

APOPTOSIS DE CÉLULAS ENDOTELIALES INDUCIDA POR AISLAMIENTOS COLOMBIANOS DE *Staphylococcus aureus*

Díaz J. A ¹, Rios D ², Gaona M. A ², Matheus L. M ³

¹Departamento de Biología, Universidad de Pamplona.

²Unidad de Medicina Tropical y Enfermedades Infecciosas.
Instituto de Ciencias Básicas. Facultad de Medicina. Universidad del Rosario.

³Unidad de Bioquímica. Instituto de Ciencias Básicas.
Facultad de Medicina. Universidad del Rosario.

luisa.matheus@urosario.edu.co

Recibido Febrero 24 de 2006

Aceptado Mayo 30 de 2006

RESUMEN

La sepsis representa uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial. Las estadísticas del Medicare database and the National Census Projections estiman que en Estados Unidos se reportan 750.000 casos de sepsis severa por año. Las tasas de mortalidad oscilan entre 28 y 59%. *Staphylococcus aureus* es uno de los patógenos mas frecuentemente asociados con sepsis. En sepsis ocasionada por *S. aureus* el endotelio es el tejido blanco potencial. Se ha postulado que los microorganismos internalizados inducen la apoptosis de la célula huésped con el fin de romper la barrera celular sin la activación de la respuesta inmune inmediata. El desprendimiento de las células apoptóticas también permite la dispersión bacteriana. En el presente estudio se analizó la capacidad de inducir apoptosis en células endoteliales de cinco aislamientos bacterianos provenientes de diferentes hospitales colombianos y de la comunidad de trabajadores de la salud portadores asintomáticos de *S. aureus*. Todos los aislamientos estudiados indujeron apoptosis endotelial dependiente del número de bacterias inoculadas.

PALABRAS CLAVES:

Apoptosis, *Staphylococcus aureus*, endotelio, sepsis

ABSTRACT

Sepsis represents a major world-wide health problem. Statistics from Medicare's database and the National Census Report Projections estimate that in the United

States there are 750,000 cases of severe sepsis in one year. The mortality rate oscillates between 28% and 59%. One of the pathogens which is most frequently related to sepsis is *Staphylococcus aureus*. During the staphylococcal sepsis development, the endothelium is a potential target for injury. It has been hypothesized that internal micro-organisms induce host cell apoptosis to disrupt the cellular barrier without triggering an immediate immune response. The release of apoptotic cells also allows the spread of internal bacteria. The potential ability to induce endothelial apoptosis cellular activity was analyzed in five Colombian bacteria isolates recovered from hospitals and their communities working with health institutions studying asymptomatic carries of *S.aureus*. It was found that all the isolates induced apoptosis depending on those inoculated with the *S.aureus* bacteria.

KEY WORDS:

Apoptosis, *Staphylococcus aureus*, Endothelium, Sepsis.

INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus es una de las bacterias Gram positivas más comúnmente relacionada con varias enfermedades de origen comunitario y nosocomial, debido a su capacidad de colonizar diferentes tejidos y órganos, ocasionando infecciones graves como neumonía, endocarditis y osteomielitis (HPA, 2006; HASLINGER-LÖFFLER, et al 2005; SALVADOR, et al 2005; SCHWARZ-LINEK, et al 2006). Las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* pueden desencadenar en sepsis y síndrome séptico (LOWY, 1998; WHO, 2003). La sepsis severa y el shock séptico ocasionan una mortalidad de cerca del 50%, presentándose en los últimos años un aumento de la frecuencia de casos de infecciones con bacterias Gram positivas con respecto a las Gram negativas (ANGUS et al 2001; NGUYEN, et al 2006). De acuerdo con los datos presentados por la Organización Mundial de la Salud (WHO, World Health Organization) el porcentaje de mortalidad total producido por la infección con *S. aureus* puede alcanzar un 30% (WHO, 2006).

La versatilidad que posee *S. aureus* como patógeno de riesgo humano se ve reflejado en la capacidad de expresar amplios factores de virulencia, proporcionándole la habilidad para evadir al sistema inmune del hospedero y a tratamientos con antibióticos (LOWY, 1998; ARIAS, et al 2005; SCHWARZ-LINEK, et al 2006). La aparición de cepas de *S. aureus* multiresistentes a drogas hace que los tratamientos frente a este tipo de infecciones sean poco eficaces (ARIAS, et al 2005).

