

**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

*ACTA DE REVISION DE TESIS*

En la Ciudad de México siendo las 10:00 horas del día 11 del mes de Marzo del 2005 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ENMyH-IPN para examinar la tesis de grado titulada:

Inducción de apoptosis por la hemolisina vacuolizante HlyA de Vibrio cholerae

Presentada por el alumno:

<u>Castañón</u>	<u>Sánchez</u>	<u>Carlos</u>	<u>Alberto</u>						
Apellido paterno	materno	nombres(s)							
Con registro: <table border="1"><tr><td>B</td><td>0</td><td>2</td><td>1</td><td>7</td><td>66</td></tr></table>				B	0	2	1	7	66
B	0	2	1	7	66				

Aspirante al grado de Maestro en Ciencias en Biomedicina Molecular

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis  
Paula Figueroa Arredondo  
Dra. Paula Figueroa Arredondo

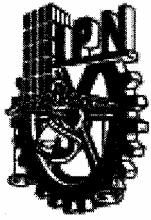
Dr. Fernando Enríquez Rincón

Dr. Juan Saías Benito

Dra. Consuelo Gómez García

Dr. Guillermo Pérez Ishiwara

SECRETARIA DE  
EL PRESIDENTE DEL COLEGIO  
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL  
DE PROFESORES DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
Y HONORARIA  
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACION



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**CARTA DE CESION DE DERECHOS**

En la Ciudad de México el día 16 del mes de marzo del año 2005, el (la) que suscribe Carlos Alberto Castañón Sánchez alumno (a) del Programa de Biomedicina Molecular con número de registro B021766, Adscrito a ENMyH, manifiesta que es autor (a) Intelectual del presenta trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Paula Figueroa Arredondo y cede los derechos del trabajo intitulado Inducción de apoptosis por la hemolisina vacuolizante HlyA de *Vibrio cholerae*, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

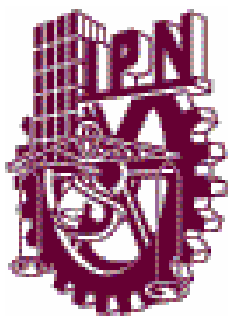
Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [carlitosctn@hotmail.com](mailto:carlitosctn@hotmail.com). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
Carlos Alberto Castañón Sánchez

Nombre y firma



SECRETARIA DE  
EDUCACION PUBLICA  
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL  
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA  
Y HOMEOPATIA  
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACION



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

---

---

**ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA  
Y HOMEOPATÍA**

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**INDUCCIÓN DE APOPTOSIS POR LA HEMOLISINA  
VACUOLIZANTE HlyA DE *Vibrio cholerae***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR**

**PRESENTA:  
CARLOS ALBERTO CASTAÑÓN SÁNCHEZ**

**DIRECTORA  
Dra. Paula Figueroa Arredondo**

**CODIRECTOR  
Dr. Fernando Enríquez Rincón**

**ASESORES  
Dra. Consuelo Gómez García  
Dr. Guillermo Pérez Ishiwara  
Dr. Juan Salas Benito**



**MÉXICO, D.F. 2005**

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Paula Figueroa Arredondo y el Dr. Fernando Enríquez Rincón en el laboratorio 20 del departamento de Biología Celular del CINVESTAV.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Paula Figueroa Arredondo por haberme dado la oportunidad de participar en este proyecto, por todo el apoyo brindado, por su tiempo, dedicación y paciencia, pero sobre todo por su valiosa amistad.

Al Dr. Fernando Enríquez Rincón por haber creído en mí, por brindarme su apoyo incondicional, por permitirme trabajar en su laboratorio y por haber sido parte fundamental en mi crecimiento profesional.

A la Dra. Consuelo Gómez García por su tiempo y gran disposición.

Al Dr. Guillermo Pérez Ishiwara por sus valiosas sugerencias.

Al Dr. Juan Salas Benito por su valioso tiempo y sus comentarios.

A la QFB Blanca Estela Reyes Márquez por el excelente apoyo brindado en la realización de mi trabajo experimental, por su enorme paciencia, disposición y amabilidad.

A Xochitl González Cid por su eficiente apoyo técnico y por su amistad.

A la QFB Leticia Zavala Alvarado por su apoyo brindado en este trabajo.

A la M. en C. Gabriela Tapia Pastrana por todo el apoyo brindado en la realización de mi trabajo experimental, por su increíble paciencia, por todos esos bellos momentos, pero sobre todo por su hermosa amistad. Gracias por existir.

Al M. en C. Carlos Alberto Torres por todo su apoyo y por su sincera amistad.

A Yuriday y Jafito por su increíble amistad, por no dejarme solo a pesar de la distancia y por seguir ahí (el uno, el dos, el tres).

A mis amigos Araceli, Yhara, Deckar, Octavio y Mauricio por estar conmigo desde el inicio.

A Patricia, Olivia, Eneyda y Adriana por todo su apoyo y cariño.

Al Dr. Juan Pedro Luna por su amistad y valiosa objetividad.

A mis compañeros de laboratorio por su apoyo: Liliana y Laura.

A mi familia por su apoyo incondicional y su inmenso cariño.

## **DEDICATORIAS**

**A la vida por haberme dado el hermoso regalo de crecer en una familia maravillosa.**

**A mis abuelos Jesús y Carmen por que sus bendiciones nos llegan cada día iluminando nuestros caminos.**

**A mi madre Elvia Sánchez Neri, por haberme dado la vida y hacer que cada día yo tenga un motivo por el cual seguir adelante, por todo su inmenso amor, por escucharme, comprenderme y por educarme con el ejemplo. Por no dejarme caer, por aguantar, por impulsarme, por que la vida contigo es única y especial. Por que es nuestro sueño. Por que nos tenemos el uno al otro. Por que así sea siempre.**

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	viii
<b>RESUMEN</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	11
<i>Vibrio cholerae</i> : taxonomía y clasificación serológica.....	11
Factores de virulencia.....	14
Hemolisina HlyA de <i>V. cholerae</i> .....	17
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	23
Efecto vacuolizante.....	23
Apoptosis: características generales .....	27
<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	31
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	32
Objetivo general.....	32
Objetivos específicos.....	32
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	33
Cepas microbianas .....	33
Medios de cultivo .....	34
Cultivos celulares.....	34
Cuantificación del efecto vacuolizante.....	35
Inductores de apoptosis.....	36
Ensayo de apoptosis con anexina V-FITC.....	37

Ensayo de apoptosis mediante la degradación de la PARP .....	38
Ensayo de apoptosis mediante la técnica de TUNEL .....	39
Ensayo de inhibición de canales aniónicos .....	40
<b>VI. RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
<b>Las células vacuolizadas por HlyA presentan signos de apoptosis .....</b>	<b>42</b>
Cuantificación del efecto vacuolizante .....	42
Ensayo de apoptosis por la tinción con anexina V-FITC .....	46
Ensayo de apoptosis por la degradación de la PARP .....	52
Ensayo de apoptosis por la fragmentación del DNA (TUNEL) .....	54
<b>La hemolisina HlyA es la causa de la vacuolización y apoptosis .....</b>	<b>59</b>
Inhibición de la vacuolización empleando anticuerpos anti-HlyA.....	59
Inhibición de la apoptosis empleando anticuerpos anti-HlyA.....	61
<b>Participación del canal aniónico en la vacuolización y apoptosis .....</b>	<b>67</b>
DIDS inhibe la vacuolización inducida por la hemolisina HlyA .....	67
DIDS inhibe la apoptosis inducida por la hemolisina HlyA .....	69
<b>VII. DISCUSIÓN .....</b>	<b>74</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>81</b>
<b>IX. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>82</b>
<b>X. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>83</b>



## ABREVIATURAS

AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
BSA	Albúmina Sérica Bovina
BCIP	5-Bromo 4-cloro 3 indol fosfato
CT	Toxina colérica
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbeccco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DIDS	4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid
EDTA	Etilén, diamino-tetra-acetato
HEPES	Acido 4-(hidroxietil-1-piperazinetanosulfónico)
InDRE	Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
LB	Luria-Bertani
NBT	Nitro azul de tetrazolio
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PARP	Poli ADP-ribosa polimerasa
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PS	Fosfatidilserina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SITS	4-aceamido-4'-isothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid
TdT	Desoxinucleotidil transferasa terminal

## LISTA DE FIGURAS

<b>Fig. 1.</b> Organización genética del locus <i>hly</i> .	19
<b>Fig. 2.</b> Dominios de la hemolisina HlyA.	20
<b>Fig. 3.</b> Patrón de agregación de la hemolisina HlyA.	22
<b>Fig. 4.</b> Efecto dosis dependiente en la inducción de la vacuolización.	43
<b>Fig. 5.</b> Efecto de sobrenadantes de <i>V. cholerae</i> en la vacuolización.	45
<b>Fig. 6.</b> Inducción de apoptosis con Actinomicina D en células Vero.	48
<b>Fig. 7.</b> Efecto dosis dependiente en la inducción de apoptosis.	50
<b>Fig. 8.</b> <i>V. cholerae</i> 69750 induce apoptosis en células Vero.	51
<b>Fig. 9.</b> <i>V. cholerae</i> 69750 induce apoptosis en células Jurkat.	53
<b>Fig. 10.</b> <i>V. cholerae</i> 69750 induce fragmentación de la PARP.	55
<b>Fig. 11.</b> Inducción de la fragmentación del DNA en células Vero.	57
<b>Fig. 12.</b> Inducción de la fragmentación del DNA en células Jurkat.	58
<b>Fig. 13.</b> Inhibición de la vacuolización con anticuerpos anti-HlyA.	60
<b>Fig. 14.</b> Inhibición de la apoptosis en células Vero (confocal).	62
<b>Fig. 15.</b> Inhibición de la apoptosis en células Vero (citometría).	63
<b>Fig. 16.</b> Inhibición de la apoptosis en células Jurkat (confocal).	64
<b>Fig. 17.</b> Inhibición de la apoptosis en células Jurkat (citometría).	65
<b>Fig. 18.</b> DIDS previene la vacuolización en células Vero.	68
<b>Fig. 19.</b> DIDS inhibe la apoptosis en células Vero.	71
<b>Fig. 20.</b> DIDS inhibe la apoptosis en células Jurkat.	72

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Biotipificación de <i>V. cholerae</i> .	14
<b>Tabla 2.</b> Título del efecto vacuolizante.	44

## RESUMEN

Las cepas toxigénicas de *Vibrio cholerae* que pertenecen a los serogrupos O1 y O139 son los agentes etiológicos de extensas epidemias y pandemias de cólera. El cólera se caracteriza por una diarrea aguda deshidratante causado por la toxina colérica (CT). Sin embargo, existen cepas de *V. cholerae* que carecen de los genes para la producción de CT, que se han asociado con enfermedades gastrointestinales. Se ha propuesto a la hemolisina HlyA como un importante factor de virulencia de estas cepas. La proteína HlyA es una toxina hemolítica capaz de lisar eritrocitos de diferentes especies, así como también células epiteliales en cultivo. Esta proteína tiene la capacidad de asociarse a la membrana de su célula blanco y formar un poro heptamérico con actividad de canal aniónico. Nuestro grupo demostró recientemente que la hemolisina HlyA induce la formación de vacuolas citoplásmicas en células epiteliales Vero en cultivo. Otros reportes indican que la actividad de canal aniónico formado por la hemolisina es responsable del proceso de vacuolización y de la muerte por lisis. En este trabajo investigamos la posible inducción de apoptosis por la hemolisina vacuolizante HlyA, como un mecanismo de muerte celular alternativo a la necrosis. Nuestros resultados indican que las células Vero vacuolizadas presentan marcadores tempranos de apoptosis cuando se tratan con sobrenadantes de *V. cholerae* 69750, una cepa no-O1 hiperproductora de la hemolisina HlyA. De manera interesante demostramos que las células linfoides Jurkat presentan también estos marcadores tempranos de apoptosis. Además, determinamos que la PARP, proteína procesada por caspasas cuando la apoptosis se establece como vía de muerte, es fragmentada en las células Jurkat tratadas con el sobrenadante de la cepa 69750, sugiriendo que la fragmentación de la PARP es parte de los eventos inducidos por la hemolisina HlyA. Sin embargo, esta fragmentación no fue detectada en las células Vero vacuolizadas. En este trabajo determinamos mediante la técnica de TUNEL, que las células Vero y Jurkat tratadas con el sobrenadante de la cepa 69750 presentan fragmentación del DNA, una característica clásica de la muerte celular vía apoptosis. Experimentos en los que se utilizaron anticuerpos anti-hemolisina HlyA, mostraron que el bloqueo de esta proteína inhibe la apoptosis en células Vero y Jurkat tratadas con sobrenadantes de la cepa vacuolizante 69750. Interesantemente, determinamos que la utilización del inhibidor de canales aniónicos DIDS es capaz de prevenir la vacuolización de células Vero, además de inhibir la fragmentación del DNA en células Jurkat y en células Vero. Los resultados de nuestro trabajo muestran que la hemolisina vacuolizante es capaz de inducir apoptosis en células Vero y Jurkat. Además, nuestro trabajo sugiere fuertemente que el canal aniónico formado por la hemolisina HlyA es responsable de la inducción de apoptosis en ambas líneas celulares.

## ABSTRACT

*Vibrio cholerae* toxigenic strains belonging to O1 and O139 serogroups are the etiologic agents of cholera epidemics and pandemics. Cholera is characterized by an acute dehydrating diarrhea caused by the cholera toxin (CT). However, there are strains lacking the genes for CT production and still are able to cause gastrointestinal diseases. It has been suggested that the *V. cholerae* hemolysin HlyA is a cytotoxin that may play an enteropathogenic role in the absence of other known virulence factors. The HlyA protein is a hemolytic toxin able to damage erythrocytes of different species and epithelial cells from cultures. This protein binds and assembles on target cell membranes forming heptameric pores with anionic channel activity. We recently demonstrated that HlyA induced cytoplasmic vacuoles on Vero epithelial cells in cultures. Others works indicate that the anionic channel formed by the hemolysin is responsible for the vacuolation and death by lysis. In this work, we investigated the possible apoptosis induction by the vacuolating hemolysin HlyA, as an alternative cell death mechanism to necrosis. Our results indicated that vacuolized Vero cells presented markers of early apoptosis events when treated with supernatants from non-O1 *V. cholerae* 69750 HlyA hyperproducer strain. Interestingly, we demonstrated that Jurkat lymphoid cells presented markers of early apoptosis too. Moreover, we determined PARP fragmentation associated with caspase activation in Jurkat cells treated with supernatants of strain 69750. However, PARP fragmentation was not detected in vacuolating Vero cells. In this work we show that both Vero and Jurkat cell lines treated with supernatants of 69750 strain underwent apoptosis as determined by the TUNEL technique and furthermore, this effect was totally abrogated in the presence of rabbit anti-HlyA antisera. Interestingly, we show that using DIDS that blocks anionic channel activity and prevents cell vacuolation, we were able to inhibit apoptosis in both Vero and Jurkat cells. Our results demonstrate that vacuolating hemolysin is capable to induces apoptosis in Vero and Jurkat cells. Moreover, our work strongly suggests that the anionic channel formed by the HlyA hemolysin, is responsible to induce apoptosis in both cell lines.

# I. INTRODUCCIÓN

## ***Vibrio cholerae*: taxonomía y clasificación serológica**

El cólera epidémico causado por *Vibrio cholerae* toxigénico perteneciente a los serogrupos O1 y O139 es un grave problema en salud pública en muchos países en desarrollo. La enfermedad se caracteriza por una diarrea aguda deshidratante causada principalmente por la toxina colérica (CT), enterotoxina producida por estos microorganismos durante la patogénesis de la enfermedad (Faruque and Nair, 2002). En su forma severa, los pacientes llegan a presentar shock hipovolémico, acidosis y la muerte si el tratamiento adecuado no es iniciado a tiempo.

Dos características epidemiológicas distintivas del cólera son: la tendencia a aparecer en brotes explosivos, siempre y cuando inicien en focos distintos simultáneamente, y su propensión para causar verdaderas pandemias, que afectan progresivamente muchos países en múltiples continentes en el transcurso de varios años (Kaper et al, 1995).

El género *Vibrio* incluye muchas especies diferentes, de las cuales pocas son patogénicas. El ejemplo clásico de especies patógenas de este género es *V. cholerae*, una bacteria curva Gram-negativa, móvil por un solo flagelo polar, no esporulada, que mide 1.4-2.6  $\mu\text{m}$  de largo. Este microorganismo es anaeróbico facultativo, capaz de presentar metabolismo respiratorio y fermentativo, es oxidasa positiva y reduce nitratos y su crecimiento es estimulado por la adición de cloruro de sodio.

El genoma de *V. cholerae* está constituido por dos cromosomas circulares, el cromosoma I comprende 2.96 megabases y el cromosoma II está integrado por 1.07 megabases. Ambos cromosomas tienen la misma

cantidad de guanina y citosina, constituyendo aproximadamente el 47% de nucleótidos del genoma. Estos datos sugieren que estas dos unidades de replicación (replicones) han coexistido juntas por un largo período de tiempo. En el cromosoma I se encuentran genes que participan en funciones esenciales de la célula, como la replicación del DNA, la división celular, la transcripción, los genes involucrados en procesos de traducción y biosíntesis de la pared celular. El cromosoma II está integrado por genes involucrados en el transporte y metabolismo de azúcares, en el transporte de iones y aniones, en la síntesis de proteínas ribosomales y en la reparación del DNA (Waldor, 2000).

Entre las especies que integran el género *Vibrio*, *V. cholerae* es una especie bien definida con base a pruebas bioquímicas y estudios de homología del DNA, sin embargo, no es homogénea en muchos aspectos, por ejemplo, se han realizado distinciones importantes dentro de la especie con respecto al serogrupo, producción de toxina colérica y potencial para ocasionar brotes epidémicos. La serotipificación está dada con base en el antígeno O estable que se encuentra en la superficie de la bacteria (Chatterjee and Chaudhuri, 2003). A la fecha, se han identificado 206 serogrupos de *V. cholerae* (Faruque and Nair, 2002). Anteriormente, todas las epidemias de cólera fueron causadas por cepas de *V. cholerae* que pertenecían al serogrupo O1. Este conocimiento fue válido hasta que un nuevo serogrupo, el O139, surgió en 1992 causando una extensa epidemia en la India. Solo aquellas cepas de los dos serogrupos, O1 y O139, que producen toxina colérica están asociadas con el cólera epidémico, sin embargo, hay cepas de estos serogrupos que carecen de los genes *ctxAB*,

por lo tanto no producen CT, no causan cólera y tampoco están involucradas en epidemias. No obstante existen cepas que pertenecen a serogrupos diferentes al O1 y O139 que han producido brotes ocasionales de cólera, estas cepas no se han asociado con grandes epidemias o pandemias extensas (Chatterjee and Chaudhuri, 2003).

Las diferencias en la composición del antígeno somático O son la base de la clasificación serológica de *V. cholerae*. El antígeno O es estable al calor y está compuesto de homopolímeros de D-perosamina. Los diferentes grupos O son referidos como serogrupos o serovares (Kaper et al, 1995). El serogrupo O1 se divide en tres formas antigénicas denominadas Inaba, Ogawa e Hikojima, las cuales se mencionan como serotipos o subtipos. El antígeno O de *V. cholerae* O1 consiste de tres factores designados A, B y C. El Factor A es un homopolímero de D-perosamina, pero la naturaleza de los factores B y C se desconoce. Las diferencias entre los serotipos suelen ser cuantitativas. Las cepas Ogawa exhiben los antígenos A, B y pequeñas cantidades de C. Mientras que las cepas Inaba muestran solo los antígenos A y C. Las cepas Hikojima contienen los tres factores, sin embargo, este fenotipo no es del todo reconocido como un serotipo más por el hecho de ser raro e inestable (Kaper et al, 1995). Las cepas de *V. cholerae* O1 se han dividido en dos biotipos, Clásico y El Tor. Esta subdivisión se basa en las pruebas descritas en la tabla 1 (Chatterjee and Chaudhuri, 2003).

