las CERH se cultivaron hasta confluencia sobre soporte permeable y se montaron en una cámara modificada de Ussing¹³. La absorción neta de agua se registró minuto a minuto en ausencia y presencia de 0.01 y 1ng/ml de Stx2 durante 1h con un dispositivo usado en el laboratorio que mide el movimiento neto de agua a través de la monocapa epitelial con una sensibilidad de 50 nl¹⁴. Luego las células se fijaron y se observaron al microscopio óptico.

Para el estudio de viabilidad celular se utilizó el ensayo de incorporación de rojo neutro (50 µg/ml) en CERH, se incubaron en ausencia y presencia de distintas concentraciones de Stx2 y Stx2B y distintos tiempos comprendidos entre 1-72 hs. En algunos experimentos las CERH se preincubaron con lipopolisacáridos bacterianos (LPS, 1 µg/ml), TNF (1ng/ml), butirato (2mM), IL1-β (0.1ng/ml), IL-6 (10 ng/ml) e IL-8 (10 ng/ml) para estudiar la potenciación de Stx2 por los factores inflamatorios.

La síntesis de proteínas se midió por captación de ³⁵S-metionina radioactiva (10µCi/ml) en CERH previamente incubadas con distintas concentraciones de Stx2 y Stx2B durante 24-72hs.

La apoptosis celular se visualizó por fragmentación de ADN en geles de agarosa 1.2% por incorporación de iodo de propidio cuantificado por citometría de flujo.

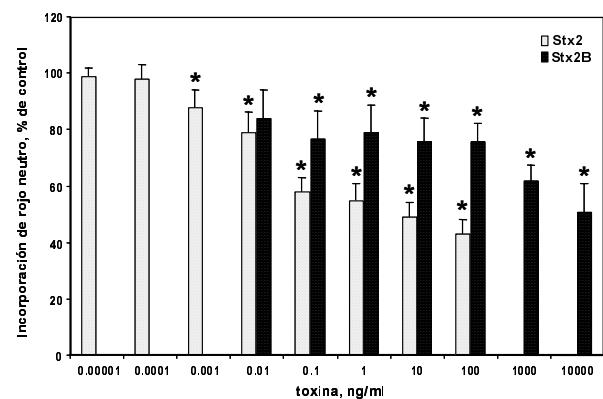


Fig. 1.- Comparación del efecto citotóxico de Stx2 y Stx2B en CERH a 72 hs. Se cuantificó la viabilidad de las CERH incubadas por 72 hs con distintas concentraciones de Stx2 y Stx2B. Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad con respecto a los valores obtenidos con células controles no tratadas con la toxina, las que se tomaron como 100% de viabilidad. * = p<0.05 con respecto al control (n = 5-10 experimentos por sextuplicado cada uno de ellos). Stx2: toxina Shiga tipo 2; Stx2B: subunidad B de Stx2; CERH: células epiteliales tubulares renales humanas