S.aureus tiene la capacidad de inducir apoptosis en diferentes células de vertebrados contribuyendo a la dispersión de la infección (HASLINGER-LÖFFLER, et al 2005). Se a descrito que para las células endoteliales la inducción de apoptosis requiere de la invasión de células por *S. aureus* (cepas no invasivas o alfa-toxinas purificadas no son suficientes para inducir apoptosis) (LOWY, 1998; MENZIES, et al 1998; ESEN et al 2001; HASLINGER-LÖFFLER, et al 2005). La internalización de *S. aureus* en células endoteliales es realizada

por la interacción entre patógeno-hospedero mediado por la asociación de las proteínas de unión a fibronectina (FnBP, presentes en la superficies celular bacteriana) a la proteína fibronectina (Fn, encontrada en la matriz extracelular y en los fluidos corporales de los vertebrados), esta interacción conduce al agrupamiento de las integrinas (en la superficie de la célula huésped) permitiendo la entrada de la bacteria (SCHWARZ-LINEK et al 2004; 2006). El proceso de internalización también involucra la fosforilación de las proteínas tirosina quinasa (PTKs) y rearrreglo de la actina del citoesqueleto (AGERER, et al 2003; HASLINGER-LÖFFLER, et al 2005; SCHWARZ-LINEK, et al 2004).

En endotelio, la activación de las vías apoptóticas inducida por la presencia intracelular de *S. aureus* involucra la activación de caspasas y esfingomielinasa ácida (ASM), la liberación de citocromo C y la estimulación de quinasas de Jun dependientes de ASM (ESEN et al 2001) (Fig. 1).

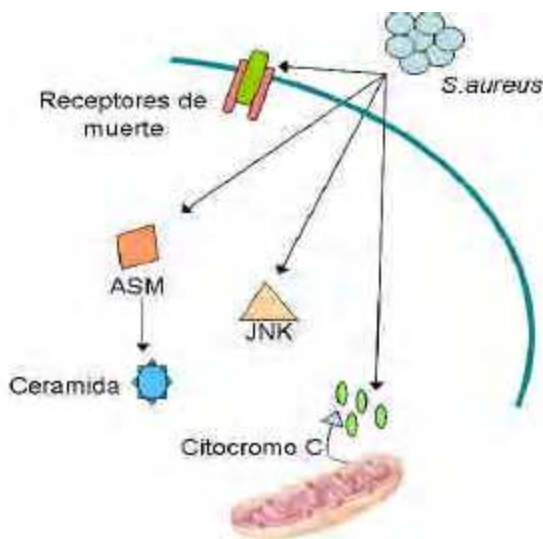


Fig. 1. Mecanismos de activación de apoptosis por *Staphylococcus aureus* en células endoteliales

En el presente estudio se evaluó la capacidad de *S. aureus* de inducir de apoptosis en

células endoteliales. Se emplearon cinco aislamientos de origen nosocomial y de la comunidad de trabajadores de la salud portadores asintomáticos de *S. aureus*. Se analizaron diferentes multiplicidades de infección y se valoró la inducción de muerte celular mediante ensayos de viabilidad celular, análisis de los cambios morfológicos celulares y nucleares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Los reactivos utilizados en el presente estudio fueron adquiridos en las siguientes casas comerciales: Caldo BHI (GIBCO), Suero fetal bovino, Solución de Penicilina / estreptomina, Solución Tripsina -EDTA, Bicarbonato de Sodio (EUROBIO), Medio HAM-F12 Kaighn, MTT (1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformasan), DMSO, Hoechst (SIGMA), Agar sangre de cordero (BBL), Sulfato de Gentamicina, Paraformadehído (MP Biomedical), PBS sin Ca^{+2} y Mg^{+2} (Amresco), Glucosa (MERK). Cultivo Celular

Las células endoteliales Eahy926 (gentilmente donada por la Dra. J-C Edgell de la Universidad de California) (EDGEELL, et al 1983) fueron cultivadas en Medio HAM-F12 Kaighn, suplementado con 4% de glucosa, 10% (v/v) de suero fetal bovino y 2% (v/v) de penicilina/estreptomina. Las células fueron sembradas e incubadas a una temperatura de 37°C con atmósfera al 5% de CO_2 por dos horas antes de la infección con *S. aureus* en platos de 24 pozos para las pruebas de viabilidad celular con MTT y en platos de 6 pozos para ensayo de tinción con Hoechst.

