

EFFECTO CITOTOXICO DE LA HEMOLISINA DE ESCHERICHIA COLI (PARCIALMENTE PURIFICADA) EN LINFOCITOS Y MONOCITOS "IN VITRO"

Jorge Danilo García, MQC, M.S. *

key Word Index: Escherichia coli hemolysin, citotoxicity, pielonephritis

RESUMEN

El exponer una mezcla de linfocitos y monocitos humanos a la acción de hemolisina parcialmente purificada de *Escherichia coli* serotipo 055 dió como resultado mortalidad casi completa de ambos tipos celulares (88- 90%) al cabo de una incubación de 30 minutos. Se discute brevemente el posible significado del hallazgo en relación a los procesos patológicos que operan en la pielonefritis. [Rev. Cost. Cienc.Méd. 1984; 5(2): 170-174].

INTRODUCCION

Investigaciones recientes han demostrado la importancia de la producción de hemolisina calcio dependiente como factor de virulencia por parte de *Escherichia coli*, además de fimbrias y antígenos capsulares, en casos de infecciones sintomáticas y asintomáticas del tracto urinario causadas por dicha bacteria (4, 6). Ello viene a colocar en perspectiva reportes previos que establecieron que la capacidad de producir hemolisina se encontró hasta en un 50 por ciento de cepas de *Escherichia coli* aisladas de muestras de orina de pacientes con infección urinaria (5). Lo mismo se aplica a las observaciones hechas en modelos animales, que caracterizan como más virulentas, aquellas cepas de *Escherichia coli* capaces de producir hemolisina, en contraste con aquellas cepas hemolisina negativas (3). Cavalieri y Snyder (1) demostraron el efecto citotóxico de la hemolisina purificada en leucocitos polimorfonucleares y fibroblastos de ratón. Estos autores postularon que la posesión de hemolisina podría facilitar la implantación de la bacteria en vías urinarias bajas, causando necrosis de células epiteliales y dando lugar a la formación de microabscesos, que servirían de focos iniciales de la infección (1).

Anteriormente, De Pauw *et al* (2) reportaron que la incubación de células de *Escherichia coli* hemolítica con lisosomas de células renales, causa la desintegración de membranas lisosomales, con liberación de sus contenidos.

El presente trabajo tiene como finalidad ampliar los hallazgos de Cavalieri y Snyder, y demostrar la capacidad de la hemolisina (parcialmente purificada), de causar efecto citotóxico en linfocitos y monocitos *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

Determinación de la actividad hemolítica:

Diluciones dobles seriadas de la preparación hemolítica (1 ml. en solución salina 0.15 M con CaCl₂ 0.01 M) recibieron 1 ml de suspensión de eritrocitos de carnero al 1 por ciento en solución de Alsever. Se mezcló e incubó a 37°C durante 60 minutos, añadiéndose luego 2 ml de solución salina 0.15 M a cada tubo, seguido de centrifugación (700 xg, 5 minutos) para dejar un sobrenadante libre de células. Cada tubo de reacción se corrió con su correspondiente control, que contiene preparación

* Departamentos de Bioquímica y Microbiología, Universidad de Costa Rica

hemolítica en solución salina sin calcio más eritrocitos. La densidad óptica de los sobrenadantes se leyó espectrofotométricamente (545 nm). El punto correspondiente a 50 por ciento de hemólisis se determinó mediante una curva estándar de hemólisis. El título hemolítico se expresó en unidades hemolíticas 50 por ciento (UH 50), siendo éstas el inverso de la dilución de hemolisina que causa un cincuenta por ciento de hemólisis.

Cepa bacteriana

En este estudio se usó una cepa de *Escherichia coli* serotipo 055 proveniente de un paciente con infección urinaria, aislada en el Centro Médico de la Universidad de West Virginia, USA. La identificación original de la cepa se hizo sobre la base de pruebas bioquímicas. Su mantenimiento se efectuó en medios inclinados de agar sangre, a 4°C, con subcultivos bimensuales.

Purificación parcial de la hemolisina

El microorganismo se cultivó en infusión de corazón de buey (Difco, Detroit Michigan 48201). 2 ml de un cultivo fresco de densidad óptica 0.325 (625 nm) se usaron para inocular montos de 200 ml de medio estéril contenido en frascos erlenmeyer (volumen total 1 L). Estos se incubaron en un baño maría con agitación (200 rpm), hasta que la densidad óptica llegó a 0.65 -0.70. El cultivo se centrifugó en botellas de 250 ml a 10000 xg durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se esterilizó mediante filtración, usando membranas Millipore (Bedford, Massachusetts 01730) y se concentró 27-30 veces usando un sistema Amicon (Danvers, Massachusetts 01923) de diálisis a presión. Todo esto se efectuó a 4°C. El concentrado se sometió a ultracentrifugación, estratificando sobre un gradiente de glicerol citrato bufferizado, de composición establecida (1) y centrifugando a 89000 xg (ultracentrifuga Beckman L 5 - 65) por un período de 20 horas a 4°C. Se recogieron fracciones de 1.4 ml del gradiente, las cuales se analizaron por actividad hemolítica, escogiéndose las que mostraban actividad significativa (más de 50% de hemólisis). Las fracciones escogidas se mezclaron y constituyen lo que se denominó hemolisina parcialmente purificada o HPP.