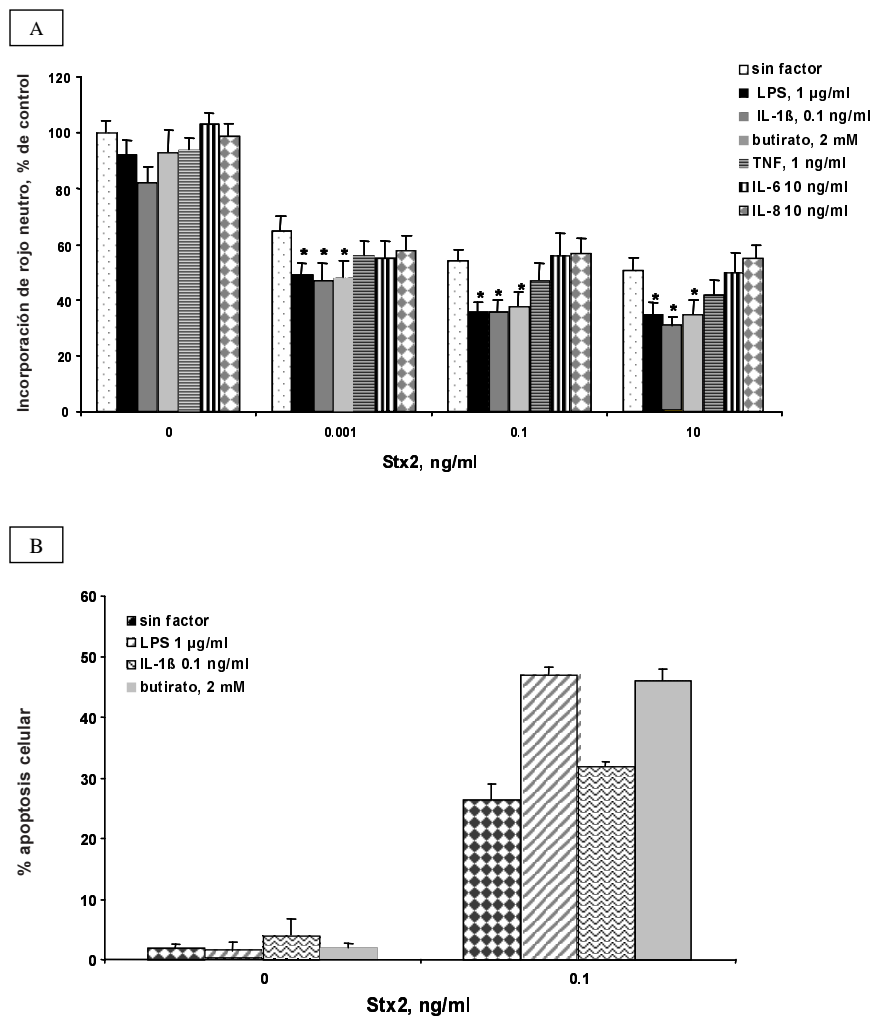


Fig. 2.— Efecto de factores inflamatorios en la toxicidad de Stx2. Se cuantificó la viabilidad (A) y la apoptosis (B) de las CERH preincubadas con distintos factores inflamatorios durante 24hs antes de ser expuestas a distintas concentraciones de Stx2 por 72hs. Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad o apoptosis con respecto a los valores obtenidos con células controles. * = p<0.05 con respecto a CERH incubadas con la misma concentración de la toxina pero en ausencia de factores inflamatorios (n = 3-5 experimentos por sextuplicado cada uno de ellos). Stx2: toxina Shiga tipo 2; Stx2B: subunidad B de Stx2; CERH: células epiteliales tubulares renales humanas

Los resultados demuestran que Stx2 inhibió significativamente la absorción de agua a través de las CERH en concentraciones y tiempos de incubación que no alteraron la viabilidad celular. Esto indicaría que la toxina podría alterar directamente los mecanismos de transporte involucrados en la absorción de agua a través del epitelio tubular renal humano.

Además observamos que Stx2 y Stx2B disminuyen la viabilidad de CERH de una manera dosis y tiempo dependiente. Stx2 tiene efecto significativo a partir de 10 ng/ml y 1h de incubación, mientras que sólo requirió 1pg/ml de Stx2 para disminuir la viabilidad celular a tiempos

mayores de incubación. Estos datos se correlacionan con las alteraciones morfológicas observadas por microscopía óptica. Stx2B también disminuye la viabilidad de CERH de una manera dosis y tiempo dependiente, pero a concentraciones 10 000 veces mayores. La dosis citotóxica necesaria para inhibir el 50% de la viabilidad celular (DC50) medida a las 72 hs de incubación fue 1ng/ml para Stx2 y 10 µg/ml para Stx2B (Fig.1).

Respecto a la síntesis de proteínas, se observó que Stx2 y Stx2B la inhiben en un 90% y 50% respectivamente, en el rango de concentraciones utilizado en los experimentos de viabilidad. La aparente discrepancia

entre los datos de viabilidad y síntesis de proteínas para el caso de Stx2, pero no para Stx2B, podría explicarse teniendo en cuenta que la inhibición global de síntesis de proteínas puede afectar de una manera diferencial a las proteínas apoptóticas y anti-apoptóticas, como fue propuesto previamente¹⁵. Sin embargo, no podemos descartar la diferencia de sensibilidad entre los métodos utilizados para evaluar viabilidad celular y síntesis de proteínas.

Los estudios de apoptosis demuestran que tanto Stx2 (1 ng/ml), como Stx2B (10 µg/ml) producen un incremento del 50% en la actividad apoptótica de las CERH. A su vez observamos que la disminución de la viabilidad y el aumento de apoptosis celular de CERH incubadas con Stx2 o Stx2B se potencian por la preincubación durante 24 hs con 1 µg/ml de LPS, 0,1ng/ml de IL1-β o 2mM de butirato, pero no con 1ng/ml de TNF, 10 ng/ml de IL-6 o 10 ng/ml de IL-8 (Fig. 2).