Entre 1817 y 1961, ocurrieron seis pandemias de cólera. El biotipo Clásico fue el responsable de la quinta y la sexta pandemia y se cree que está asociada con las primeras pandemias ocurridas, sin embargo, no existe

evidencia de ello. El agente causal de la séptima y actual pandemia de cólera, que inició en 1961, pertenece al biotipo El Tor.

**Tabla 1. Principales pruebas empleadas para la biotipificación de *V. cholerae***

Prueba	Respuesta de los biotipos	
	Clásico	El Tor
Hemólisis de eritrocitos de carnero	-	+/-
Aglutinación de eritrocitos de pollo	-	+
Reacción de Voges-Proskauer	-	+
Inhibición por polimixina B (50 µg)	+	-
Lisis por el fago Gr. IV	+	-
Lisis por el fago FK	+	-

### **Factores de virulencia**

Las principales características de la patogénesis del cólera ya han sido establecidas. La infección debida a *V. cholerae* inicia con la ingesta de agua o alimentos contaminados. Después de superar la barrera ácida del estómago, la bacteria coloniza el epitelio del intestino delgado principalmente por medio del pili regulado por la toxina conocida como TCP, la adhesina



más importante. Aunque posiblemente otros factores de colonización como son diferentes hemaglutininas, el factor de colonización accesorio, y el pili codificado por *core*, tengan un papel relevante en este primer paso de la patogénesis del cólera (Taylor et al, 1987).

La enterotoxina colérica producida por los vibrios adheridos, se secreta a través de la membrana externa bacteriana al ambiente extracelular y se introduce a la célula a través de la unión de la subunidad B pentamérica con el gangliosido receptor GM1. Una vez dentro de la célula, la subunidad A termina alterando el transporte de iones en las células del epitelio intestinal (Lencer, 2001). La subsecuente pérdida de agua y electrolitos conduce a la diarrea severa característica del cólera.

Históricamente fue Robert Koch quien sugirió la existencia de la toxina colérica en 1884, aunque ésta se demostró 75 años después por De (1959). La purificación y el análisis estructural de la toxina mostraron que consiste de una subunidad A y cinco subunidades B idénticas (Finkelstein and Lospalluto, 1969). La subunidad A está compuesta por dos dominios estructurales denominados péptido A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>. El péptido A<sub>1</sub> es la subunidad que posee una actividad enzimática específica, actúa intracelularmente incrementando los niveles de AMPc cambiando la tendencia de absorción del intestino delgado por secreción.

Es claro que la producción de CT por *V. cholerae* es relevante, desde el punto de vista de que un serogrupo adquirió el potencial para causar epidemias. Esto ha sido evidenciado desde el surgimiento de *V. cholerae* O139. En *V. cholerae* toxigénico O1 y O139 se identificó una región de 4.5 kb que fue denominada cassette de virulencia (Trucksis et al, 1993), pero no

la presentan las cepas no toxigénicas. Se sabe que al menos seis genes son los elementos que integran esta región de virulencia. Estos genes incluyen *ctxAB* (que codifica para las subunidades A y B de CT); *zot* que codifica para la toxina que altera a nivel de la zonula occludens: ZOT (Fasano et al, 1991); *cep*, el pili codificado por la región core (Pearson et al, 1993); *ace*, la enterotoxina accesoria del core y *orfU*, cuyo producto es de función desconocida (Truckis et al, 1993). Muchas cepas del biotipo El Tor tienen elementos de inserción en secuencias repetidas (RS) en ambos lados del core, las cuales se infiere que dirigen la integración sitio específica del DNA del cassette de virulencia en el cromosoma de *V. cholerae* (Mekalanos, 1985; Goldberg and Mekalanos, 1986; Pearson et al, 1993). La región del core junto con las secuencias RS que la flanquean conforman el elemento genético de la toxina colérica CTX (Mekalanos, 1983).

Diversos estudios de genética molecular e inducción del ciclo lítico con mitomicina han demostrado que el elemento CTX constituye el genoma de un bacteriófago filamentoso (CTX $\phi$ ). El fago puede ser propagado en cepas de *V. cholerae* receptoras, en las que el genoma CTX $\phi$  se integra al cromosoma bacteriano formando lisógenos estables. Sin embargo, el fago puede permanecer en forma replicativa fuera del cromosoma (Waldor and Mekalanos, 1996).

La caracterización genética más reciente del elemento CTX $\phi$  reveló que consiste de dos regiones funcionalmente diferentes, las regiones core y RS2. La región core codifica para CT y los genes involucrados en la morfogénesis del fago, mientras que RS2 codifica para genes requeridos en la replicación, integración y regulación de CTX $\phi$  (Waldor et al, 1997). CTX $\phi$

puede ingresar a la célula de *V. cholerae* mediante un organelo localizado en la superficie de la bacteria denominado pili co-regulado por toxina (TCP) el cual es un elemento requerido para la colonización intestinal, ya que codifica para la adhesina más importante en la enfermedad. Estos genes son incorporados en el cromosoma del hospedero induciendo la secreción de CT.

El producto del gen *zot* incrementa la permeabilidad de la mucosa intestinal por su efecto deletereo sobre la estructura de las uniones estrechas (Fasano et al, 1991), mientras que el producto del gen *ace* es una toxina que afecta el transporte de iones del epitelio intestinal; ambos eventos conducen a una pérdida de líquidos y diarrea.

Un factor cuyo gen reside fuera del elemento genético CTX y que probablemente contribuye en el proceso de la enfermedad es la hemolisina HlyA (Honda and Filkenstein, 1979). En contraste con la secreción de líquidos producida por CT que no posee características hemorrágicas, la hemolisina es capaz de causar acumulación de fluidos con presencia de sangre y moco en experimentos realizados en asa ligada de conejo. Es decir, ya se ha demostrado que la proteína HlyA es una toxina secretora y hemorrágica (Ichinose et al, 1987).

### **Hemolisina HlyA de *V. cholerae***

Tradicionalmente, *V. cholerae* biotipo El Tor se diferencia de cepas pertenecientes al biotipo Clásico con base en su capacidad para causar hemólisis de eritrocitos de carnero y cabra. *V. cholerae* biotipo El Tor es el agente causal de la séptima pandemia de cólera, sin embargo, durante la

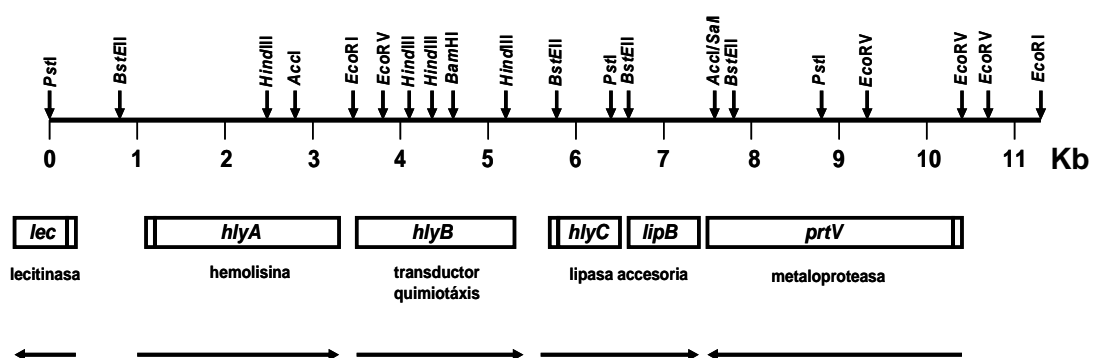
evolución de la misma, muchos aislamientos de cepas El Tor perdieron su capacidad para inducir hemólisis o la expresaron débilmente, aunque el síndrome clínico del cólera es idéntico en los dos biotipos (Honda and Finkelstein, 1979).

La hemolisina HlyA se purificó inicialmente a partir de una cepa del biotipo El Tor por Honda y Finkelstein (1979), demostrando su alta capacidad hemolítica en eritrocitos de conejo, cabra, ratón y carnero; sin embargo, en eritrocitos de pollo, caballo y humano se obtuvo baja capacidad hemolítica. Además de su actividad hemolítica, la proteína demostró ser citotóxica, cardiotóxica y letal en un modelo de ratón (Honda and Finkelstein, 1979; Yamamoto et al, 1984).

La administración de 25  $\mu$ g de la hemolisina purificada produjo acumulación de fluidos en asa ligada de conejo y actividad citotóxica de la mucosa demostrada mediante observación histológica (Yamamoto et al, 1984; Ichinose et al, 1987). También se demostró que la hemolisina purificada a partir de cepas de *V. cholerae* no-O1 es biológica, fisicoquímica e inmunológicamente indistinguible de la hemolisina de *V. cholerae* del biotipo El Tor (Yamamoto et al, 1986). Estos hallazgos sugirieron que la hemolisina podría contribuir a la patogénesis de las gastroenteritis causadas por algunas cepas de *V. cholerae* que carecen de los genes que codifican para la toxina colérica.

La hemolisina HlyA está codificada en la región *hly* (Fig. 1) del cromosoma II (Goldberg and Murphy, 1985; Ogierman et al, 1997), la cual consta de los genes estructurales *hlyA*, *hlyB* y *hlyC* (Manning et al, 1984). Una delección en el gen *hlyA* produjo la pérdida en la actividad hemolítica de

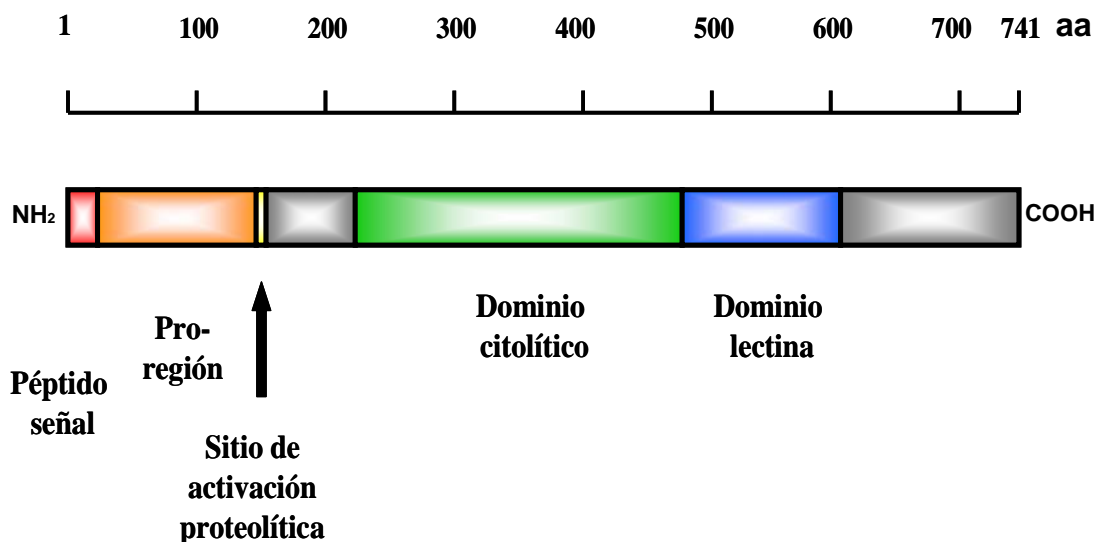
*V. cholerae* El Tor, demostrándose que es el producto del gen *hlyA* el que codifica directamente para la síntesis de la hemolisina (Yamamoto et al, 1990). Adyacente al gen *hlyA* se encuentra el gen *hlyB*, que codifica para una proteína de 60.3 kDa que se encuentra asociada a la membrana externa de la bacteria. Mutaciones en *hlyB* afectan la secreción de la hemolisina en etapas de crecimiento exponencial, en donde la hemolisina se localiza dentro de la bacteria y se libera solo en la fase estacionaria (Alm and Manning, 1990). El gen *hlyC* codifica para una proteína de 30 kDa con actividad de lipasa, sin embargo, mutaciones en este gen no afectan la secreción de la proteína HlyA (Ogierman et al, 1997). Se ha sugerido que la proteína de unión al DNA HlyU, cuyo gen se localiza en el cromosoma II fuera del locus *hly*, regula la expresión de la hemolisina, debido a que mutaciones en este gen provocan una deficiente producción de la proteína HlyA (Williams et al, 1996).



**Fig. 1. Organización genética del locus *hly*.**  
(Ogierman et al, 1997)

Stoebner et al (1988), determinaron que la síntesis de la hemolisina HlyA puede estar regulada coordinadamente con la síntesis de un sideroforo de *V. cholerae* denominado vibriobactina. La producción de vibriobactina y de hemolisina en medio con concentraciones bajas de hierro se reprime al adicionar hierro al medio, pero no hay pruebas de que la hemolisina esté relacionada con la captación de hierro “*per se*”.

La hemolisina HlyA se sintetiza en la bacteria como una pre-pro-toxina de 82 kDa, la cual se procesa como una pro-toxina de 79 kDa después de haber perdido un péptido señal, esto sucede durante la secreción a través de la membrana interna de *V. cholerae* (Fig. 2). La pro-toxina se procesa como una proteína madura activa de 65 kDa después de haber perdido un polipéptido de 15 kDa del extremo amino terminal, esto ocurre en el espacio periplásmico y en el medio extracelular (Yamamoto et al, 1990; Hall and Drasar, 1990).



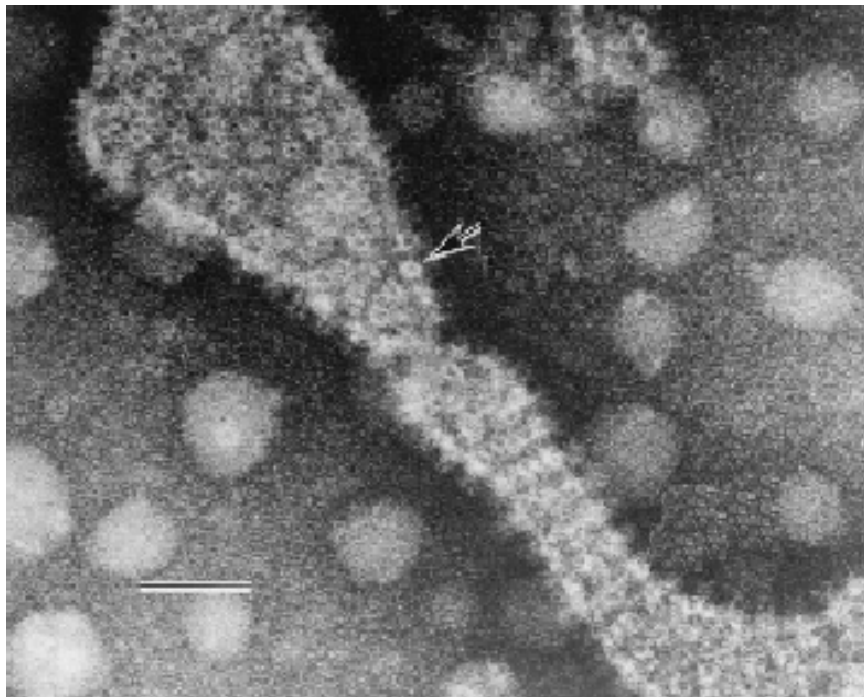
**Fig. 2. Representación de los diferentes dominios de la hemolisina vacuolizante HlyA (Olson et al, 2003).**

Datos experimentales sugieren que el procesamiento proteolítico de la pro-toxina es un paso esencial en la activación de la hemolisina, y que ésta ruptura ocurre entre los aminoácidos Ala-157-Asn-158. Una hemaglutinina/proteasa secretada por *V. cholerae* es capaz de procesar a la hemolisina y convertirla en forma activa, sin embargo, se ha determinado que enzimas como la tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina, subtilisina, papaína y metaloproteinasa ADAM-17 son capaces de realizar este procesamiento. Todas estas proteasas tienen sitios de corte diferentes entre los aminoácidos Leu-146 y Asn-158. Se desconoce la proteasa que activa a la pro-toxina en el sitio nativo del procesamiento y las consecuencias estructurales de eventos de procesamientos alternativos (Nagamune et al, 1996; Valeva et al, 2004).

La hemolisina HlyA de *V. cholerae* es una proteína formadora de poros, el proceso de formación del poro involucra la unión reversible de monómeros de 65 kDa a la membrana de la célula blanco (Saha et al, 1997). Subsecuentemente, los monómeros se ensamblan formando un oligómero casi siempre heptamérico que se inserta en la membrana de la célula. Este mecanismo de daño a la membrana explica la actividad hemolítica de la proteína HlyA. Se ha demostrado que la hemolisina se une específicamente a glicoproteínas con motivos terminales  $\beta$ -1 galactosil, a través de su extremo carboxilo. Además, se ha establecido que la presencia de colesterol en la membrana de la célula blanco induce la oligomerización de la proteína HlyA (Zitzer et al, 2001; Chattopadhyay et al, 2002; Harris et al, 2002; Chattopadhyay et al, 2003). Se ha descrito que la glicoforina B, una sialoglicoproteína presente en la membrana de los eritrocitos humanos, es

un receptor de la hemolisina; sin embargo, aún se desconoce la naturaleza del receptor para la proteína HlyA en células nucleadas (Zhang et al, 1999).

Mediante estudios realizados en eritrocitos, membranas lipídicas planares y liposomas, se ha fotografiado a la hemolisina formando un poro heptamérico de 0.9-1.0 nm de diámetro (Fig. 3). Se ha demostrado que dicho poro, formado por la hemolisina es selectivamente permeable a iones  $K^+$ , pero no a iones  $Ca^{2+}$ . Además, se ha determinado que la formación del poro tiene como consecuencia la permeabilización de la membrana, induciendo de esta manera la muerte de la célula por necrosis (Ikigai et al, 1996; Zitzer et al, 1997; Zitzer et al, 1999; Harris et al, 2002).



**Fig. 3. Micrografía electrónica de membranas de eritrocitos tratadas con la hemolisina HlyA, en donde se observa el patrón de agregación de los oligómeros y la formación de un poro (Ikigai et al, 1996).**



## II. ANTECEDENTES

### Efecto vacuolizante

Un modelo para determinar la toxicidad de productos secretados por patógenos bacterianos, es el estudio del efecto de sobrenadantes de cultivos sobre líneas de células eucarióticas bajo condiciones controladas *in vitro*. En este contexto, se analizó el efecto de sobrenadantes a diferentes diluciones obtenidos de cepas de *V. cholerae* no-O1 aisladas a partir de muestras fecales de pacientes mexicanos con diarrea, y se describió la actividad vacuolizante en células Vero, logrando demostrar que este efecto es causado por la hemolisina HlyA (Figuroa-Arredondo et al, 2001). La actividad vacuolizante se ha encontrado de manera independiente en cepas de *V. cholerae* no epidémicas de la India y Brasil, indicando que este fenómeno es universal (Mitra et al, 2000; Coelho et al, 2000),

Inicialmente, esta vacuolización evoca a la causada por la citotoxina vacuolizante VacA de *Helicobacter pylori* (Cover and Blaser, 1992). Sin embargo, observaciones más cuidadosas evidenciaron diferencias entre ambos efectos. Las vacuolas inducidas por VacA y HlyA responden de manera diferente a tratamientos con desestabilizadores del sistema endosomal, como espermidina y NH<sub>4</sub>Cl, los cuales estimulan la vacuolización causada por *H. pylori*, pero no la inducida por *V. cholerae* (Figuroa-Arredondo et al, 2001). Contrario a la vacuolización causada por la proteína VacA, el efecto vacuolizante inducido por la hemolisina se exagera por tratamientos con la concanamicina B, un inhibidor de la vATPasa que bloquea el bombeo de protones hacia los compartimentos vacuolares. Además, las vacuolas inducidas por VacA captan el colorante rojo neutro de

manera uniforme, indicando la naturaleza ácida de las mismas. Sin embargo, solo algunas vacuolas inducidas por la hemolisina HlyA se tiñen con este colorante, indicando la presencia de vacuolas tanto ácidas como no ácidas dentro de una misma célula. Este hecho denota la diferencia en los microambientes vacuolares en la intoxicación con la hemolisina HlyA y establece que existe un doble origen de estas vacuolas, endosomal y no endosomal (Figuroa-Arredondo et al, 2001).