Aislamiento de linfocitos y monocitos

Se estratificó sangre venosa humana heparinizada (4 ml) sobre 3 ml de medio M PRM (Laboratorios Flow, Mc Lean, VA, USA), una mezcla de Ficol 400 e Hypaque 85 con densidad de 1.114. Se centrifugó a 350 xg durante 30 minutos, al cabo de los cuales la capa de linfocitos y monocitos se recogió con una cánula adaptada a una jeringa plástica estéril. Las células se lavaron con solución de Hank's modificada (sin caldo) en tubos de vidrio siliconizado estériles. La suspensión final se hizo para dar una densidad de 1×10^6 células/ml. Dicha suspensión contenía aproximadamente 55 por ciento de linfocitos y 45 por ciento de monocitos.

Ensayo de actividad citotóxica

Volúmenes de 1 ml de suspensión celular se colocaron en viales de centelleo, siliconizados y estériles, que contenían 3 ml de medio esencial de Dulbecco. Los viales se preincubaron 10 minutos en un baño maría a 37°C con rotación (100 rpm).

Cada vial recibió 1 ml de preparación hemolítica. El vial control recibió 1 ml de glicerol citrato bufferizado. El volumen final en los viales fue de 5 ml. Los conteos celulares se efectuaron por duplicado a tiempo 0 y a los 30 minutos de incubación, utilizándose para ello una cámara cuenta glóbulos, que se cargó con una mezcla de 200 u L de suspensión celular del vial y 45 u L de una solución de azul de tripán (0.4% en NaCl 0.15 M). Las células viables permanecen sin teñirse, en razón de su habilidad para excluir el colorante. La mortalidad celular se expresó en forma porcentual en función del número de células vivas a tiempo cero.

RESULTADOS

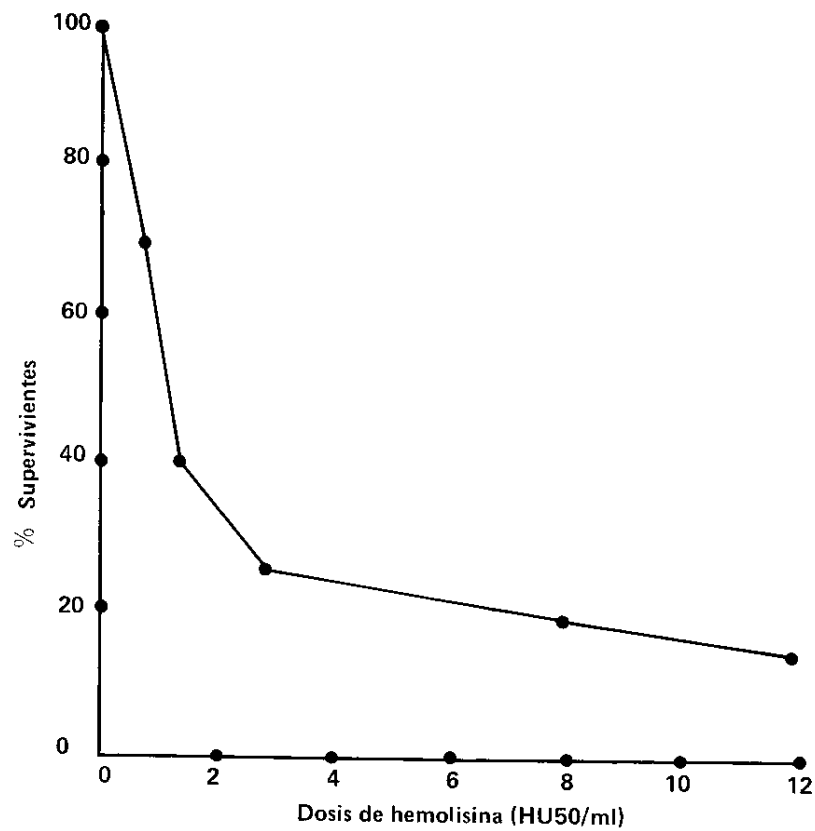
La figura N° 1 muestra el resultado promedio de tres experimentos en los cuales se sometió una serie de suspensiones celulares a concentraciones crecientes de HPP, expresada la actividad de ésta como UH 50/ml en el volumen total del vial correspondiente. Pudo apreciarse que el vial control (0 UH 50/ml) no mostró cambios en la viabilidad de la suspensión celular. Una dosis de 1.5 UH 50/ml causó la muerte de 50 por ciento de las células al final de 30 minutos de incubación, y exposición a dosis más altas (8-12 UH 50/ml) proporciona 88-90 por ciento de mortalidad. No se investigó el efecto de dosis superiores de HPP con el fin de establecer si la población celular sobreviviente manifiesta resistencia a la acción de aquella. La apreciación visual de las células expuestas permitió establecer que no hay citotoxicidad selectiva de la HPP con respecto a monocitos o linfocitos. Ambos tipos celulares se afectan de manera parecida por acción de la toxina.