El conjunto de estos resultados demuestran que Stx2 es capaz de alterar la funcionalidad específica del epitelio del túbulo proximal renal a 1 hora de incubación, mientras que modifica sustancialmente la viabilidad celular a tiempos mayores de 6 horas de incubación. La subunidad B de Stx2 también altera la viabilidad celular pero a concentraciones 10 000 veces mayores, probablemente como consecuencia de su acción sobre la apoptosis celular. La acción tóxica de Stx2 y Stx2B sobre las células renales puede ser potenciada por algunos factores inflamatorios presentes en el suero y orina de pacientes con SUH.

La importancia de evaluar los posibles efectos tóxicos de Stx2B *per se* se debe a que esta subunidad se ha postulado como posible vacuna para el SUH¹⁶, lo cual demanda un estudio exhaustivo de los posibles efectos de la subunidad B.

Bibliografía

- Gianantonio CA, Vitacco M, Mendilaharsu F, Gallo GE, Sojo ET: The hemolytic uremic syndrome. *Nephron* 1973; 11: 174-92.
- Ferraris JR, Ramirez JA, Ruiz S, et al: Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: absence of recurrence after renal transplantation. *Pediatr Nephrol* 2002; 17: 809-14.
- Comité de Nefrología: Incidencia del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) en la República Argentina. *Arch Arg Pediatría* 1995; 93: 407-11.
- Wong CS, Jelacic S, Habeeb RL, Watkins SL, Tarr PI: The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *New Engl J Med* 2000; 342: 1930-6.
- Jacewicz M, Clausen H, Nudelman E, Donohue-Rolfe A, Keusch GT: Pathogenesis of Shigella diarrhea: XVII. A mammalian-cell membrane glycolipid, Gb3, is required but not sufficient to confer sensitivity to Shiga toxin. *J Infect Dis* 1986; 169: 538-46.
- Sandvig K and Van Deurs B: Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol Rev* 1996; 76: 949-66.
- Taguchi T, Uchida H, Kiyokawa N, et al: Verotoxins induce apoptosis in human renal tubular epithelium derived. *Kidney Int* 1998; 53: 1681-8.
- Marcato P, Mulvey G, Armstrong GD: Cloned Shiga toxin 2 B subunit induces apoptosis in Ramos Burkitt's lymphoma B cells. *Infect Immun* 2002; 70: 1279-86.
- Karpman D, Andreasson A, Thysell H, Kaplan BS, Svanborg C: Cytokines in childhood hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Pediatr Nephrol* 1995; 9: 694-9.
- Karpman D, Hakansson A, Perez MT, et al: Apoptosis of renal cortical cells in the hemolytic-uremic syndrome: *in vivo* and *in vitro* studies. *Infect Immun* 1997; 66: 636-44.
- Kiyokawa N, Taguchi T, Mori T, et al: Induction of apoptosis in normal renal tubular epithelial cells by *Escherichia coli* shiga toxin 1 and 2. *J Infect Dis* 1998; 178: 178-84.
- Cherla RP, Sang-Yun L, Tesh VL: Shiga toxins and apoptosis. *FEMS Microbiol Lett* 2003; 228: 159-66.
- Pistone Creydt V, Miyakawa MF, Martin F, Zotta E, Silberstein C, Ibarra C: The Shiga toxin 2 B subunit inhibits net fluid absorption in human colon and elicits fluid accumulation in rat colon loops. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37: 799-808.
- Dorr RA, Kierbel A, Vera J, Parisi M: A new data-acquisition system for the measurement of the net water flux across epithelia. *Comput Methods Programs Biomed* 1997; 53: 9-14.
- Yamasaki Ch, Nishikawa K, Zeng XT, et al: Induction of cytokines by toxins that an identical RNA N-glycosidase activity: Shiga toxin, ricin, and modeccin. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004; 1671: 44-50.
- Haicheur N, Bismuth E, Bosset S, et al: The B subunit of Shiga toxin to a tumor antigen elicits CTL and targets dendritic cells to allow MHC class I-restricted presentation of peptides derived from exogenous antigens. *J Immunol* 2000; 165: 3301-8.

*No importa cuánto te esfuerces
ni la ilusión que te forjes
lo mejor que hayas escrito
ya lo escribió Borges*

Manuel Mujica Láinez (1910-1984)

Citado por Guillermo Martínez en: *Un tono, Un continente*, Comentario bibliográfico de *Textos Recobrados* (1956-1986) de Jorge Luis Borges, Buenos Aires: Emecé, 2004.
La Nación, Cultura, 4-1-04, p 5