La capacidad de producir actividad vacuolizante varía entre cepas de *V. cholerae*. Una diferencia principal es que en general, las cepas toxigénicas del biotipo El Tor son deficientes productoras de la hemolisina, por lo que no son cepas altamente hemolíticas. En tanto que las cepas no-O1, siendo *ctx* son eficientes productoras de la hemolisina, por lo tanto son altamente hemolíticas e inducen vacuolización *in vitro* de manera eficaz.

Mediante estudios hechos en cepas *V. cholerae* no-O1 en el InDRE, se encontró que la cepa 52201, aislada de una paciente en el estado de Oaxaca, mostró títulos altos de vacuolización al igual que la cepa 69750 aislada en 1995 en el estado de Tamaulipas. Por lo tanto, ambas cepas se conservaron por su calidad de hiperproductoras de HlyA. Alícuotas altamente diluidas del sobrenadante de la cepa 52201 (1:500) indujeron vacuolización en células Vero, 2 h después del tratamiento. Con alícuotas sin diluir fue posible observar que las células se redondean, se desprenden de su sustrato y eventualmente se lisan (Figuroa-Arredondo et al, 2001).

Otros estudios han caracterizado la localización intracelular de la hemolisina. La intoxicación de células Vero durante 4 h con la hemolisina purificada, permitió detectar que la proteína HlyA es internalizada y que se

encuentra asociada a membranas que forman numerosas vacuolas en el citoplasma de las células. También se ha demostrado que las vacuolas presentan marcadores de diferentes compartimentos intracelulares, como son la proteína rab7, una GTPasa que regula etapas tardías de tráfico endosomal; LAMP-1, una glicoproteína asociada a lisosomas y elementos de compartimentos trans-Golgi. Sin embargo, no se lograron detectar vacuolas con marcadores de endosomas tempranos, como son los receptores de transferrina y calreticulina. Estas evidencias corroboran que las vacuolas inducidas por la hemolisina HlyA se originan de más de un tipo de compartimiento de naturaleza ácida (Moschioni et al, 2002).

Con base en datos preliminares que indican que la hemolisina HlyA es capaz de formar un canal aniónico selectivo permeable a iones (Krasilnikov et al, 1992; Menzl et al, 1996), se utilizaron inhibidores de canales aniónicos para determinar si el canal formado por la hemolisina HlyA participa en el efecto vacuolizante. Empleando como modelo de vacuolización células Vero intoxicadas con hemolisina purificada, Moschioni et al (2002), utilizaron los inhibidores de canales aniónicos DIDS y SITS. Los resultados obtenidos mostraron una eficiente inhibición de la vacuolización de manera dosis dependiente, además, ambos inhibidores fueron capaces de prevenir la lisis celular después de 24 h de incubación con la toxina; esto último fue detectado mediante la exclusión al azul tripano. Estos datos sugieren que el canal aniónico de la hemolisina HlyA es la lesión molecular en la célula, que eventualmente resulta en la formación de vacuolas y también en la muerte por lisis (Figuroa-Arredondo et al, 2001; Moschioni et al, 2002).

Dada la ausencia de información publicada que explique de que manera, la hemolisina HlyA de *V. cholerae* es capaz de inducir muerte celular como consecuencia de su condición citotóxica, resulta interesante encontrar que varios reportes han indicado la capacidad de VacA de *H. pylori* para inducir apoptosis en células epiteliales gástricas *in vitro* e *in vivo* (Rudi et al, 1998; Peek et al, 1999; Kuck et al, 2001). A pesar de que se han reportado múltiples factores pro-apoptóticos en *H. pylori*, recientemente se ha demostrado que la toxina VacA es suficiente para inducir apoptosis mediante un mecanismo dependiente de mitocondria (Galmiche et al, 2000; Cover et al, 2003). VacA es capaz de alcanzar la mitocondria y alterar la permeabilidad de la membrana mitocondrial, por un mecanismo dependiente de la actividad del canal de la toxina (dado que es sensible a la actividad de DIDDS Y SITS), que resulta en la liberación de citocromo c. Este modelo representa un nuevo mecanismo para la inducción de apoptosis por la vía intrínseca, ejercido por una toxina bacteriana secretada por *H. pylori* (Willhite et al, 2004).

Las evidencias que demuestran que la hemolisina de *V. cholerae* exhibe actividad vacuolizante en células nucleadas resultan muy interesantes por varias razones. Primero, solo otras pocas toxinas bacterianas con actividad vacuolizante han sido identificadas, como son la aerolisina, una toxina formadora de poros producida por *Aeromonas hydrophila* (Abrami et al, 1998), y la toxina VacA de *H. pylori* (Cover et al, 1992). Segundo, las hemolisinas en su carácter de toxinas formadoras de poros, son factores de patogenicidad preponderantes en otras bacterias como *V. parahemolyticus* por ejemplo (Huntley et al, 1993). Los

antecedentes que determinan que la proteína HlyA induce vacuolización, deja abierta la posibilidad que esta toxina pueda contribuir con los síntomas gastrointestinales asociados con infecciones provocadas por algunas cepas de *V. cholerae*, particularmente en las infecciones que involucran cepas no-O1 que no expresan enterotoxinas bien establecidas, como la toxina colérica. Finalmente, se ha determinado que la hemolisina en concentraciones altas ( $> 60 \text{ pM}$ ) es capaz de inducir lisis en células nucleadas (Moschioni et al, 2002), sin embargo, se desconoce si la proteína al vacuolizar las células, ejerce un mecanismo de muerte celular alternativo a la necrosis. Por lo que en este trabajo abordaremos la posibilidad de que la proteína HlyA sea capaz de inducir apoptosis en las células vacuolizadas y en el modelo de células Jurkat, empleadas tradicionalmente en estudios de inducción de apoptosis.

### **Apoptosis: características generales**

Algunas proteínas secretadas por patógenos bacterianos se han definido como toxinas debido a su capacidad de causar muerte celular, induciendo cambios que alteran la forma y la función celular normal. Las toxinas bacterianas pueden activar vías de señalización que lleven a un incremento en la expresión de genes y/o a un arresto en las vías de supervivencia. De esta manera y dependiendo del tipo celular utilizado en su estudio, las toxinas pueden inducir la muerte celular por necrosis o apoptosis, esto ocurre al alterar vías de señalización sin ocasionar muerte de la célula, o inducir la expresión de citocinas que exacerban la inflamación local o el desarrollo de enfermedades sistémicas (Cherla et al, 2003).

La apoptosis, definida como muerte celular programada y la necrosis, se consideran actualmente las dos principales vías de muerte celular (Danial et al, 2004; Cherla et al, 2003). En algunos casos, la necrosis es un proceso pasivo que se caracteriza por la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y lisis, seguida de inflamación debido a la liberación del contenido celular en la periferia. En contraste, la apoptosis es un proceso activo, caracterizado por cambios morfológicos que incluyen disminución del volumen celular asociado con la condensación del citoplasma y vacuolización, pérdida de la asimetría de los fosfolípidos de membrana, ondulamiento de la membrana plasmática, formación de cuerpos apoptóticos, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y pérdida de la adhesión celular. Una línea celular de linfocitos T, las células Jurkat, se han empleado como el modelo clásico para dilucidar las vías de señalización involucradas en eventos de muerte celular vía apoptosis (Abraham and Weiss, 2004).

La apoptosis se inicia en respuesta a estímulos que activan cascadas de señalización programadas. Los constituyentes citoplásmicos no se liberan al medio extracelular y por este hecho, la inflamación no es consecuencia de la muerte por apoptosis. Los cuerpos apoptóticos se internalizan y se procesan generalmente por células fagocíticas (Danial et al, 2004; Cherla et al, 2003).

La principal característica bioquímica de la apoptosis es la fragmentación internucleosomal del DNA genómico. Dicha fragmentación parece ser que consiste de un proceso en múltiples pasos, en el que primero el DNA se corta en fragmentos largos de una longitud entre 50 y 200 kb y

subsecuentemente se degrada en unidades nucleosomales de 180-200 pb. La presencia del DNA fragmentado se detecta mediante la técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotide Transferase dUTP Nick End Labeling), en donde los fragmentos generados son sustratos para la desoxiribonucleotidil transferasa terminal (TdT), enzima que incorpora desoxinucleótidos marcados (de manera independiente de templado) en los grupos hidroxilo al extremo 3' del DNA fragmentado (Guimarães and Linden, 2004).

El estrés intracelular y la señalización mediada por receptores son estímulos que pueden activar la muerte celular por la vía apoptótica, sin embargo, estas señales convergen en una maquinaria intracelular evolutivamente conservada, que involucra la activación secuencial de caspasas (Nagata, 2000). Las caspasas son cisteína proteasas que se encuentran en la célula como precursores inactivos o pro-caspasas y se clasifican como iniciadoras y efectoras. Las caspasas iniciadoras (caspasas 1, 2, 4, 5, 8, 9,10 y 14) se activan mediante un autoprocesamiento inducido por la oligomerización de las mismas, mientras que las caspasas efectoras (caspasas 3, 6 y 7) se activan por acción de otras proteasas, las cuales incluyen a las caspasas iniciadoras y la granzima B. Las caspasas efectoras tienen la capacidad de procesar proteolíticamente diversos sustratos celulares, un evento clásico de la muerte por apoptosis (Guimarães and Linden, 2004).

La muerte celular programada con características apoptóticas se activa en la célula a través de dos vías, que pueden iniciar la señal ya sea desde fuera de la célula o bien desde dentro de la célula. La vía extrínseca requiere la unión de una molécula ligando a un receptor de muerte en la

superficie de la célula. Estos receptores se caracterizan por poseer un dominio de muerte localizado intracelularmente en donde reclutan diferentes proteínas adaptadoras y pro-caspasa 8, la cual se activa convirtiéndose en caspasa madura por autoprocesamiento, iniciando de esta manera los eventos de proteólisis. La vía intrínseca o mitocondrial involucra la pérdida del potencial de membrana de la mitocondria, la liberación de citocromo c de la mitocondria hacia el citoplasma y la activación de la pro-caspasa 9. La activación de la caspasa 8 o la 9 por cualquiera de las vías conduce a la activación de una caspasa en la que convergen ambas, la caspasa 3, la cual activa a la DNasa que ejecuta la fragmentación internucleosomal del DNA, característica del proceso apoptótico (Cherla et al, 2003).

Una vez que las caspasas se activan, estas proteasas degradan sus blancos proteicos para completar la fase de ejecución de la apoptosis. La fragmentación de la PARP (poli ADP-ribosa polimerasa) por la caspasa 3, es uno de los eventos tempranos de degradación proteica (Duriez et al, 1997). La PARP es una enzima nuclear que juega un papel multifuncional en numerosos procesos celulares que incluyen proliferación, replicación, respuesta a estrés, toxicidad celular, reparación y recombinación del DNA, y en apoptosis (Wang et al, 1997). Se ha reportado que en etapas tempranas de apoptosis, la PARP se procesa en dos fragmentos de 89 kDa y 24 kDa. Se ha sugerido que la fragmentación de la PARP puede ser utilizado como un marcador en el estudio de muerte celular vía apoptosis (Duriez et al, 1997).



### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Varios autores desde tiempo atrás han descrito la capacidad de la hemolisina HlyA de lisar eritrocitos de diferentes especies; sin embargo, dentro de la patogenicidad de *V. cholerae* este mecanismo no ha podido ser ubicado, ya que este microorganismo no presenta una vía hematógica durante la infección.

Estudios realizados por nuestro grupo demostraron que las células epiteliales vacuolizadas mediante tratamiento con sobrenadantes de cepas de *V. cholerae* hiperproductoras de la hemolisina HlyA perdían contactos intercelulares y con el sustrato. Eventualmente, estas células se redondeaban y finalmente se desprendían.

Por otra parte, en estudios recientes se ha determinado que la proteína vacuolizante VacA, secretada por *H. pylori*, además de causar vacuolización en células de origen epitelial, es capaz de inducir apoptosis, y que la vía de activación de este mecanismo de muerte es iniciado intrínsecamente.

Se desconoce cual es el destino final de las células que presentan efecto de vacuolización inducido por la proteína HlyA. Por lo que en este trabajo nos proponemos determinar cual es el mecanismo de muerte predominante en células intoxicadas por la hemolisina vacuolizante HlyA planteando como hipótesis probable que se trate de la vía apoptótica.

## IV. OBJETIVOS

### Objetivo general

Determinar la participación de la hemolisina vacuolizante HlyA de *V. cholerae* en la inducción de muerte celular vía apoptosis.

### Objetivos específicos

1. Reproducir el efecto vacuolizante empleando sobrenadantes ricos en hemolisina obtenidos a partir de una cepa de *V. cholerae*.
2. Determinar si las células vacuolizadas por HlyA presentan signos tempranos de apoptosis, como es la pérdida de la asimetría de la membrana externa de la célula intoxicada.
3. Determinar si la proteína PARP está relacionada con el mecanismo de apoptosis inducido por HlyA.
4. Determinar si las células intoxicadas por HlyA presentan signos tardíos de apoptosis como son la fragmentación y degradación internucleosomal del DNA vía nucleasas.
5. Proponer un mecanismo probable de muerte celular causada por la hemolisina HlyA.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas microbianas

Hemos incluido en este estudio 3 cepas de *V. cholerae* que presentan diferentes características antigénicas. *V. cholerae* 69750 es una cepa no-O1 que carece de los genes para la producción de la toxina colérica (determinado por hibridación) y cuya capacidad de inducir vacuolización en células Vero ha sido reportada previamente (Figueroa-Arredondo et al, 2001), por lo que se considera como una cepa hiperproductora de la hemolisina vacuolizante HlyA y se incluyó como control positivo de inducción de vacuolas en células de origen epitelial. Las otras dos cepas de *V. cholerae* pertenecen al serogrupo O1 y se caracterizan por presentar los genes que codifican para la síntesis de CT. *V. cholerae* O395 es una cepa de referencia que pertenece al biotipo Clásico, esta bacteria presenta una delección de 11 pb en el gen estructural *hlyA* que codifica para una hemolisina truncada incapaz de lisar eritrocitos (Arder and Murphy, 1988). *V. cholerae* C-6706 pertenece al biotipo El Tor, esta cepa tiene la capacidad de ser hemolítica, aunque con baja eficiencia. Los aislamientos fueron comprobados por aglutinación con anti-suero específico anti-serogrupo O1 en el InDRE. El sobrenadante de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  se utilizó en este estudio como un control negativo debido a que este microorganismo carece del gen *hlyA* y por lo tanto no produce la hemolisina vacuolizante.

### **Medios de cultivo**

Se llevó a cabo el procedimiento estándar para corroborar las cepas de *V. cholerae* de la siguiente manera: las bacterias se crecieron en agua peptonada alcalina conteniendo 10 g de peptona y 10 g de cloruro de sodio por litro con agua destilada y ajustada a pH 9.0. A partir de agua peptonada se aislaron colonias en medio selectivo TCBS, se seleccionaron colonias con morfología típica y se tomó un inóculo de una de ellas para sembrar por estría cruzada en medio Luria-Bertani (LB). A partir de colonias aisladas en medio LB se inocularon caldos de Craig y LB para obtener los sobrenadantes para los ensayos vacuolizantes. Una colonia de cada cepa se inoculó en tubos con 5 ml de medio LB y se incubaron durante 16 h a 37°C en un agitador orbital. El medio LB contiene 10 g de bacto triptona (Difco), 5 g de extracto de levadura (Difco), y 10 g de NaCl por litro, el pH se ajustó a 7.0. El medio de cultivo Craig contiene 30 g de casaminoácidos (Difco), 4 g de bacto triptona (Difco), 0.5 g de fosfato monobásico de potasio ( $K_2HPO_4$ ) por litro pH 7.0. Tanto al medio de cultivo LB como al medio Craig se les adicionó glicerol al 30% para preservar los cultivos bacterianos a -70°C. Además se observó la hemólisis de las cepas utilizando base de agar sangre conteniendo 5 g de extracto de levadura, 2 g de infusión de músculo cardíaco, 13 g de peptona de caseína, 15 g de cloruro de sodio, se ajustó a pH 7.0 y se adicionó sangre de carnero al 5%.

### **Cultivos celulares**

Para los ensayos de citotoxicidad vacuolizante se empleó la línea de células Vero (células epiteliales de riñón de mono), las cuales se propagaron

en medio modificado Eagle's Dulbecco (MEM) suplementado con 5% de suero fetal bovino (Hyclone), 1% de aminoácidos no esenciales, 5mM de L-glutamina, penicilina (100 U/ml), y estreptomina (100 µg/ml); mantenidas en humedad con 5% de CO<sub>2</sub>-95% de aire a 37°C. Se propagaron los subcultivos seriadamente después de cosecharlos con tripsina al 0.25% en buffer de fosfatos (PBS pH 7.4). Para los ensayos de apoptosis causados por la hemolisina HlyA se emplearon las células linfoides Jurkat, las cuales se preservaron en medio de cultivo RPMI (Gibco) suplementado con los mismos componentes y las mismas concentraciones que el medio D-MEM.

### **Cuantificación del efecto vacuolizante**

Para la realización de los ensayos de citotoxicidad se emplearon células Vero como modelo de vacuolización las cuales se propagaron en placas para cultivos celulares de 96 pozos (Corning) a una densidad de 10<sup>4</sup> células/100 µl en medio de cultivo D-MEM. Las células se incubaron por 24 h a 37°C a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> hasta obtener una confluencia del 70-80%. Las cepas microbianas se incubaron en 5 ml de medio de cultivo LB durante 16 h a 37°C en un agitador orbital a 150 rpm. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante de cultivo fue recolectado y filtrado a través de una membrana de acetato de celulosa con filtros de 0.45 µm. El sobrenadante obtenido se utilizó en los ensayos de vacuolización. El medio de cultivo D-MEM fue retirado de las células Vero, las cuales se lavaron dos veces con PBS pH 7.4 y se adicionó 150 µl de D-MEM (suplementado con suero fetal bovino al 2%). Al primer pozo se le adicionaron 150 µl del sobrenadante, se mezcló

suavemente y a partir de esta primera dilución se realizaron diluciones seriadas 1:2. Las células se incubaron a 37°C y se monitorearon a diferentes tiempos durante 24 h para observar la formación de vacuolas. La dilución del sobrenadante se retiró y las células se lavaron dos veces con PBS, luego se dejaron secar y se fijaron durante 20 min con metanol absoluto (Baker). Las células se tiñeron con colorante de Wright (Hycel) durante 5 min, transcurrido este tiempo se adicionó buffer de fosfato pH 6.4 (Hycel) durante 10 min. El colorante se lavó con agua corriente, las células se dejaron secar a temperatura ambiente y se examinaron al microscopio para la cuantificación de la vacuolización. La prueba se consideró positiva cuando el 50% de las células presentaron vacuolas visibles en su citoplasma observadas al microscopio invertido. El título de vacuolización está dado por el inverso de la dilución a la cual se considera la prueba como positiva.

### **Inductores de apoptosis**

Moléculas como la Actinomicina D 10 mM (MBL), Camptotecina 2 mM (MBL), Cicloheximida 10 mM (MBL), Etopósido 100 mM (MBL), y Dexametasona 10 mM (MBL) fueron utilizados como controles positivos de inducción de apoptosis. Las células Vero se propagaron mediante los métodos estándar y se adicionaron diferentes concentraciones de los inductores. Las células se incubaron con el estímulo durante 24 h a 37°C a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se colectaron y se tiñeron con anexina V-FITC y yoduro de propidio para la detección de células apoptóticas y necróticas.