Aislamientos Bacterianos

Para de desarrollo del estudio se adquirieron cinco aislamientos de *S. aureus* procedentes ciudad de Bogotá D.C, de los cuales cuatro son de origen nosocomial provenientes de diferentes centros médicos (MSSA01, MSSA02, MSSA03, MRSA05) colectadas

durante el período 2005 - 2006. En el año 2006 también se colectó un aislamiento proveniente de la comunidad de trabajadores de la salud portadores asintomáticos de origen nasal (MSSA04). Los aislamientos fueron inoculadas en agar sangre e incubadas a 37 °C durante 18h anterior a realizar experimentos de infección. Con el fin de determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) necesarias para la infección en primer lugar se realizó una curva de crecimiento. Se partió de un MacFarlan 0.5, se tomaron muestras a intervalos de 30 minutos durante 7 horas y se determinó la densidad óptica a 540 nm (OD540) de cada muestra. Simultáneamente se realizó una siembra de las colonias por dilución en profundidad en cajas de agar nutritivo, las bacterias se incubaron durante 18h a una temperatura de 37°C. Adicionalmente se realizaron pruebas de sensibilidad de *S. aureus* frente a Clindamicina, Oxacilina, Vancomicina, Cefalotin, Ciprofloxacina, Gentamicina, empleando el método de Difusión con disco (Kirby-Bauer) (BAUER, et al 1966; DREW WL, et al 1972).

Infección de células endoteliales

Las células endoteliales Eahy926 cultivadas a una confluencia entre 70-80% se infectaron con los aislamientos MSSA01, MSSA02, MSSA03, MSSA04, MRSA 05 (moi 500 y 1000), las células se incubaron a temperatura de 4°C durante 30 minutos (permitiendo precipitar las bacterias), a continuación se incubaron a una temperatura de 37°C, 5% de CO₂ por tres horas. Posteriormente los cultivos fueron tratados con gentamicina (200 µg/ml) por dos horas, se lavaron con PBS y se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ por 20 horas.

Determinación de apoptosis.

La muerte celular se determinó empleando tres metodologías: Determinación de cambios morfológicos celulares, cuantificación de la viabilidad celular y análisis de cambios nucleares.

Posterior a los tratamientos de infección, se tomaron fotografías de los cultivos endoteliales infectados y los controles sin infectar.

La valoración de la viabilidad celular de células endoteliales se realizó empleando el ensayo de MTT (MOSMANN T, 1983). A las células se les agregó un volumen de 100 µl de MTT (1ug/ml) y se incubó a una temperatura de 37°C, 5% de CO₂ por una hora. Después de retirar el medio, los cristales de formazan se solubilizaron con isopropanol. A continuación se determinó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro TECAN GENios.

La fragmentación de ADN y la condensación de cromatina en las células endoteliales se analizó mediante la tinción con Hoechst (OKSVOLD, et al 2002). Posteriormente a la infección, las células endoteliales fueron despegadas, centrifugadas a 5.000 rpm por 5 minutos, las células se fijaron en un volumen de solución paraformaldehído: medio HAM-F12 (1:1). Finalmente, se agregó el colorante Hoechst y se realizó el montaje en el porta objetos. La tinción se visualizó por microscopía de fluorescencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Condiciones de cultivo de *Staphylococcus aureus*.

Las características de los aislamientos de *S. aureus* utilizadas en este estudio se muestran en la Tabla 1. La pureza de los aislamientos fue comprobada por siembra en agar sangre y por tinción de Gram (Fig.2). La curva de crecimiento del aislamiento MSSA01 de *S. aureus* muestra un crecimiento exponencial entre los tiempos 90 - 300 minutos (Fig.3). Los otros aislamientos bacterianos presentaron un comportamiento similar (resultado no mostrado). Como consecuencia de la comparación de la Densidad Óptica (OD540) y el número de colonias crecidas en las placas, se estableció

Tabla 1. Características de los aislamientos de *Staphylococcus aureus* estudiados

Aislamiento	Origen	Sensibilidad					
		Clindamicina 2µg	Oxacilina 1µg	Vancomicina 30µg	Cefalosporina 1 ^{ra} generación 30µg	Ciprofloxacina 5µg	Gentamicina 10µg
MSSA01	Nosocomial	S	S	S	S	S	S
MSSA02	Nosocomial	S	S	S	S	S	S
MSSA03	Nosocomial	S	S	S	S	S	S
MSSA04	Comunitario/ Nasal	S	S	S	S	S	S
MRSA 05	Nosocomial	R	R	R	R	R	R