Se puede observar que el gráfico proporciona información acerca de la acción citotóxica de la HPP y también permite apreciar el efecto de dosis respuesta, con porcentajes crecientes de mortalidad ante incrementos en la concentración de HPP.

DISCUSION

El hallazgo del efecto citotóxico de la HPP en linfocitos y monocitos, similar al reportado por Cavalieri y Snyder (1) en leucocitos polimorfonucleares, es de difícil interpretación a la luz del conocimiento actual de la patogénesis de la infección de vías urinarias. La implantación de la bacteria y el establecimiento de un foco primario de infección, a partir del cual las bacterias migran a vías urinarias superiores y luego al parénquima renal pareciera ser el mecanismo más común que da origen a la pielonefritis aguda. La respuesta celular está compuesta de infiltrado de leucocitos polimorfonucleares y, como ya se ha postulado, la hemolisina es capaz de alterar esta respuesta mediante eliminación de polimorfonucleares y, cuando menos, afectando su capacidad fagocítica. El análisis es más complicado en el caso de la pielonefritis crónica, que presenta escaso infiltrado de tipo mononuclear, y en la mayoría de los casos, es sumamente difícil aislar el microorganismo causante, lo cual ha llevado a algunos autores a postular otros mecanismos que podrían ser responsables del daño tisular según progresa la enfermedad (2). En todo caso, cualquiera que sea la secuencia de eventos en la aparición de pielonefritis crónica, se desprende del presente estudio que en su fase inicial, por lo menos, la *Escherichia coli* invasora hemolisina positiva podría ser capaz de interferir con la función de las células mononucleares que migran a la zona afectada, tal vez facilitando el establecimiento del estadio crónico de la enfermedad. La comprobación de ello aguarda la realización de estudios *in vivo* que así lo establezcan.

FIGURA 1



AGRADECIMIENTO

El autor desea dejar constancia de su agradecimiento al Dr. I. S. Snyder por su consejo y crítica durante el desarrollo de la investigación.

ABSTRACT

A calcium dependent hemolysin was obtained from culture supernates of a urinary strain of Escherichia coli. It was partially purified by gradient centrifugation and concentrated 30 fold. The partially purified hemolysin was tested in a cytotoxicity assay, against a mixture of human lymphocytes and monocytes. The results showed significant killing of both cell types (Up to 88-90%) at the end of a 30 minute incubation; these are discussed regarding their possible significance in the pathology of pyelonephritis.

BIBLIOGRAFIA

1. Cavalieri, S.J.; Snyder, I.S. Effect of *Escherichia coli* alpha hemolysin on human peripheral leukocyte viability in vitro. *Infect. Immun.*, 1982; 36:455-461.
2. De Pauw, A.P.; Gill, W.L.; Fried, F.A. Etiology of pyelonephritis: Renal lysosome disruption by hemolytic *Escherichia coli*. *Invest. Urol.*, 1971;9:230-233.
3. Hacker, J. Cloned hemolysin genes from *Escherichia coli* that cause urinary tract infection determine different levels of toxicity in mice. *Infect. Immun.*, 1983; 42:57-63.
4. Hughes, C. Hemolysin production as a virulence marker in symptomatic and asymptomatic urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 1983;39:546-551.
5. Minshew, B.H.; Jorgensen, J.; Counts, G.W.; Falkow, S. Association of Hemolysin Production, Hemagglutination of Human Erythrocytes and virulence of Chicken Embryos of extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Infect. Immun.*, 1978; 20:50-54.
6. Waalwijk, C; De Graaf, J. Inactivation of haemolysin production in *Escherichia coli* by transposon insertion results in loss of virulence. *Antonie Van Leeuwenhoek J. Microbiol.*, 1983; 49:23-30.