### **Ensayo de apoptosis con anexina V-FITC**

Se obtuvieron suspensiones de células individuales y se ajustaron a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/ml. Las células se crecieron en placas de cultivos celulares de 60 mm X 15 mm (Corning) y se incubaron durante 24 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se lavaron dos veces con PBS 1X pH 7.4 y se trataron con sobrenadantes estériles de las diferentes cepas microbianas y con los controles correspondientes durante 24 h a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de estímulo, las células Vero se disgregaron con 1 ml de tripsina durante 1 min. Las células Jurkat por el hecho de crecer en suspensión no es necesario adicionarles ningún componente para disgregarlas. Una vez colectadas, las células se lavaron 3 veces con PBS frío y se centrifugaron a 2000 rpm durante 2 min a 4°C, luego se resuspendieron en 1 ml buffer de unión (Calbiochem) frío que contiene 10 mM de Hepes, 140 mM de NaCl y 1.8 mM de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>), al cual se le adicionan 200 µg/ml de anexina V acoplada a fluoresceína (Calbiochem) y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente a la incubación, las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 2 min a 4°C y se removió el sobrenadante. Se adicionó 1 ml de buffer de unión y 30 µg/ml de yoduro de propidio (Calbiochem) y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 2 min a 4°C y se removió el sobrenadante, finalmente, se resuspendieron en 300 µl de PBS y se analizaron  $10^4$  células mediante citometría de flujo.

### **Ensayo de apoptosis mediante la degradación de la PARP**

Para la obtención de proteínas totales, las células Vero que se desprendieron de su sustrato fueron colectadas en el medio de cultivo y recuperadas por centrifugación a 2000 rpm durante 3 min. Las células que permanecieron adheridas en la placa de cultivo se recuperaron al desprenderlas con ayuda de un gendarme, se colocaron en 300  $\mu$ l de buffer de lisis RIPA que contiene 50 mM de Tris-HCl pH 7.5, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA pH 8.0, 0.1% de SDS, 0.5% de desoxicolato de sodio y 1 mM de PMSF, adicionándoles un cocktail de inhibidores de proteasas (Complete mini, Roche Diagnostics). De manera adicional, las células se lisaron con un sonicador al 30% de capacidad máxima, dando 2 ciclos de 30 s con un descanso de 30 s en baño de hielo. Las proteínas totales se cuantificaron por el método de microBradford. La técnica de microBradford se realizó en una placa de cultivo de 96 pozos. Se utilizó una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) 1  $\mu$ g/ml en PBS. Para la realización de la curva se colocaron 5, 2.5, 0.312 y 0.156  $\mu$ g de BSA en los pozos de la placa con un volumen final de 160  $\mu$ l y un último pozo como blanco al cual se le agregó solo 160  $\mu$ l de PBS. Se adicionaron 40  $\mu$ l de reactivo de Bradford en cada pozo y la lectura se realizó a una absorbancia de 595 nm en un lector de microplacas. Para determinar la concentración de las muestras problema se colocaron 3 o 5  $\mu$ l de dichas muestras y se llevaron a un volumen final de 160  $\mu$ l de PBS, se adicionaron 40  $\mu$ l de reactivo de Bradford y se determinó la lectura como se describió anteriormente. Las muestras de proteínas obtenidas se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%, a las cuales se les adicionó buffer de muestra



conteniendo 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol. Se corrieron electroforesis con 15  $\mu$ g de proteína y se aplicó un voltaje constante de 60 V durante 20 min hasta que las muestras penetraron al gel separador. Se aumentó el voltaje a 100 V por 2 h hasta que el frente del colorante llegó al extremo final del gel. Después de la corrida electroforética los geles se tiñeron con colorante de Fairbanks durante 1 h y se destiñó con una mezcla de metanol: ácido acético: agua. Las proteínas obtenidas se separaron en un gel de poliacrilamida al 10%, posteriormente fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa durante 45 min a 253 mA en una cámara de electrotransferencia a 4° C. Se usó leche al 5% en PBS como agente bloqueador de las membranas, incubando durante 1 h. La membrana se incubó con anticuerpo anti-PARP (Santa Cruz biotechnology) a una dilución 1:1000 durante 1 h a 4°C, se efectuaron lavados con PBS-Tween 0.05% y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina durante 1 h. Como solución reveladora se usó un sustrato comercial (1-step NBT/BCIP, Pierce Illinois, USA).

### **Ensayo de apoptosis por la técnica de TUNEL**

Posterior a los diferentes estímulos, las células Vero y Jurkat se colectaron y se centrifugaron a 3000 rpm por 5 min a 4°C. El medio se removió y se resuspendieron  $10^6$  células/ml en formaldehído al 4% durante 10 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo las células se centrifugaron y se removió el sobrenadante. Las células se resuspendieron en etanol al 80% y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Se retiró el etanol mediante centrifugación a 3000 rpm durante 5 min a

temperatura ambiente. Se realizó una incubación con TBS 1X durante 15 min a temperatura ambiente y se retiró al centrifugar por 5 min a 3000 rpm. Las células se incubaron con 2 mg/ml de proteinasa K (Oncogene) durante 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron las células nuevamente bajo las mismas condiciones para retirar la proteinasa K. Las células se resuspendieron en buffer de equilibrio TdT 1X (Oncogene) y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo se volvió a centrifugar a 3000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Previamente en un tubo eppendorf mantenido en hielo, se colocó mezcla de reacción de marcaje que contiene desoxinucleótidos marcados con fluoresceína y se adicionó 3  $\mu$ l de la enzima TdT (Oncogene). Las células se resuspendieron en la mezcla de reacción recién preparada y se incubaron durante 90 min a 37°C, luego se lavaron con TBS 1X y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min. Este lavado se realizó dos veces y posteriormente las células se prepararon para el citómetro de flujo en el cual se analizaron  $10^4$  eventos y se midió la fluorescencia de cada uno, la cual fue registrada en un sistema computarizado. De manera alterna, las células tratadas bajo las mismas condiciones se montaron en cubreobjetos (Corning) y la fluorescencia fue observada mediante microscopía confocal.

### **Ensayo de Inhibición de canales aniónicos**

Para evaluar la participación del canal aniónico formado por la hemolisina en la vacuolización e inducción de apoptosis, se utilizó el inhibidor de canales aniónicos DIDS. Los cultivos de células Vero y Jurkat se trataron con sobrenadante estéril de la cepa vacuolizante a una dilución

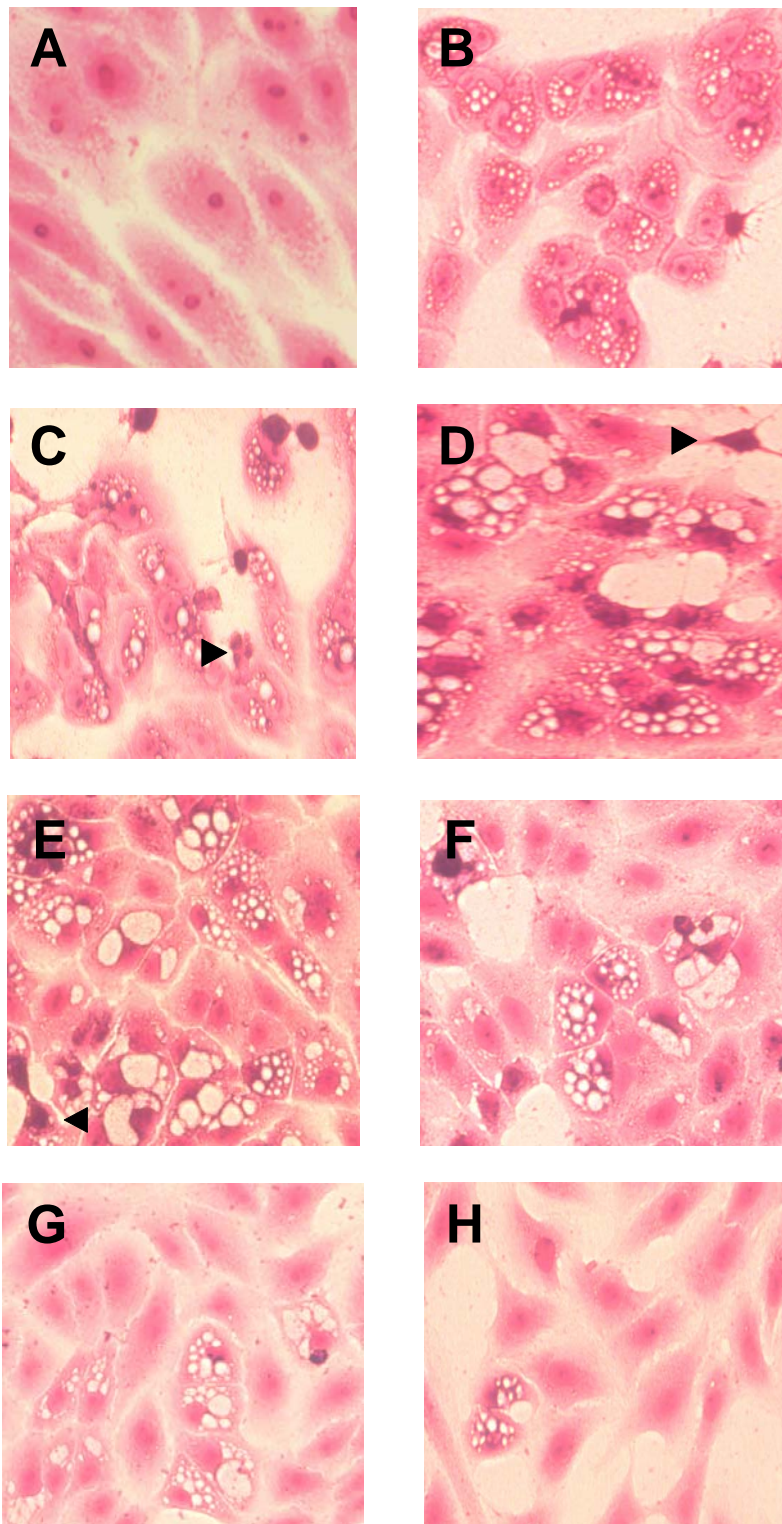
1:20, y de manera simultánea, se probaron diferentes concentraciones de DIDS (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 300  $\mu$ M, 400  $\mu$ M, y 500  $\mu$ M). Las células se incubaron con los diferentes tratamientos a 37°C durante 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de estímulo, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS. Para fijar las células se utilizó metanol absoluto durante 20 min, posteriormente las células se tiñeron con colorante de Wright y se observaron en un microscopio de luz invertido (20 X). De manera simultánea, las células se colectaron y se procesaron mediante la técnica de TUNELy se evaluaron mediante citometría de flujo.

## **VI. RESULTADOS**

### **Las células vacuolizadas por HlyA presentan signos de apoptosis.**

#### **Cuantificación del efecto vacuolizante**

Para determinar la capacidad de la hemolisina HlyA de inducir el efecto vacuolizante, se utilizó la línea de células epiteliales Vero como modelo de vacuolización (Figuroa-Arredondo et al, 2001). Como control positivo contamos en el laboratorio con la cepa de *V. cholerae* 69750, la cual ha sido seleccionada por su capacidad de hiperproducción de la hemolisina HlyA y por inducir la formación de vacuolas en células Vero (Figuroa-Arredondo et al, 2001). Las células Vero se cultivaron hasta obtener una confluencia del 70-80%. Posteriormente, se adicionó sobrenadante estéril de la cepa de 69750 para obtener diferentes diluciones (1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25; 1:50, 1:75, y 1:100). Dado que se empleó sobrenadante esterilizado por filtración, se evitó el contacto de las bacterias con las células en cultivo. El ensayo se incubó durante 24 h a 37°C y las células Vero se tiñeron con colorante de Wright para ser observadas en un microscopio de luz invertido. La prueba se consideró positiva cuando el 50% de las células presentaron vacuolas en su citoplasma. Observamos que el sobrenadante de la cepa 69750 indujo la formación de vacuolas en células Vero de manera dosis dependiente (Fig. 4). Las células que se trataron con una dilución 1:10 presentaron una eficiente formación de vacuolas (Fig. 4-B), sin embargo, la confluencia se perdió en su totalidad a las 8 h de tratamiento.

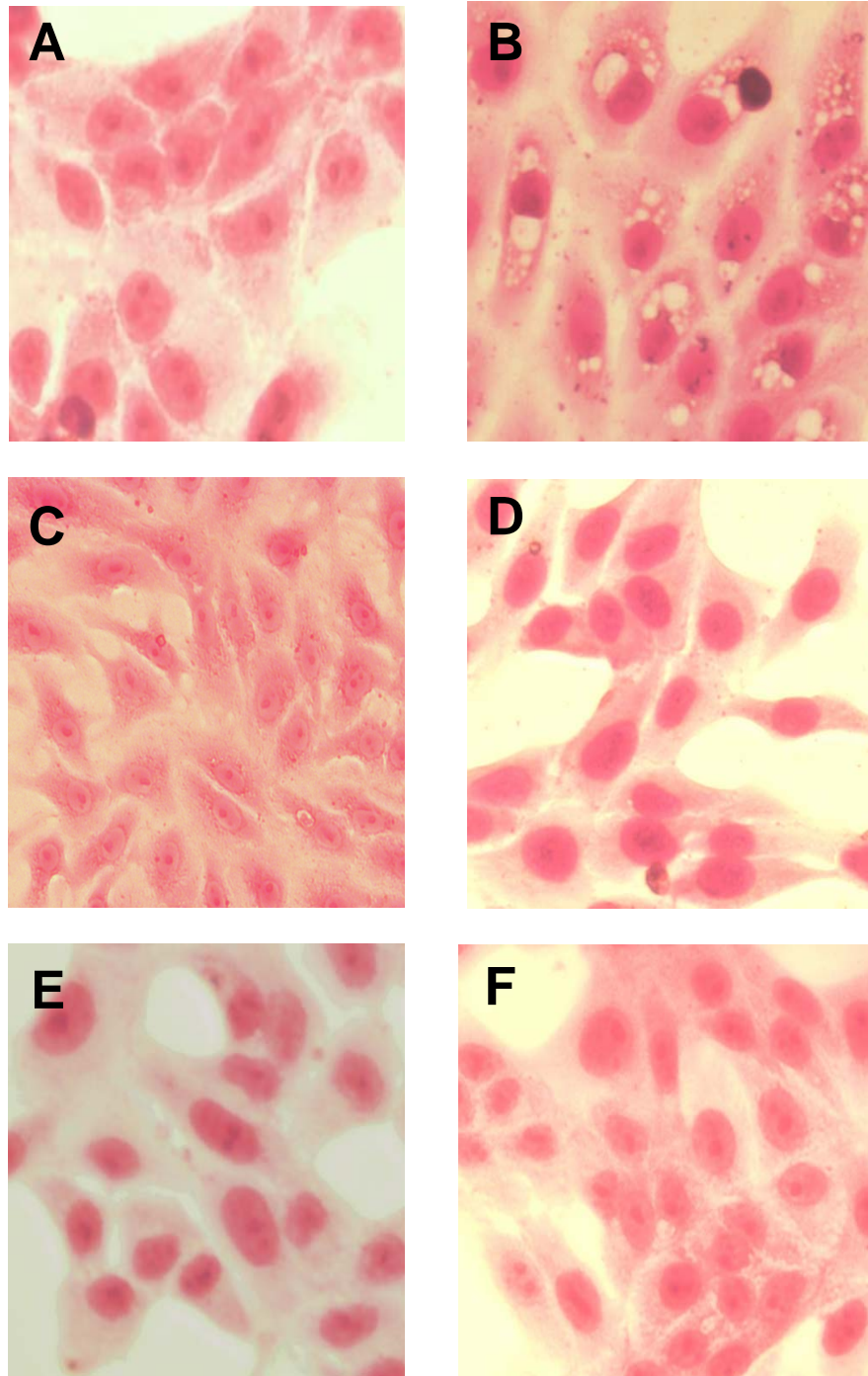


**Fig. 4. Efecto dosis dependiente en la inducción del proceso de vacuolización.** Cultivos de células Vero (A), se trataron con sobrenadante de *V. cholerae* de la cepa 69750 diluido 1:10 (B); 1:15 (C), 1:20 (D); 1:25 (E); 1:50 (F); 1:75 (G); y 1:100 (H). Las células se tiñeron con colorante de Wright y se observaron en un microscopio de luz invertido (amplificación, 20 X). El empleo de alícuotas de sobrenadante diluido 1:20 indujeron un mayor número de células Vero vacuolizadas. Las flechas indican la presencia de núcleos picrofónicos.

Al realizar tratamientos a diluciones 1:15, 1:20 y 1:25, se observaron núcleos muy compactos mediante examinación al microscopio, sugiriendo que se trataban de núcleos picnóticos (Fig. 4 C-E). A mayores diluciones (1:50, 1:75 y 1:100) el número de vacuolas por célula disminuyó, al igual que el número de células que presentaban el efecto vacuolizante (Fig. 4 G-H). Cuando se trataron las células mediante la estandarización por diluciones seriadas se seleccionó la dilución 1:20 como la que produce un mayor porcentaje de células vacuolizadas (Tabla 2). El tiempo de incubación de 24 h también se seleccionó como el más eficiente.

Tabla 2. Título del efecto vacuolizante de la cepa de *V. cholerae* 69750 en cultivos de células Vero

Dilución de sobrenadante	% células vacuolizadas
1:2	0
1:4	0
1:6	0
1:8	0
1:10	40
1:15	60
1:20	80
1:25	50
1:50	40
1:75	20
1:100	10



**Fig. 5. Efecto de sobrenadantes de cepas de *V. cholerae* en la formación de vacuolas en células Vero.** Cultivos de células Vero (A), se trataron con sobrenadante diluido 1:20 de *V. cholerae* 69750 (B); *V. cholerae* O395 (C); *V. cholerae* C-6706 (D); *E. coli* DH5 $\alpha$  (E); y con medio de cultivo LB (F). Las células se tiñeron con colorante de Wright y se observaron en un microscopio de luz invertido (amplificación 20 X). La formación de vacuolas sólo se atribuyó al efecto del sobrenadante de la cepa 69750.

Las células Vero se sometieron a tratamientos con sobrenadante diluido 1:20 de las cepas de *V. cholerae* del serogrupo O1 perteneciente al biotipo Clásico O395 (Figura 5-C), y del biotipo El Tor, la cepa C-6706 (Fig. 5-D). No se logró observar algún cambio morfológico en las células Vero con estos tratamientos. La confluencia se mantuvo del 90% aproximadamente y no fue posible observar vacuolización celular. Tampoco fue posible observar vacuolización con diluciones menores de sobrenadante de las cepas O1. Como controles negativos adicionales se incluyeron tratamientos con sobrenadante estéril de *E. coli* DH5 $\alpha$  (Fig. 5-E), y con el medio de cultivo LB, medio en el cual se propagaron las diferentes cepas bacterianas incluidas en el estudio (Fig. 5-F). Las células Vero conservaron la morfología y la confluencia de manera similar a la observada con el control sin tratamiento (Fig. 5-A).