TABLA 1. Las pruebas de sensibilidad a los antibióticos se realizaron por el método de difusión con disco (Kirby-Bauer). **S** corresponde a sensible y **R** corresponde a resistente al antibiótico.

la siguiente correspondencia $OD_{540} = 0.3$ equivale a 1×10^8 UFC/ml. Este resultado es similar al reportado por Menzies y colaboradores (MENZIES, et al 1998). Esta relación permitió calcular el número de bacterias necesaria para obtener las multiplicidades de infección (moi) 500 y 1000. Infección de células endoteliales

La figura 4 muestra los cambios morfológicos presentados por las células endoteliales EAhy926 posterior a la incubación con *S. aureus* durante 24 horas. Las células endoteliales presentan encogimiento (disminución de volumen de hasta un 50%) ya que se produce el rompimiento de la laminina y de los filamentos de actina. También se observa un desprendimiento celular puesto que durante el proceso apoptótico las células pierden contacto con las células vecinas (ANONIMO, 2006). Adicionalmente se distingue la presencia de detritos celulares.

Los resultados de sensibilidad obtenidos en el antibiograma revelan que los aislamientos sensibles a meticilina también lo son a gentamicina (10µg/ml). Para garantizar la eliminación total de las bacterias

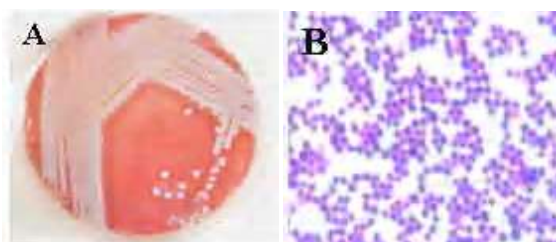


Fig. 2. *S. aureus*. aislamiento MSSA01 A. Crecimiento de en superficie en medio agar-sangre. B. Tinción de Gram. Fotografía en microscopio óptico de luz blanca. Aumento 40X.

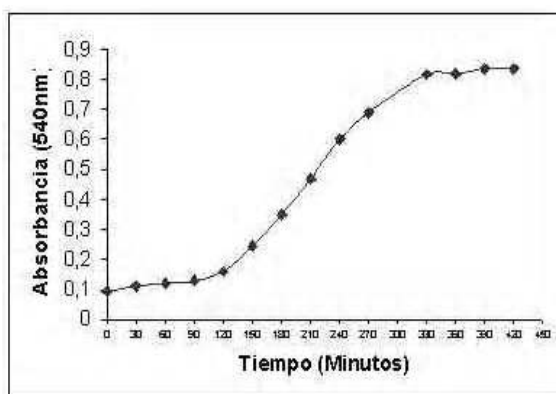


Fig. 3. Curva de crecimiento del aislamiento MSSA01. Se partió de un cultivo 0,5 MacFarlan y se incubó durante 7 horas a una temperatura de 37 °C. Cada 30 minutos se tomó una muestra y se cuantificó la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm.



Fig. 4. Cambios morfológicos presentados por las células endoteliales EAh926 después de 24 horas de infección con *S. aureus*. A. Células endoteliales sin infectar. B. Células endoteliales infectadas con MRSA05 (moi 1000). C. Células endoteliales infectadas con MSSA (moi 1000). La fotografía se realizó en un microscopio invertido. Aumento 40X.

extracelulares se aumento 20 veces la concentración del antibiótico (200µg/ml). Adicionalmente se evaluó la toxicidad que pudiera generar la gentamicina en las células endoteliales mediante una curva dosis/tiempo del antibiótico (resultados no mostrados), se observo que la utilización de una concentración de 200µg/ml no representa ningún cambio en la viabilidad celular.

La valoración de la viabilidad celular de las células endoteliales infectadas con *S. aureus* se realizó utilizando el ensayo de MTT después de 24h de la infección (Fig. 5). Los resultados muestran que todos los aislamientos de *S. aureus* estudiados inducen una reducción significativa de la supervivencia celular (reducción de viabilidad entre 28 y 55 %). Los aislamientos que provocan un mayor porcentaje de muerte endotelial son MSSA01, MSSA04 y MRSA05. En concordancia con los resultados obtenidos por Haslinger-Löffler y colaboradores, los resultados del presente estudio revelan que el porcentaje de muerte inducida es dependiente de la multiplicidad de infección (HASLINGER-LÖFFLER, et al 2005). Adicionalmente se analizaron los cambios nucleares característicos de apoptosis (fragmentación de ADN y la condensación de cromatina) presentados en las células endoteliales (después de 24 horas de infección a moi de 1000), en la figura 6 se aprecia que los diferentes aislamientos inducen entre el 36.3 y 48.4% de muerte celular por apoptosis. La