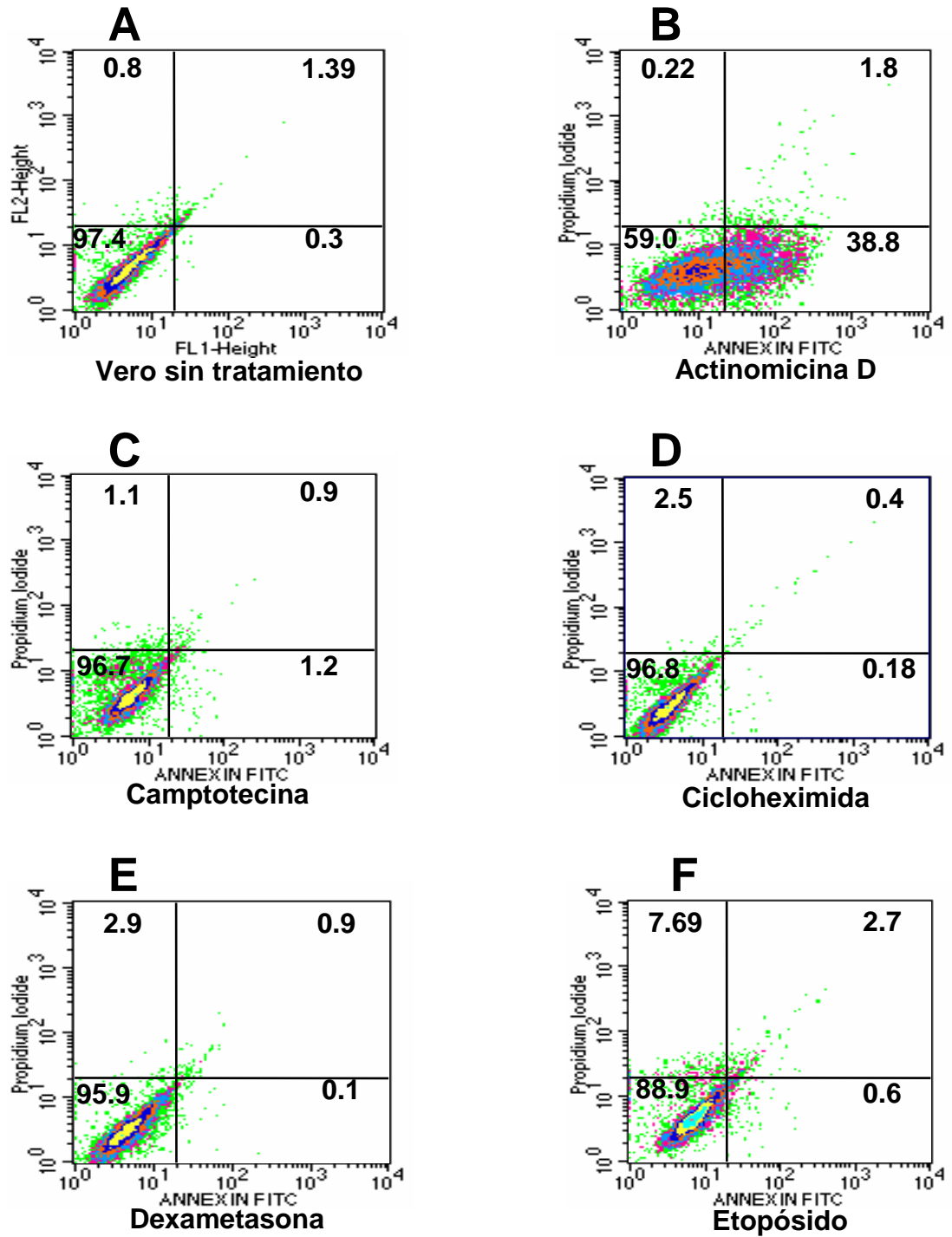
### **Ensayo de apoptosis por la tinción con anexina V-FITC**

Con la finalidad de validar los ensayos de apoptosis en las células Vero, se probó la capacidad de la Actinomicina D, Camptotecina, Cicloheximida, Dexametasona y Etopósido para inducir muerte celular por esta vía. Las células Vero se trataron con los inductores químicos de apoptosis durante 24 h y para detectar el proceso se utilizó la tinción de anexina V-FITC y yoduro de propidio. Posteriormente las células fueron analizadas mediante citometría de flujo contabilizando  $10^4$  eventos por experimento. Este análisis nos permitió determinar que solo la Actinomicina D es capaz de inducir muerte celular vía apoptosis en células Vero, después de 24 h de tratamiento (Fig. 6-B). No fue posible detectar células marcadas



con anexina V-FITC o con yoduro de propidio cuando las células Vero se sometieron a tratamientos con Camptotecina, Cicloheximida, Dexametasona o con Etopósido (Fig. 6 C-F). Con los datos obtenidos en esta estandarización se seleccionó a la Actinomicina D como control positivo de inducción de apoptosis en células Vero.

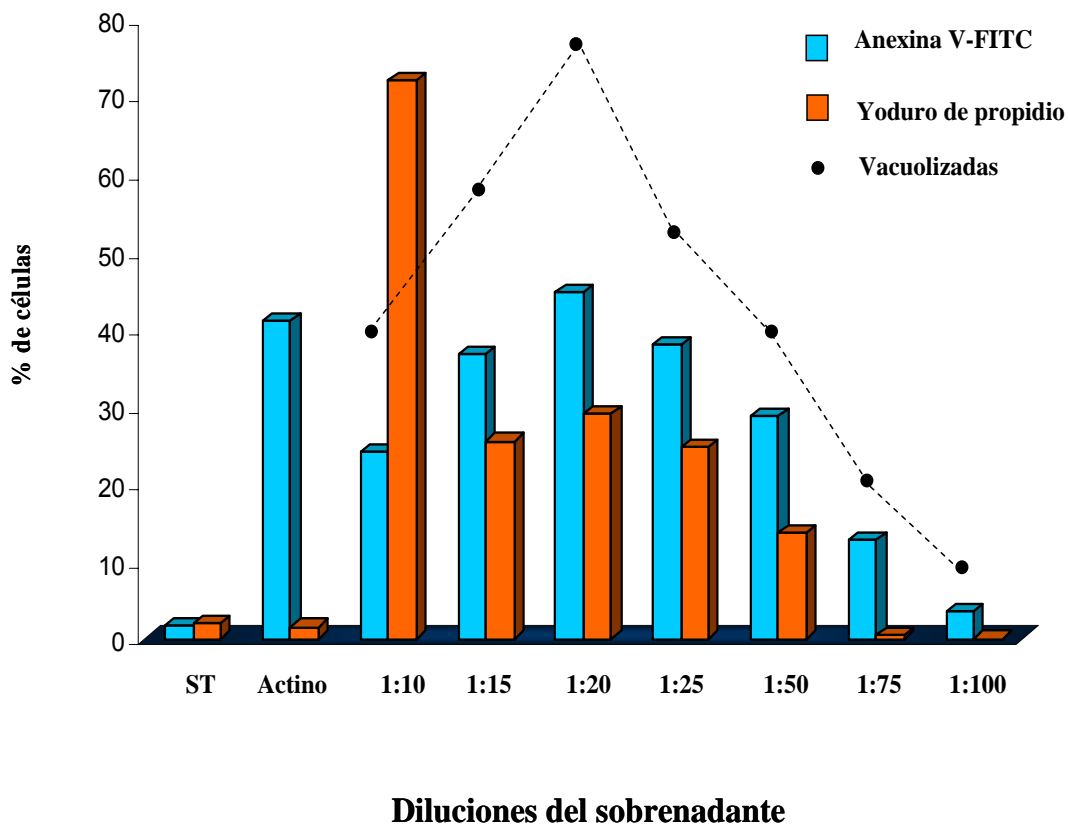
Con la finalidad de poder correlacionar la presencia del efecto vacuolizante con la aparición de apoptosis temprana, se decidió probar diferentes diluciones (1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:50, 1:75, y 1:100) del sobrenadante de la cepa vacuolizante de *V. cholerae* 69750. Las células se tiñeron con anexina V-FITC y yoduro de propidio y se analizaron mediante citometría de flujo. Observamos que las células Vero tratadas con el sobrenadante diluido 1:10, presentan un marcaje mayoritario con yoduro de propidio, sugiriendo que el mecanismo de muerte predominante es vía necrosis. Con la dilución 1:20, las células Vero se marcaron en su mayoría con anexina V-FITC (47.7%). A medida que se diluyó el sobrenadante, las células marcadas con anexina V-FITC disminuyeron, lo mismo que el fenómeno de vacuolización (Fig. 7). Estos datos sugieren una correlación entre la formación de vacuolas y la aparición de apoptosis temprana. Cuando se realizó el análisis estadístico de las células marcadas con anexina V-FITC que se trataron con el sobrenadante diluido 1:20, comparado con las células sin tratamiento, se obtuvo una diferencia significativa, con un valor de  $P < 0.05$ . Con los datos obtenidos seleccionamos la dilución 1:20 como dosis efectiva de inducción de apoptosis, la cual sería empleada en futuros experimentos.



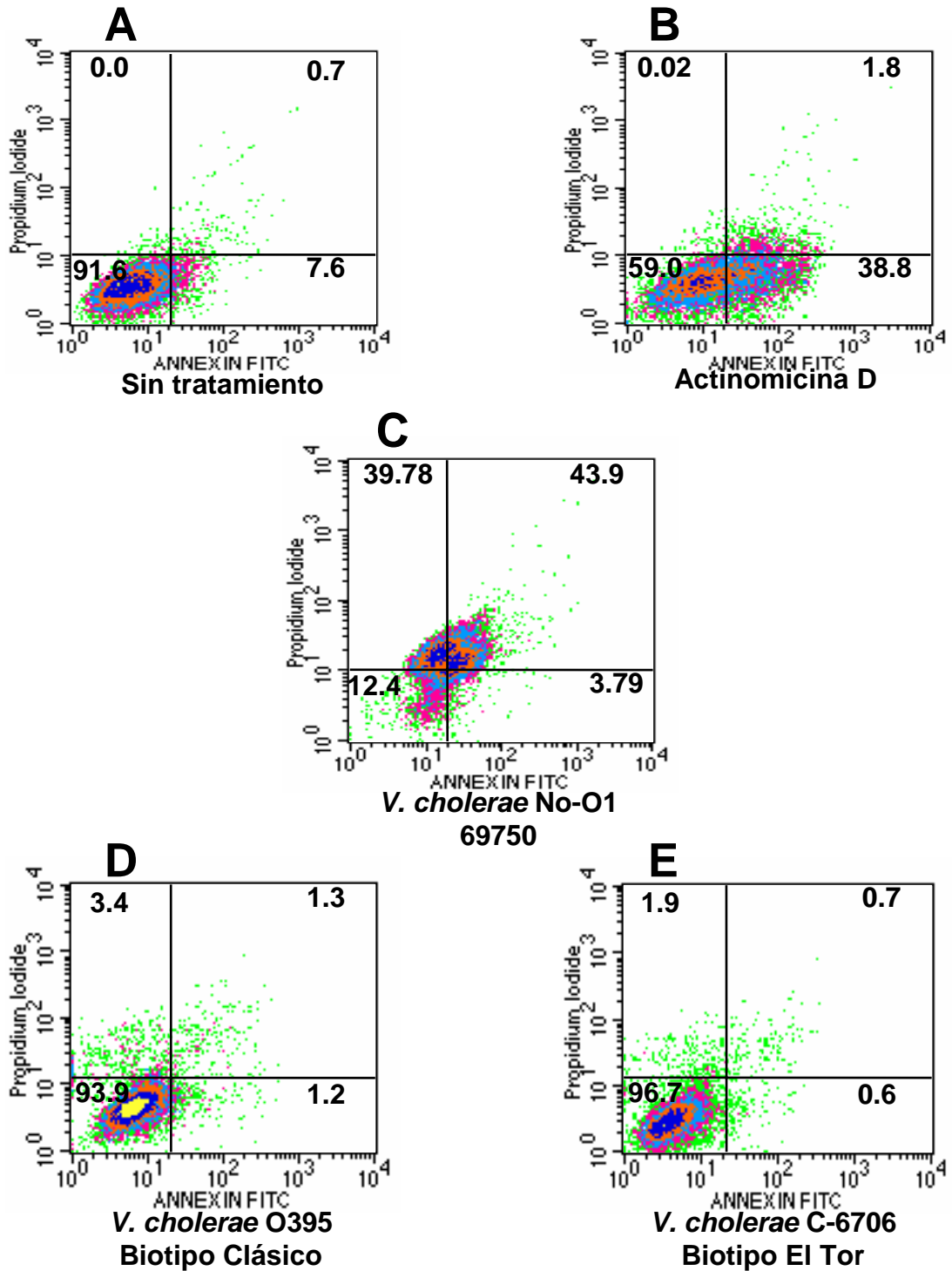
**Fig. 6. Efecto de inductores de apoptosis en cultivos de células Vero detectado mediante la tinción con anexina V-FITC.** Las células Vero (A), se incubaron con Actinomycin D 3  $\mu$ M (B); Camptotecina 0.6  $\mu$ M (C); Cicloheximida 33  $\mu$ M (D); Dexametasona 3  $\mu$ M (E); y Etopósido 33  $\mu$ M (F). Las células se tiñeron con anexina V-FITC y yoduro de propidio y se analizaron mediante citometría de flujo. Solo el tratamiento con Actinomycin D fue capaz de inducir apoptosis en las células Vero.

Con la finalidad de determinar si el sobrenadante de la cepa vacuolizante de *V. cholerae* 69750, era el único capaz de inducir la apoptosis temprana, se incluyeron tratamientos con sobrenadante de cepas de *V. cholerae* no vacuolizantes. Para ello se utilizaron los sobrenadantes diluidos 1:20 de las cepas O395 del biotipo Clásico y C-6706 del biotipo El Tor. Cuando las células se trataron con el sobrenadante de las cepas no vacuolizantes, tampoco se detectaron células marcadas con anexina V-FITC y/o con yoduro de propidio que resultaran ser significativas con respecto al control sin tratamiento. Las células permanecieron viables con valores de 93.9% para las células tratadas con el sobrenadante de la cepa O395 (Fig. 8-D) y 96.7% para las células sometidas a tratamiento con el sobrenadante de la cepa C-6706 (Fig. 8-E).

Con la finalidad de determinar si el mismo efecto de inducción de apoptosis temprana era reproducible en células del sistema inmune, se emplearon células Jurkat que es una línea de células T ampliamente utilizada como modelo de apoptosis (Abraham and Weis, 2004). Las células Jurkat se trataron con el sobrenadante diluido 1:20 proveniente de la cepa vacuolizante 69750. Después de 24 h de tratamiento, las células se tiñeron con anexina V-FITC y yoduro de propidio. El análisis de los diferentes marcajes se realizó mediante citometría de flujo. Se observó que el 89.1 % de las células Jurkat se tiñeron con anexina V-FITC (Fig. 9-C). Cuando se realizó el análisis estadístico de las células marcadas con anexina V-FITC, observamos que la diferencia fue significativa con respecto al control sin tratamiento, con un valor de  $P < 0.05$ . Estos resultados sugieren que la línea de células T es más susceptible a presentar cambios tempranos indicativos



**Fig. 7. Efecto dosis dependiente en la inducción de apoptosis temprana en células Vero vacuolizadas.** Cultivos de células Vero se incubaron con diferentes diluciones del sobrenadante de *V. cholerae* 69750. La muerte celular se evaluó mediante la tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio. El análisis de las poblaciones celulares se realizó mediante citometría de flujo. Células Vero sin tratamiento (ST) se incluyeron como control negativo y como control positivo las células se trataron con Actinomicina D. El tratamiento al cual fue posible observar un mayor número de células apoptóticas y vacuolizadas correspondió a la dilución 1:20.

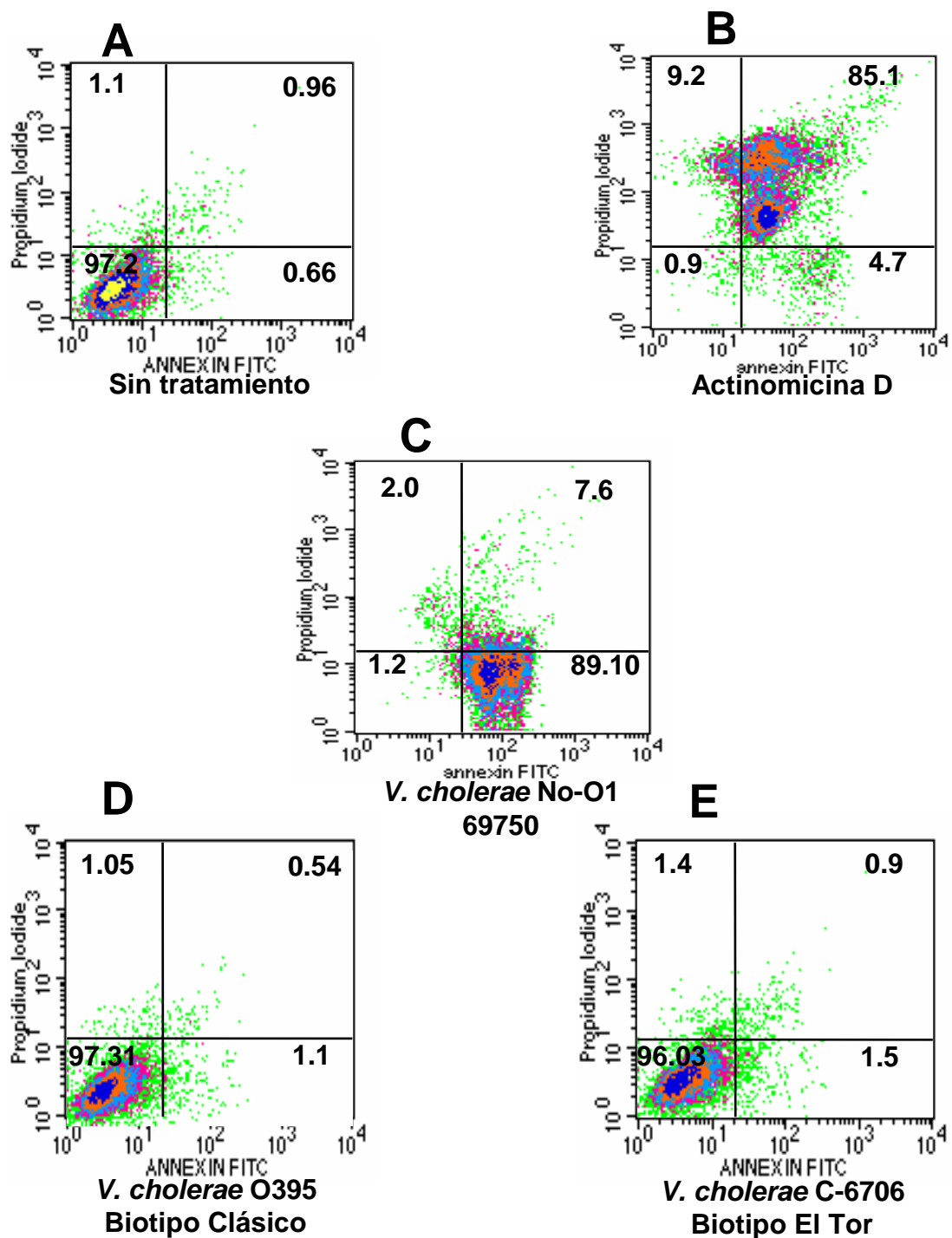


**Fig. 8. Efecto de sobrenadantes de cepas de *V. cholerae* en la inducción de apoptosis temprana en células Vero.** Cultivos de células Vero (A), se incubaron con Actinomicina D (B); sobrenadante de *V. cholerae* 69750 (C); *V. cholerae* O395 (D); y *V. cholerae* C-6706 (E). Las células se analizaron por citometría de flujo después de tñirlas con anexina V-FITC y con yoduro de propidio. El tratamiento con el cual se observó apoptosis temprana en las células Vero se atribuyó al sobrenadante de la cepa vacuolizante 69750.

de muerte celular vía apoptosis que los observados en las células Vero (Fig. 8-C). Para determinar si el sobrenadante de la cepa vacuolizante es el que induce estos eventos de muerte celular, se incluyeron tratamientos con sobrenadantes de cepas no vacuolizantes O395 y C-6706. Las células Jurkat mostraron poblaciones negativas para la tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio con valores de 97.3% y 96.0% respectivamente (Fig. 9 D-E).

### **Ensayo de apoptosis por la fragmentación de la PARP**

Con la finalidad de determinar si el procesamiento de la PARP forma parte de los eventos de muerte celular vía apoptosis en células Vero vacuolizadas y en células Jurkat, se trataron ambas líneas celulares con sobrenadante diluido 1:20 de la cepa de *V. cholerae* 69750. Para ello, se realizó un Western-blot utilizando anticuerpos policlonales anti-PARP que reconocen a la proteína de 113 kDa y al fragmento de 89 kDa. Como controles negativos se incluyeron células Vero y Jurkat sin tratamiento. En ambos casos se evidenció una proteína de 113 kDa, resultado que nos indicó que, en condiciones normales, PARP no es procesada en ambas líneas celulares (Fig. 10. carriles 2 y 5). Como controles positivos se incluyeron tratamientos con Actinomicina D. Tanto en las células Vero como en las células Jurkat, con este tratamiento, se evidenció el procesamiento de la PARP ya que detectamos el fragmento de 89 kDa en ambas líneas celulares (Fig. 10 carriles 3 y 6).



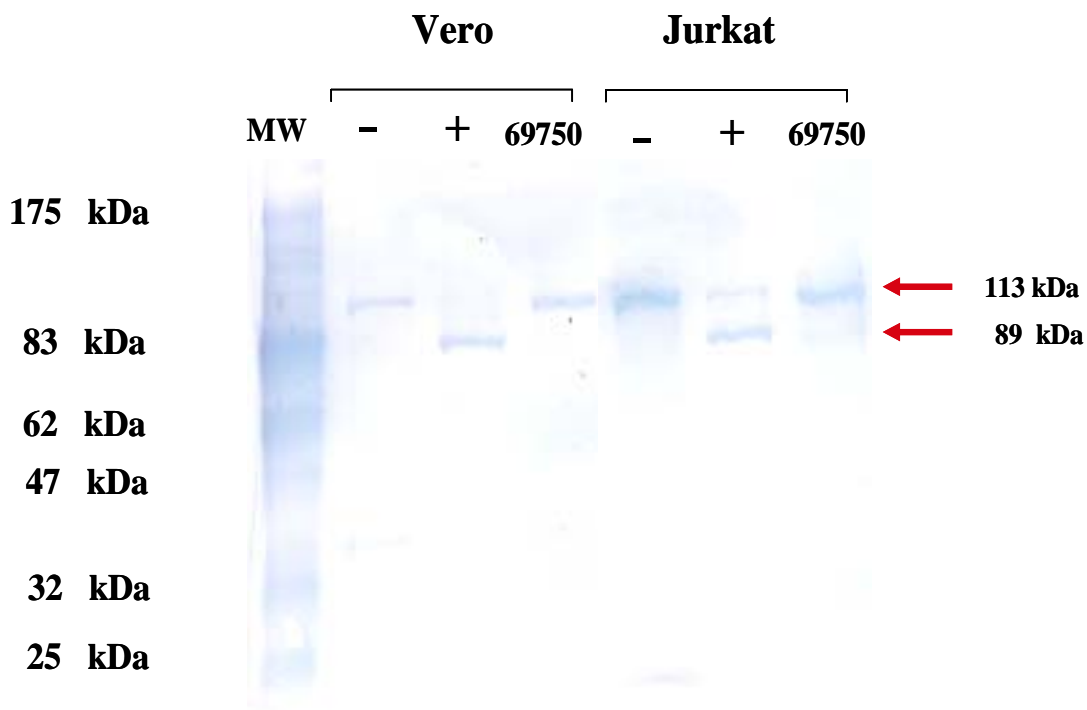
**Fig. 9. Efecto de sobrenadantes de *V. cholerae* en la inducción de apoptosis temprana en células Jurkat.** Cultivos de células Jurkat (A), se trataron con Actinomicina D 3  $\mu$ M (B); sobrenadante de *V. cholerae* 69750 diluido 1:20 (C); sobrenadante de *V. cholerae* O395 diluido 1:20 (D); y sobrenadante de *V. cholerae* C-6706 diluido 1:20 (E). Las células se tiñeron con anexina V-FITC y yoduro de propidio y se analizaron mediante citometría de flujo. La inducción de apoptosis en las células Jurkat se atribuyó al tratamiento con el sobrenadante de la cepa vacuolizante 69750.

Las células Vero y las células Jurkat se trataron con el sobrenadante de la cepa vacuolizante 69750. En las células Jurkat se observó un fragmento de 89 kDa que nos indicó que PARP es fragmentada en respuesta al estímulo con sobrenadante de la cepa vacuolizante (Fig. 10 carril 7). Sin embargo, en las células Vero no fue posible observar el fragmento de 89 kDa, solamente se detectó la proteína de 113 kDa (Fig. 10 carril 4). Este resultado nos permite determinar que la proteína PARP se procesa en células Jurkat que se trataron con sobrenadante de *V. cholerae* 69750, pero esta fragmentación no ocurre en las células Vero vacuolizadas.

#### **Ensayo de apoptosis por la fragmentación del DNA (TUNEL)**

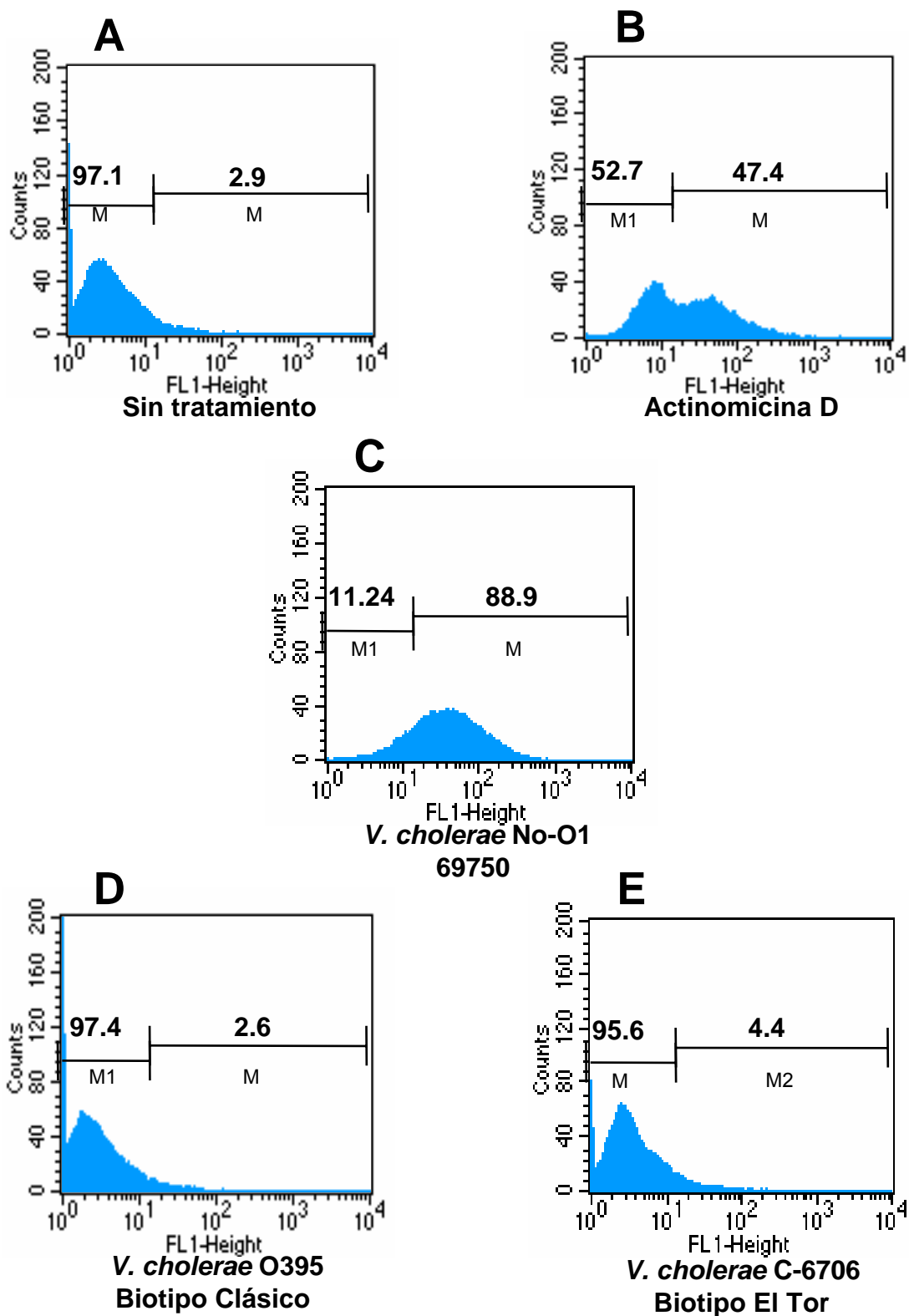
Para corroborar que las células Vero y Jurkat tratadas con el sobrenadante de la cepa vacuolizante mueren vía apoptosis, se detectó la fragmentación del DNA en ambas líneas celulares. Las células Vero y Jurkat se trataron con el sobrenadante diluido 1:20 de la cepa de *V. cholerae* 69750. Después de 24 h de estímulo, las células se procesaron mediante la técnica de TUNEL. La detección del DNA fragmentado se realizó analizando las células mediante citometría de flujo después de cuantificar  $10^4$  eventos por experimento. La fragmentación del DNA se observó en las células Vero tratadas con el sobrenadante de la cepa vacuolizante. Los valores obtenidos indican que el 89% de las células son positivas para la tinción (Fig. 11-C), indicando que la fragmentación del DNA ha ocurrido en estas células. El análisis estadístico reveló que la diferencia fue significativa en las células apoptóticas tratadas con el sobrenadante de la cepa 69750



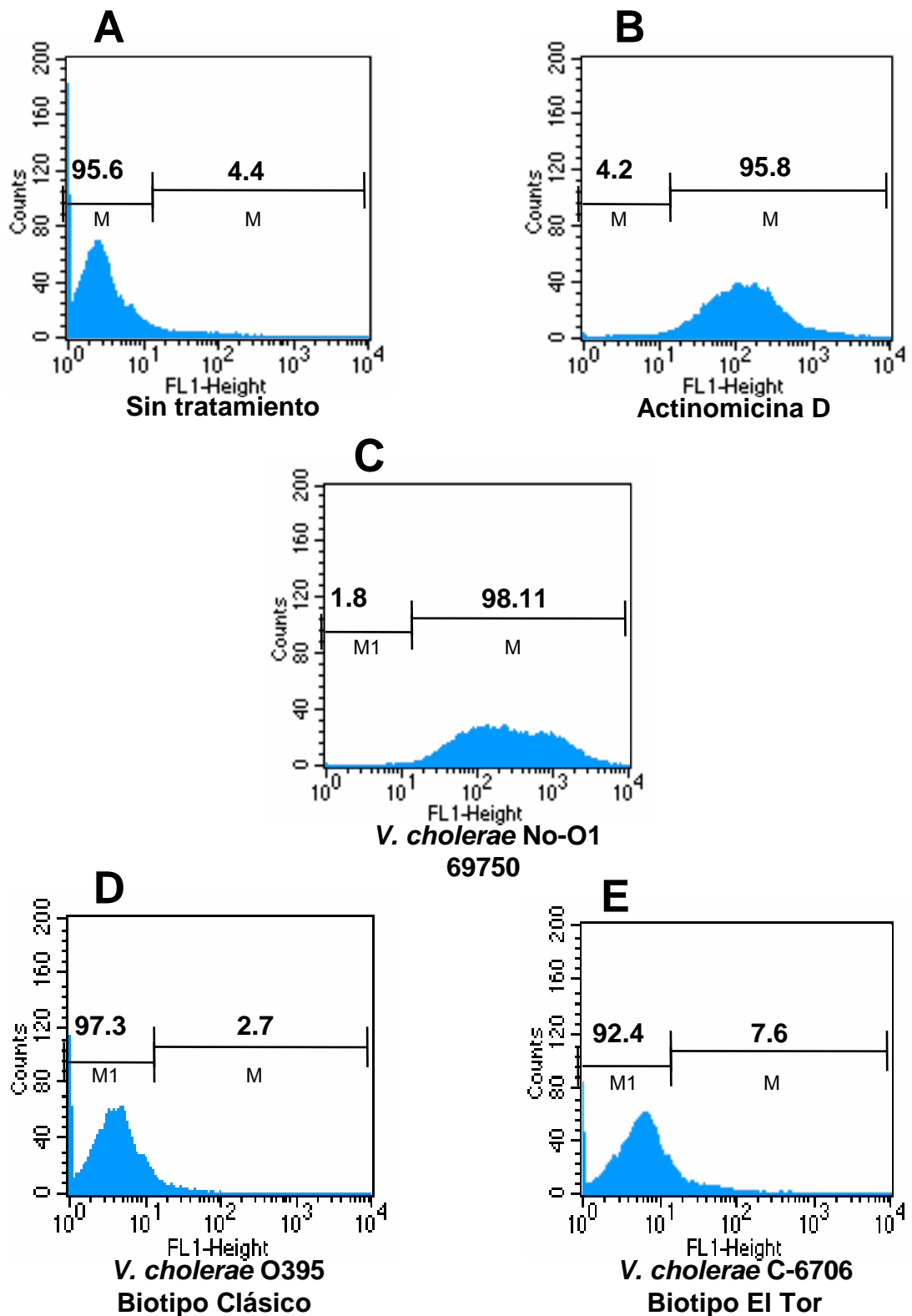


**Fig.10. Detección de los productos de degradación de PARP en células Vero y Jurkat tratadas con sobrenadante de *V. cholerae* 69750.** Western-blot de proteínas totales utilizando anticuerpos policlonales anti-PARP. Proteínas de células Vero sin tratamiento (carril 2), células Vero con 3  $\mu$ M de Actinomicina D (carril 3), células Vero tratadas con sobrenadante de *V.cholerae* 69750 diluido 1:20 (carril 4); proteínas totales de células Jurkat sin tratamiento (carril 5), tratadas con 3  $\mu$ M de Actinomicina D (carril 6), y células Jurkat con sobrenadante de *V. cholerae* de la cepa 69750 diluido 1:20 (carril 7). Marcador de peso molecular (carril 1). Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La reacción fue visualizada usando anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina. El sobrenadante de la cepa vacuolizante de *V. cholerae* 69750 fue capaz de inducir la fragmentación de la PARP en células Jurkat; sin embargo, esta fragmentación no es evidente en células Vero con el mismo tratamiento.

con respecto a las células sin tratamiento (Fig. 11-A), con un valor de  $P < 0.05$ . Con la finalidad de determinar si el sobrenadante de la cepa vacuolizante era el único capaz de inducir fragmentación del DNA, se incluyeron tratamientos con sobrenadantes de las cepas no vacuolizantes. Las células tratadas con sobrenadante de la cepa O395 (Fig. 11-D) y C-6706 (Fig. 11-E) mostraron células mayoritariamente negativas para la fragmentación del DNA. Estos datos nos indican el sobrenadante de la cepa vacuolizante de *V. cholerae* 69750 es capaz de inducir la fragmentación del DNA en células Vero. Con la finalidad de determinar si la fragmentación del DNA ocurre en células Jurkat, esta línea celular se trató con sobrenadante de la cepa vacuolizante. La fragmentación del DNA se evidenció mediante la técnica de TUNEL. El análisis de las células se realizó mediante citometría de flujo después de contabilizar  $10^4$  eventos. Las células Jurkat tratadas con el sobrenadante diluido 1:20 de la cepa vacuolizante mostraron fragmentación del DNA en el 98.1% (Fig. 12-C). Al realizar el análisis estadístico de las células bajo tratamiento con el sobrenadante de la cepa 69750 y las células control sin tratamiento (Fig. 12-A), observamos que la diferencia es significativa con un valor de  $P < 0.05$ . Con la finalidad de determinar si las cepas no vacuolizantes inducen fragmentación del DNA, las células Jurkat se sometieron a tratamientos con sobrenadantes diluidos 1:20 de las cepas O395 y C-6706. Las células Jurkat, bajo estos tratamientos, mostraron células mayoritariamente negativas para la tinción de TUNEL, con valores de 97.3% y 92.4% respectivamente (Fig. 12-D-E). Estos resultados nos indican que el sobrenadante de la cepa vacuolizante 69750 es capaz de inducir fragmentación de DNA en células Jurkat.



**Fig. 11. Efecto de sobrenadantes de cepas de *V. cholerae* en la inducción de la fragmentación del DNA en células Vero.** Cultivos de células Vero (A), fueron tratadas con 3  $\mu$ M de Actinomicina D (B), sobrenadante de *V. cholerae* de la cepa 69750 diluido 1:20 (C), sobrenadante de *V. cholerae* O395 (D), y sobrenadante de *V. cholerae* de la cepa C-6706 (E). La fragmentación del DNA se evidenció mediante la técnica de TUNEL por citometría de flujo. El sobrenadante de la cepa vacuolizante es capaz de inducir apoptosis en células Vero detectada mediante la fragmentación del DNA.

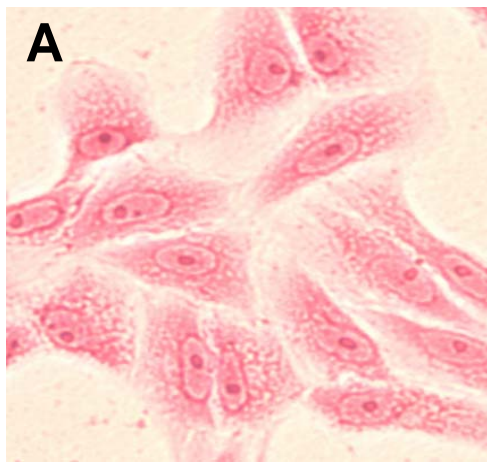


**Fig. 12. Efecto de sobrenadantes de cepas de *V. cholerae* en la inducción de la fragmentación del DNA en células Jurkat.** Cultivos de células Jurkat (A), se incubaron con 3  $\mu$ M de Actinomicina D (B), sobrenadante de *V. cholerae* 69750 diluido 1:20 (C), sobrenadante de *V. cholerae* O395 diluido 1:20 (D), sobrenadante de *V. cholerae* C-6706 diluido 1:20 (E). La fragmentación del DNA se detectó mediante la técnica de TUNEL por citometría de flujo. El sobrenadante de la cepa vacuolizante induce apoptosis en células Jurkat.

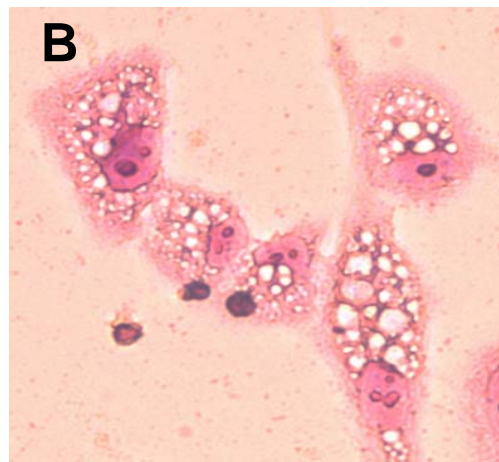
## **La hemolisina HlyA es la causa de la vacuolización y apoptosis**

### **Inhibición de la vacuolización empleando anticuerpos anti-HlyA**

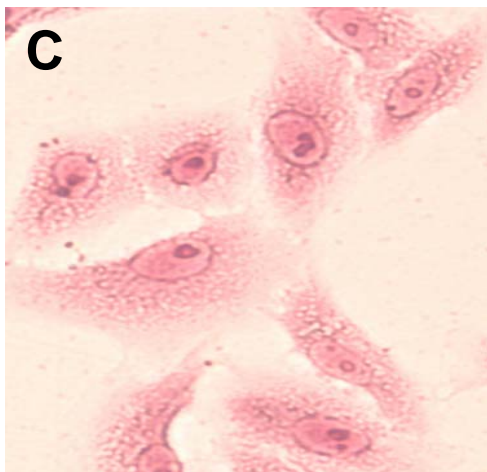
Para demostrar que la hemolisina HlyA es el único determinante en la inducción de vacuolas en células Vero, se utilizó un anti-suero de conejo con anticuerpos anti-hemolisina HlyA para inhibir la vacuolización. Estas células Vero se trataron con el sobrenadante diluido 1:20 de la cepa vacuolizante de *V. cholerae* 69750 preincubado con anticuerpos anti-hemolisina HlyA. Las células se trataron durante 24 h, se tiñeron con colorante de Wright y se observaron con ayuda de un microscopio de luz invertido. En las células Vero tratadas con el anticuerpo, no se detectaron vacuolas en el citoplasma de las mismas y conservaron una confluencia del 90% aproximadamente (Fig. 13-C). En las células Vero que se trataron únicamente con el sobrenadante de la cepa 69750, se observó la formación de abundantes vacuolas y la pérdida de la confluencia en un 70% (Fig. 13-B). Como control de especificidad de los anticuerpos anti-hemolisina, se incluyó un tratamiento con el sobrenadante de la cepa vacuolizante preincubado con suero preinmune de conejo. La actividad vacuolizante no fue inhibida con este tratamiento (Fig. 13-D), corroborando la especificidad de los anticuerpos anti-hemolisina en el reconocimiento y bloqueo de la proteína HlyA de *V. cholerae*. Con estos resultados establecimos que el empleo de anticuerpos anti-hemolisina previene la vacuolización en las células Vero tratadas con el sobrenadante de la cepa de *V. cholerae* 69750.