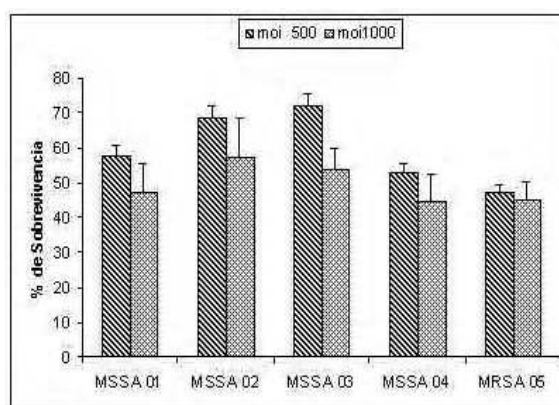


Fig. 5. Porcentaje de viabilidad celular empleando MTT en células endoteliales EAh926 infectadas con *S. aureus* (24h) empleando dos diferentes multiplicidades de infección. Los resultados muestran la media \pm S.E.M correspondientes a tres experimentos independientes realizados por triplicado.

correlación de los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad celular con MTT y los ensayos de tinción con Hoechst confirma que la disminución de la supervivencia celular ocasionada por la infección con *S. aureus* corresponde a muerte celular por apoptosis.

Al comparar la capacidad del aislamiento multiresistente de inducir muerte celular por apoptosis con los aislamientos susceptibles, se observa que la capacidad de *S. aureus* inducir apoptosis es independiente del grado de sensibilidad a los antibióticos.

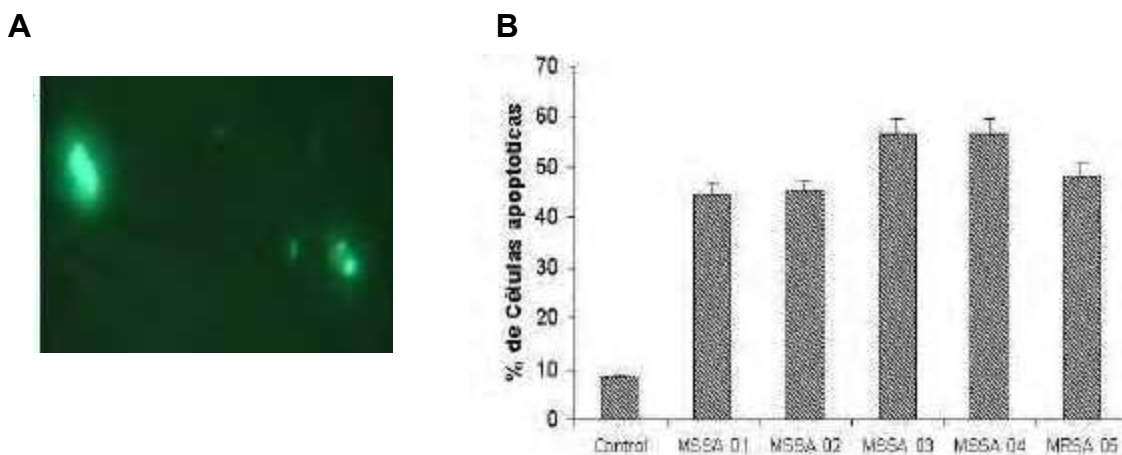


Fig. 6. Porcentaje de apoptosis utilizando el método de tinción con Hoechst. Las células endoteliales EAhy926 infectadas con *S. aureus* (24h) empleando una multiplicidad de infección de 1000. A. Fotografía en microscopio de fluorescencia del aislamiento MSSA01. Aumento 40X. B. Porcentaje de apoptosis de las células endoteliales EAhy926. Los resultados muestran la media \pm S.E.M correspondiente a un experimento, las lecturas se realizaron por triplicado.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los aislamientos de *S. aureus* estudiados circulantes en los hospitales y en la comunidad de trabajadores de la salud portadores asintomáticos de *S. aureus* colombiana poseen la capacidad de inducir apoptosis en células endoteliales por periodos de incubación prolongados (24 h) y esta habilidad no se relaciona con las características de sensibilidad a los distintos antibióticos. Tomando en cuenta que *S. aureus* se destaca como uno de los patógenos más frecuentemente relacionados con sepsis, se hace indispensable ampliar los estudios moleculares que conduzcan a la implementación de estrategias que reduzcan de los efectos nocivos