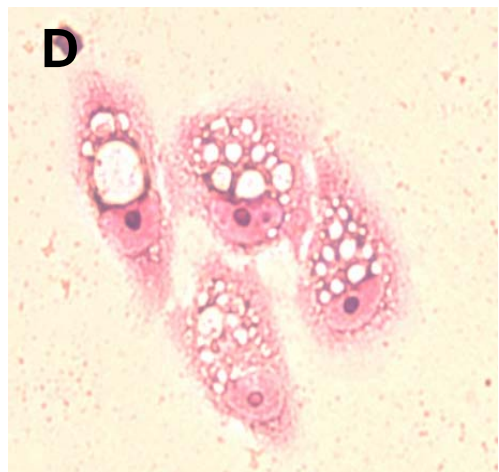
**A**  
Sin tratamiento



**B**  
*V. cholerae* 69750



**C**  
*V. cholerae* 69750  
+ anticuerpo anti-HlyA



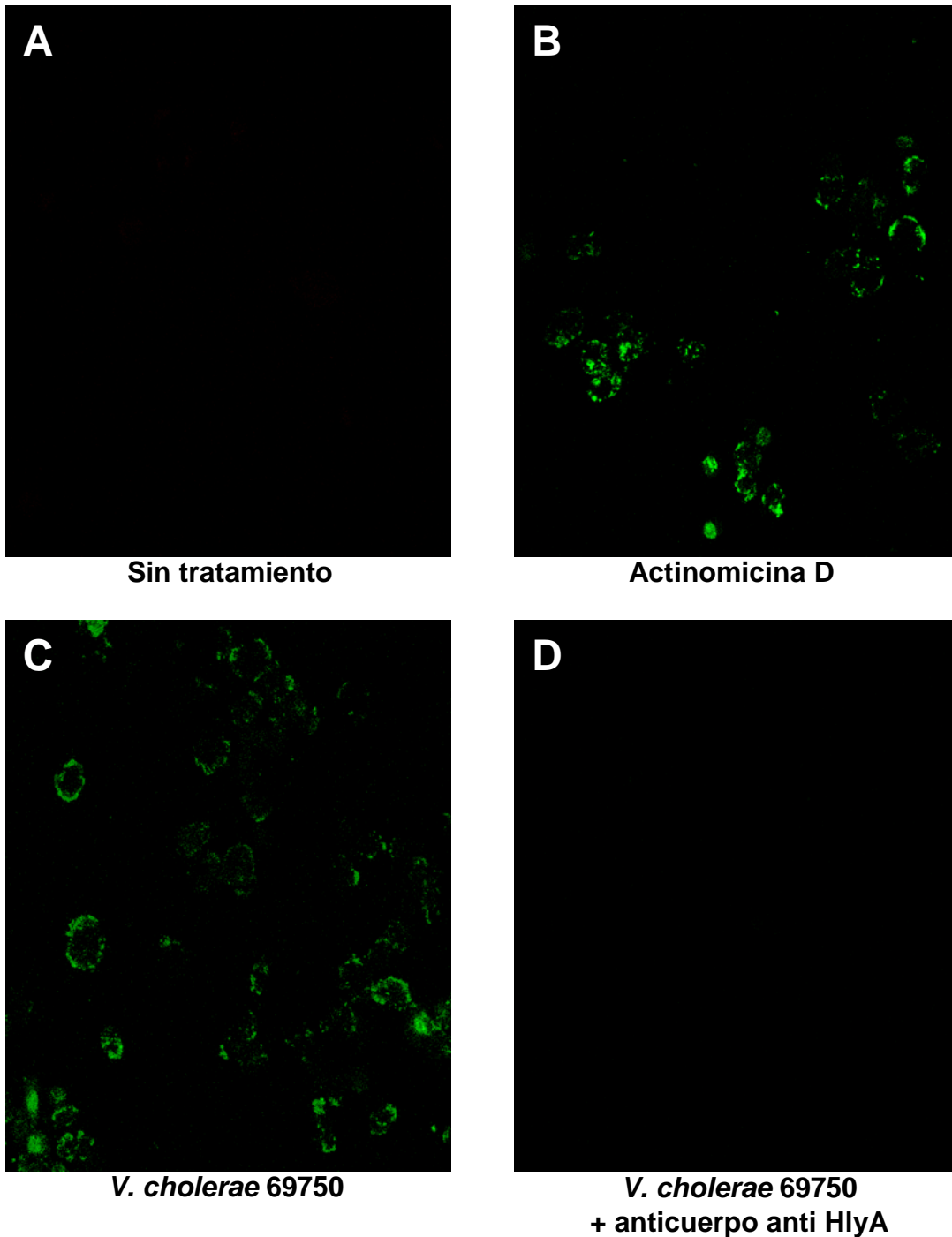
**D**  
*V. cholerae* 69750  
+ suero preimmune

**Fig. 13. Inhibición de la vacuolización de células Vero empleando anticuerpos anti-hemolisina HlyA.** Cultivos de células Vero (A), se trataron con sobrenadante de *V. cholerae* de la cepa 69750 a una dilución 1:20 (B); sobrenadante de la cepa 69750 más anticuerpos policlonales anti-hemolisina HlyA (C); preincubación del sobrenadante de la cepa 69750 con suero preimmune (D). Las células se fijaron con metanol y se tiñeron con colorante de Wright. La formación de vacuolas o inhibición de las mismas fue observada en un microscopio de luz invertido (amplificación 20X). El empleo de anticuerpos anti-hemolisina inhibió la vacuolización inducida con el sobrenadante de la cepa 69750.

### **Inhibición de la apoptosis empleando anticuerpos anti-HlyA**

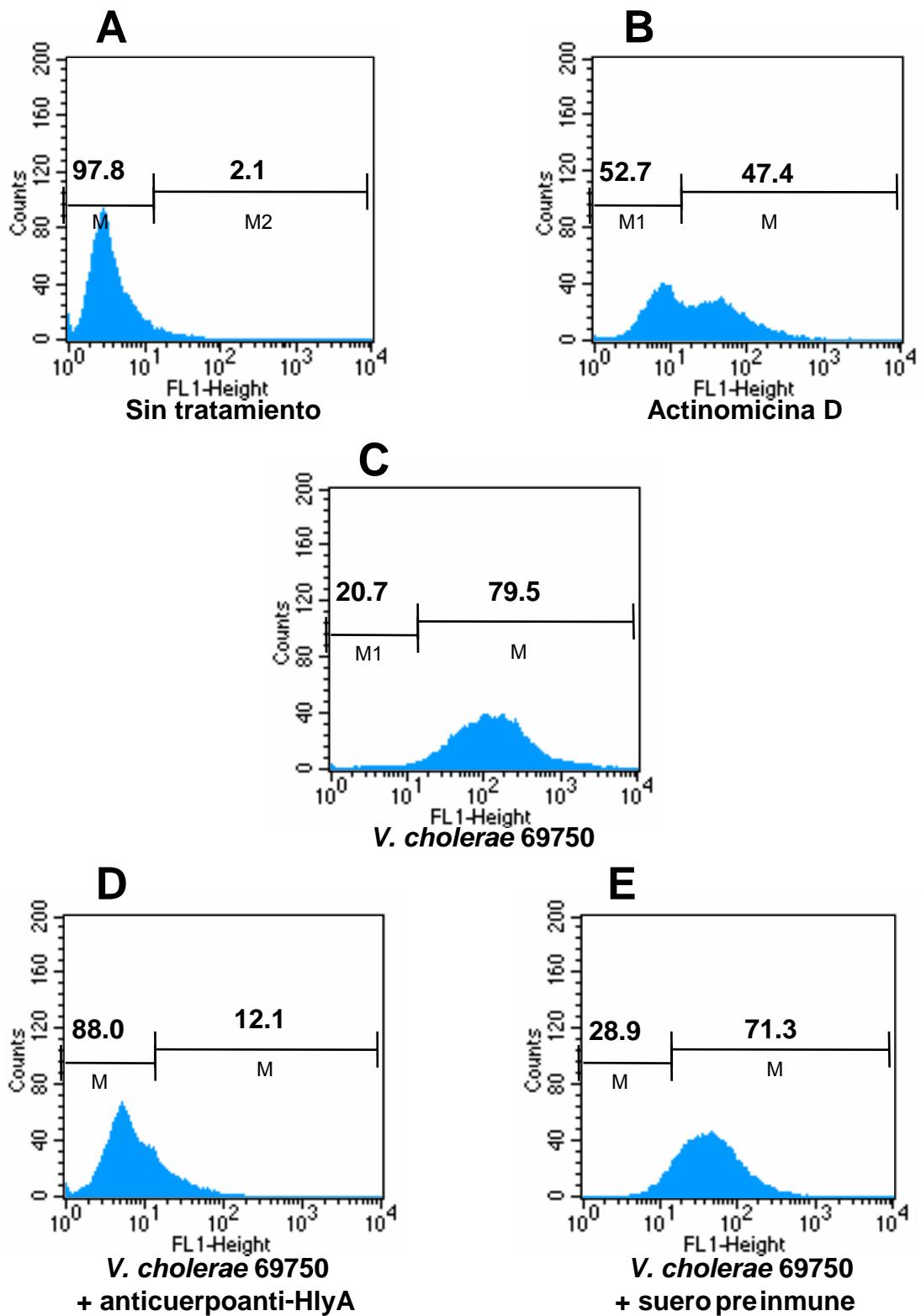
Con la finalidad de determinar si la hemolisina HlyA de *V. cholerae* induce apoptosis en células Vero y Jurkat, se utilizaron anticuerpos anti-hemolisina para inhibir la fragmentación del DNA. Las células se procesaron mediante la técnica de TUNEL, y las células apoptóticas se identificaron mediante microscopía confocal. Las células positivas para la tinción se evidenciaron por un marcaje verde fluorescente. Las células Vero que se trataron con el sobrenadante diluido 1:20 de la cepa 69750 mostraron fragmentación del DNA (Fig. 14-C), de manera similar al patrón de marcaje de las células Vero tratadas con Actinomicina D (Fig. 14-B). Cuando las células Vero se trataron con el sobrenadante de la cepa vacuolizante 69750 pre-incubado con anticuerpos anti-hemolisina, no fue posible detectar células con núcleos marcados en color verde, indicando que las células fueron negativas para la tinción (Fig. 14-D). Estos datos nos indican que el bloqueo de la hemolisina HlyA mediante la utilización de anticuerpos, inhibió la fragmentación del DNA en células Vero. Para determinar de manera cuantitativa las células apoptóticas con los diferentes tratamientos empleados, se realizó el análisis mediante citometría de flujo después de contabilizar  $10^4$  eventos por experimento. Los resultados obtenidos indicaron que el bloqueo de la hemolisina con anticuerpos específicos es capaz de inhibir la fragmentación del DNA de manera significativa ( $P < 0.05$ ) en células Vero (Fig. 15-D).

Las células Jurkat se sometieron a los mismos tratamientos que las células Vero. La fragmentación del DNA se evidenció mediante microscopía confocal. Cuando las células Jurkat se trataron con el sobrenadante de la

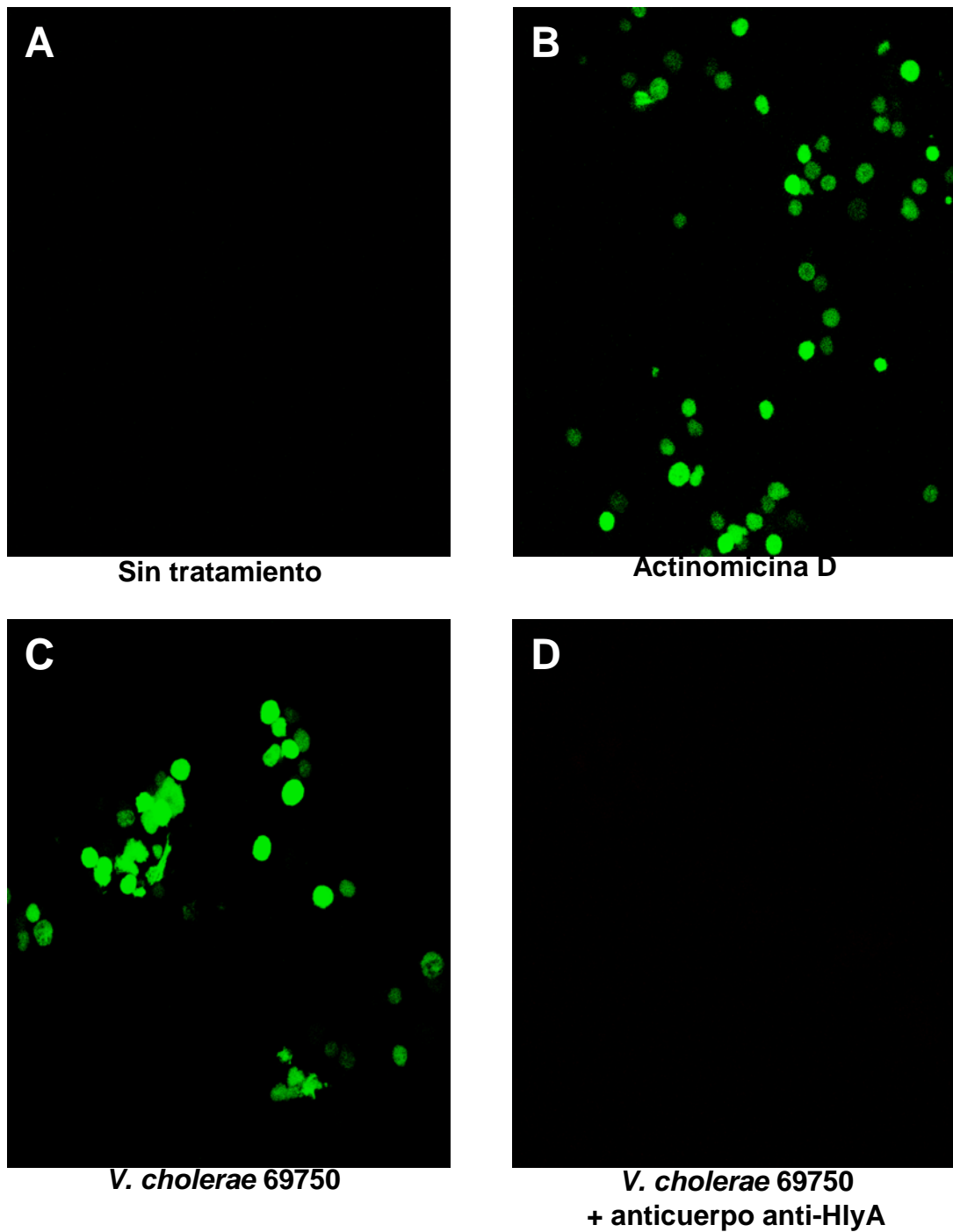


**Fig. 14. Fragmentación del DNA en células Vero intoxicadas con la hemolisina HlyA.** Cultivos de células Vero (A), fueron tratadas con Actinomicina D 3  $\mu$ M (B), sobrenadante de la cepa 69750 de *V. cholerae* diluido 1:20 (C), el sobrenadante a la misma dilución fue pre-incubado con anticuerpos que reconocen a la proteína HlyA (E). Las células se colectaron y la fragmentación de DNA se evidenció mediante la técnica de TUNEL por microscopía confocal. La fluorescencia en verde muestra los núcleos de las células apoptóticas. El empleo de anticuerpos anti-HlyA previene la apoptosis en células Vero.

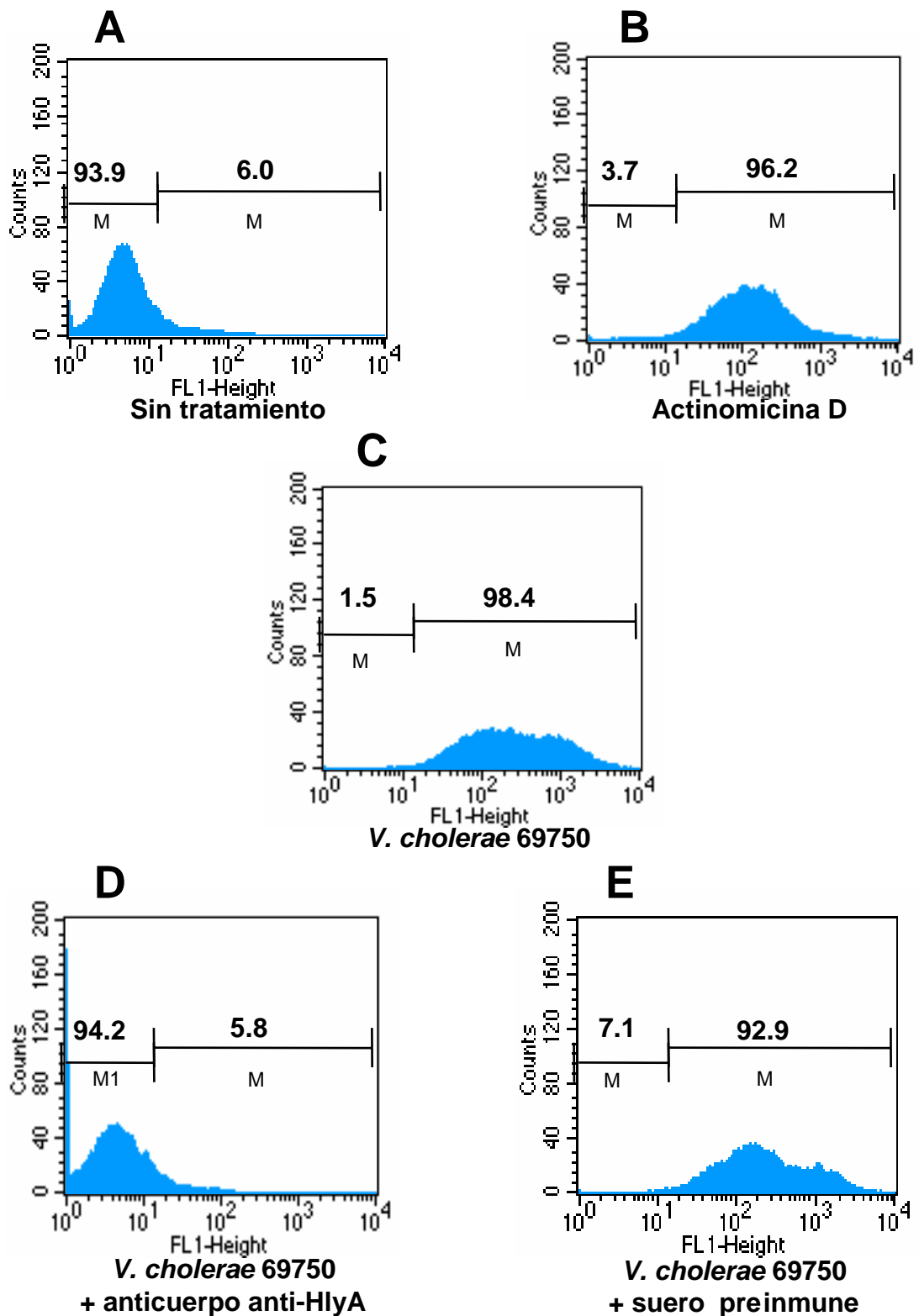




**Fig. 15. Inhibición de la apoptosis de células Vero utilizando anticuerpos anti-hemolisina HlyA.** Cultivos de células Vero (A), se trataron con Actinomicina D (B), sobrenadante de *V. cholerae* de la cepa 69750 diluido 1.20 (C), y sobrenadante de la cepa 69750 pre-incubado con anticuerpos anti-hemolisina HlyA (D). Como control se utilizó suero preimmune (E). Se analizaron  $10^4$  células mediante citometría de flujo. La fragmentación del DNA es detectada mediante la técnica de TUNEL. La utilización de anticuerpos anti-hemolisina HlyA inhibe la fragmentación del DNA en células Vero.