ocasionados por este patógeno en la población humana.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado por la Universidad de Pamplona y la Universidad del Rosario. Deseamos expresar nuestro agradecimiento al personal del Laboratorio de Biología Molecular y Celular, y del Laboratorio de Microbiología de la Universidad del Rosario por su invaluable asistencia logística. Finalmente reconocemos el apoyo de los miembros del Instituto de Ciencias Básicas de Facultad de Medicina de la Universidad del Rosario y en particular de su directora Dr. Sandra Ramírez.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agerer F, Michel A, Ohlsen K, Hauck CR (2003) Integrin-mediated invasion of *Staphylococcus aureus* into human cells requires Src family protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 278:42524-31
- Angus DC, Wax RS. (2001) Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med* 29:S109-S116
- Anonimo. Stages in Apoptosis (Cell Death). <http://cellbiology.med.unsw.edu.au/units/science/project2004/Apoptosisstages.htm>. Junio de 2006
- Arias. C.A., Cruz C, Moreno J, Renzoni A, Hidalgo M, Reyes J, Schrenzel J, Lewb D, Castañeda E (2005) Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Colombian hospitals over 7 years (1996-2003): emergence of a new dominant clone. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26: 457-462
- Bauer, A. W., Kirby W. M. M., Sherris J. C., and Turck M (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. Clin. Pathol* 45: 493-496
- Drew WL, Barry AL, O'Toole R, Sherris JC (1972) Reliability of the Kirby-Bauer Disc Diffusion Method for Detecting Methicillin-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol* 24: 240-247
- Edgell Cora-Jean S., McDonald C.c., and Graham J. B. (1983) Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Cell Biology* 80: 3734-3737
- Esen, M., B. Schreiner, V. Jendrossek, F. Lang, K. Fassbender, H. Grassmé and E. Gulbins (2001) Mechanisms of *Staphylococcus aureus* induced apoptosis of human endothelial cells. *Kluwer Academic Publishers* 6:431-439
- Haslinger-Löffler, B. Kahl BC, Grundmeier M, Strangfeld K, Wagner B, Fischer U, Cheung AL, Peters G, Schulze-Osthoff K, Sinha B (2005) Multiple virulence factors are required for *Staphylococcus aureus*-induced apoptosis in endothelial cells. *Cellular Microbiology* 7: 1087-1097
- HPA, Health Protection Agency. Reviewed *Staphylococcus aureus* - general information. <http://www.hpa.org.uk/>. Junio de 2006
- Lowy, Franklin .D (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339: 520-532
- Menzies, B.E., and Kourteva, I. (1998) Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. *Infect Immun* 66: 5994-5998.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63
- Nguyen B .H, MD, MS, Emanuel P. Rivers, MD, MPH, Fredrick M. Abrahamian, DO, Gregory J. Moran, MD, Edward Abraham, MD, Stephen Trzeciak, MD, David T. Huang, MD, MPH, Tiffany Osborn, MD, Dennis Stevens, MD, PhD, David A. Talan, MD (2006), Severe Sepsis and Septic Shock: Review of the Literature and Emergency Department Management Guidelines. *Infectious Disease/ Review Article*. Article in press.
- Oksvold MP, Skarpen E, Widerberg J, Huitfeldt HS (2002) Fluorescent histochemical techniques for analysis of intracellular signaling. *J Histochem Cytochem* 50(3):289-303.
- Schwarz-Linek U, Magnus Hook, Potts R. J (2006) Review: Fibronectin-binding proteins of Gram-positive cocci. *Microbes and Infection* 1-8, Article in press.
- Salvador G.C. Acevedo A, Bennani A.. (2005) Técnicas para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en el laboratorio de microbiología clínica. *Asociación Española de Farmacéuticos Analistas Modesto Lafuente* 3: 280-10.
- Schwarz-Linek U, Hook M, Potts JR (2004) The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells *52:631-41*
- WHO, World Health Organization (2003) Explore simplified antimicrobial regimens for the treatment of neonatal sepsis. Department of Child and Adolescent Health and Development. Geneva, 30th September - 1st October 2002. junio de 2006
- WHO, World Health Organization. Bacterial Infections. http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_bacterial/en/index4.html. Junio de 2006