**Fig. 16. Fragmentación del DNA en células Jurkat intoxicadas con la hemolisina HlyA.** Cultivos de células Jurkat (A), se trataron con Actinomicina D (B), sobrenadante de la cepa de *V. cholerae* 69750 diluido 1:20 (C), y el mismo tratamiento que en C más anticuerpos anti-HlyA (D). Las células se procesaron por la técnica de TUNEL y se observaron mediante microscopía confocal. La fluorescencia en verde muestra los núcleos de las células apoptóticas. La utilización de anticuerpos anti-HlyA previene la apoptosis en las células Jurkat.



**Fig. 17.** Inhibición de la apoptosis en células Jurkat mediante la utilización de anticuerpos anti-hemolisina HlyA. Cultivos de células Jurkat (A), se trataron con Actinomícina D (B); sobrenadante de *V. cholerae* de la cepa 69750 diluido 1:20 (C), y el mismo tratamiento que en C con anticuerpos anti-hemolisina HlyA. Como control se utilizó suero preimmune (E). Las células Jurkat se procesaron mediante la técnica de TUNEL y se analizaron  $10^4$  células por citometría de flujo. El empleo de anticuerpos anti-hemolisina HlyA previene la fragmentación del DNA en células Jurkat.

cepa 69750, la fragmentación del DNA se evidenció por el marcaje de los núcleos en color verde (Fig 16-C), de manera similar a las células tratadas con Actinomicina D (Fig. 16-B). Sin embargo, cuando las células se trataron con el sobrenadante de la cepa 69750 preincubado con anticuerpos anti-hemolisina, no se observaron células con el DNA fragmentado (Fig. 16-D). Con la finalidad realizar un análisis cuantitativo de las células apoptóticas bajo los diferentes tratamientos, se analizaron  $10^4$  células Jurkat por experimento mediante citometría de flujo. Las células Jurkat tratadas con el sobrenadante de la cepa 69750 presentan fragmentación del DNA en el 98.4% de las células (Fig. 16-C). Cuando las células se trataron con el sobrenadante preincubado con anticuerpos anti-hemolisina HlyA, la fragmentación del DNA ocurre solo en el 5.8% de la población celular (Fig. 16-D). Para verificar que la unión de los anticuerpos anti-hemolisina es específica, se realizó un tratamiento con suero pre-inmune de conejo. En las células con este tratamiento, no fue posible inhibir la fragmentación del DNA. Estos datos indican que el bloqueo de la hemolisina HlyA, mediante la utilización de anticuerpos es capaz de inhibir la fragmentación del DNA en célula Jurkat.

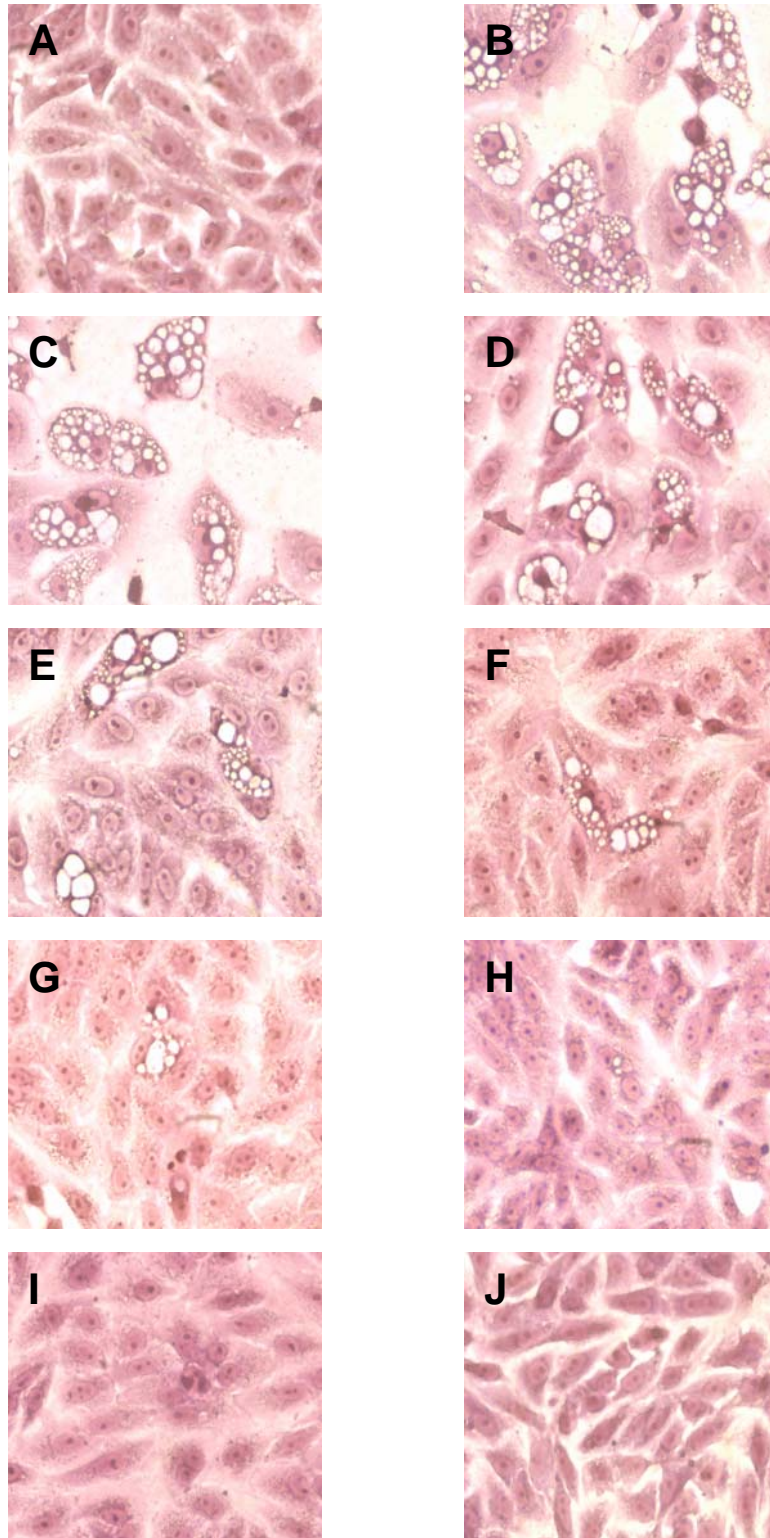
Con los resultados obtenidos podemos determinar que la hemolisina HlyA es responsable de la inducción de apoptosis en las células Vero y en las células Jurkat.

## **Participación del canal aniónico HlyA en la vacuolización y apoptosis celular**

### **DIDS inhibe la vacuolización inducida por la hemolisina HlyA**

Recientemente se ha reportado la capacidad del inhibidor de canales aniónicos DIDS para prevenir la formación de vacuolas inducidas por la proteína HlyA (Moschioni et al, 2002). Con la finalidad de evidenciar la importancia del canal aniónico formado por la hemolisina producida por *V. cholerae* en el proceso de vacuolización, se empleó el inhibidor específico de canales aniónicos DIDS en células Vero tratadas simultáneamente con sobrenadante de la cepa vacuolizante 69750. Los cultivos celulares se trataron con sobrenadante estéril de cultivos de *V. cholerae* diluido 1:20 y diferentes concentraciones de DIDS (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 300  $\mu$ M, 400  $\mu$ M, y 500  $\mu$ M). El experimento con las células sometidas a las diferentes condiciones se incubó durante 24 h. Transcurrido este tiempo, las células se fijaron con metanol y se tiñeron por 5 min con colorante de Wright. La formación o la inhibición de las vacuolas en células Vero se cuantificó contando las células vacuolizadas con ayuda de un microscopio de luz invertido. Como control positivo de vacuolización se incluyeron células tratadas únicamente con sobrenadante de la cepa 69750. Cultivos de células sin tratamiento integraron el control negativo. Además, con la finalidad de determinar si el inhibidor induce efectos tóxicos en las células, se incluyeron tratamientos con las diferentes concentraciones de DIDS sin sobrenadante.

Las células tratadas a una concentración de 25  $\mu$ M y 50  $\mu$ M de DIDS (Fig. 18 C-D), no mostraron efecto inhibitorio alguno, ya que fue posible observar células que presentaron la formación de vacuolas de manera



**Fig. 18. Efecto dosis dependiente de DIDS en la inhibición del proceso de vacuolización.** Cultivos de células Vero (A), se trataron con sobrenadante de la cepa de *V. cholerae* 69750 diluido 1:20 (B), y sobrenadante con el inhibidor DIDS a concentraciones de 25  $\mu\text{M}$  (C), 50  $\mu\text{M}$  (D), 100  $\mu\text{M}$  (E), 200  $\mu\text{M}$  (F), 300  $\mu\text{M}$  (G), 400  $\mu\text{M}$  (H), 500  $\mu\text{M}$  (I), y únicamente con DIDS 500  $\mu\text{M}$  (J). La concentración a la cual fue posible observar un efecto inhibitorio total en la formación de vacuolas correspondió a 500  $\mu\text{M}$  de DIDS.

similar al control positivo (80%). Sin embargo, a partir de una concentración de 100  $\mu\text{M}$  del inhibidor, se empezó a observar una disminución paulatina en el número de células con efecto de vacuolización (Fig. 18-E). Conforme se adicionó una mayor concentración del inhibidor DIDS se observó que el número de células vacuolizadas disminuyó, así como el tamaño y número de las vacuolas en cada célula (Fig. 18 F-H). A una concentración de 500  $\mu\text{M}$  de DIDS fue posible observar un efecto inhibitorio total en la formación de vacuolas (Fig. 18-I). Las células tratadas bajo estas condiciones presentaron una morfología similar al control negativo sin tratamiento (Fig. 18-A). Además, determinamos que el inhibidor a una concentración de 500  $\mu\text{M}$  no es capaz de inducir efecto citotóxico alguno (Fig. 18-J), ya que las células conservaron su morfología y confluencia de manera similar al control sin tratamiento. Con estos resultados podemos determinar que el empleo de DIDS ejerce un efecto dosis dependiente en la inhibición de la formación de vacuolas inducidas por la hemolisina HlyA de *V. cholerae*. Además, hemos elegido la concentración de 500  $\mu\text{M}$  de DIDS como la óptima para observar un efecto inhibitorio total en la vacuolización.

### **DIDS inhibe la apoptosis inducida por la hemolisina HlyA**

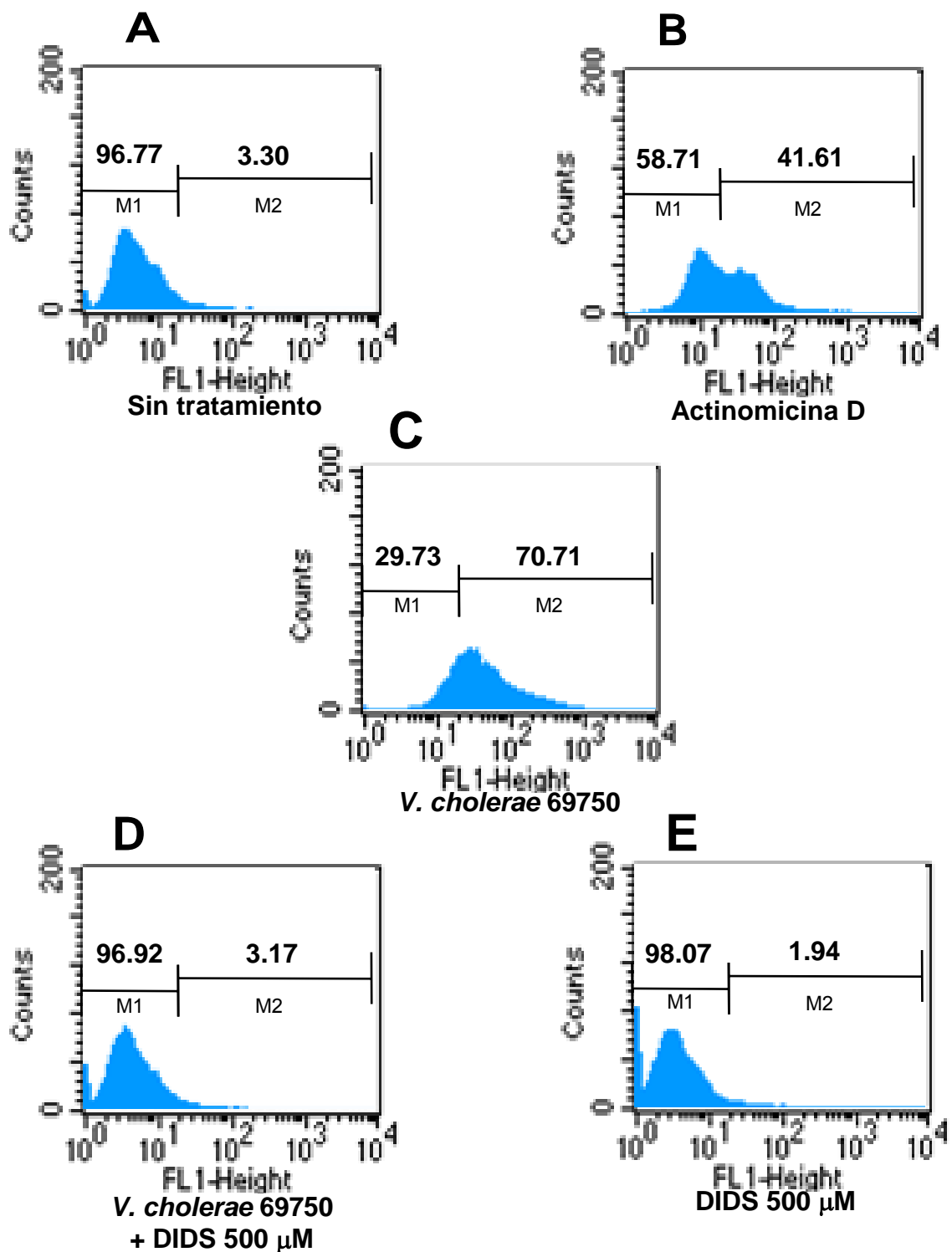
Con la finalidad de determinar si el canal aniónico formado por la hemolisina HlyA es responsable del efecto inductor de fragmentación del DNA, se utilizó el inhibidor de canales aniónicos DIDS. Para ello, se trataron simultáneamente células Vero con el inhibidor DIDS a una concentración de 500  $\mu\text{M}$  y sobrenadante de *V. cholerae* diluido 1:20. Las células se incubaron durante 24 h. Posteriormente, se colectaron y se procesaron mediante la

técnica de TUNEL para evaluar la fragmentación del DNA. El análisis de las células se realizó mediante citometría de flujo después de contabilizar  $10^4$  eventos por experimento.

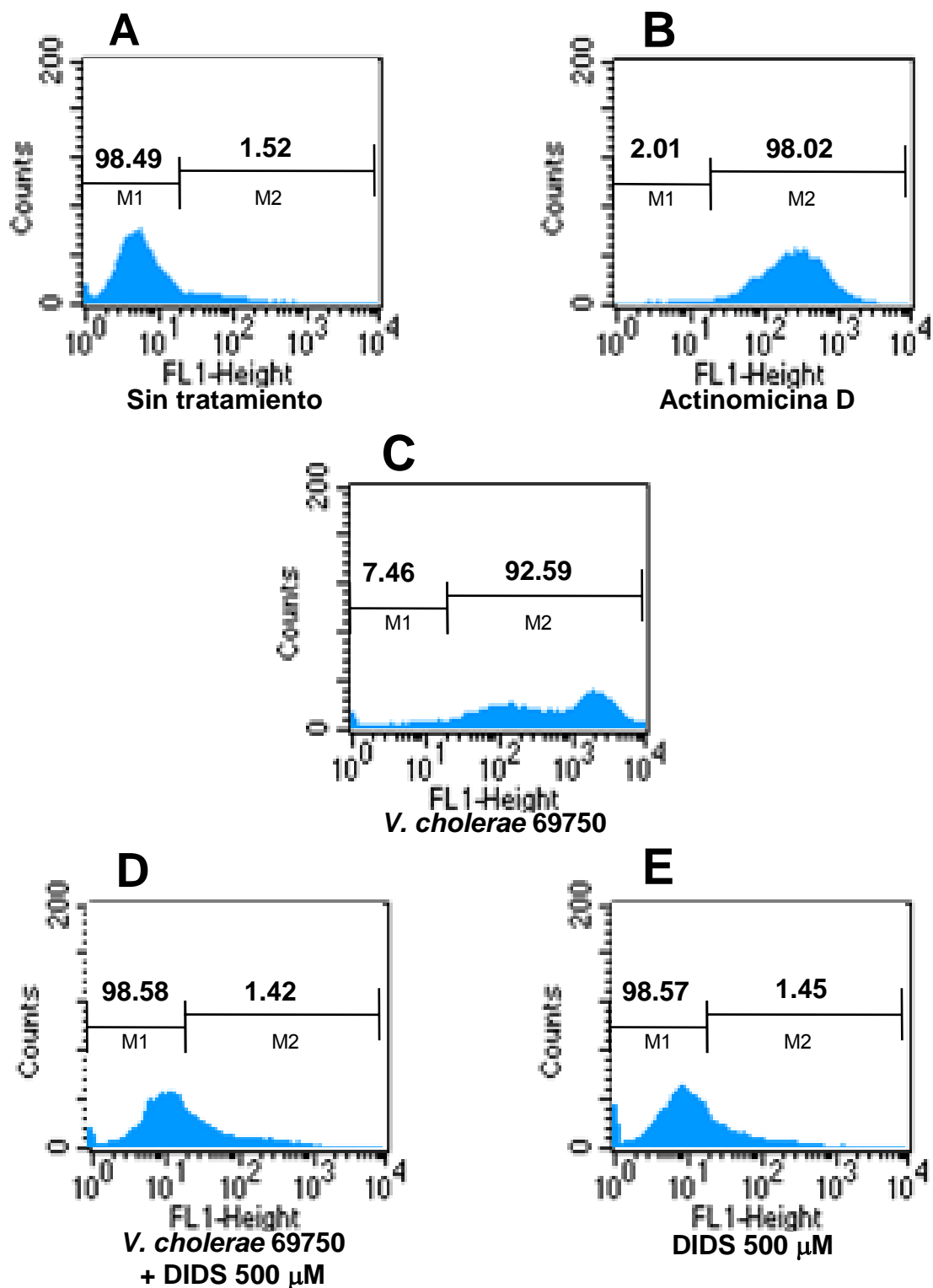
Los resultados obtenidos mostraron que el empleo de DIDS a una concentración de  $500 \mu\text{M}$  es capaz de inhibir la fragmentación del DNA en células tratadas con sobrenadante de la cepa vacuolizante. Este tratamiento permitió observar un 96.9% de células viables (Fig. 19-D), de manera similar al control negativo en el cual se obtuvo un 96.7% de células viables (fig. 19-A). Como control positivo de vacuolización se empleó sobrenadante diluido 1:20 de la cepa 69750, en la cual se observó un 70.7% de células apoptóticas (Fig. 19-C). Para validar el ensayo, se incluyó un tratamiento con Actinomicina D (Fig. 19-B). Además, el inhibidor DIDS a una concentración de  $500 \mu\text{M}$  no fue capaz de inducir fragmentación del DNA en células Vero (Fig. 19-E).

De manera simultánea se determinó si el inhibidor DIDS era capaz de inducir un efecto inhibitorio en la fragmentación del DNA en células Jurkat. Se trataron células Jurkat con el sobrenadante de la cepa vacuolizante diluido 1:20 y una concentración de  $500 \mu\text{M}$  del inhibidor DIDS. Después de 24 h de incubación, las células se procesaron mediante la técnica de TUNEL para evaluar la fragmentación del DNA. Las células apoptóticas con este tratamiento correspondieron al 1.4% (Fig. 20-D), de manera similar al control negativo, en la cual se obtuvo un 98.5% de células viables (Fig. 20-A). Las células tratadas únicamente con el sobrenadante de *V. cholerae* presentaron apoptosis en el 92.6% (Fig. 20-C). Además, se determinó que el inhibidor no es capaz de inducir apoptosis en células Jurkat, ya que la 98.6% de las





**Fig. 19. Inhibición de la apoptosis en células Vero mediante la utilización de DIDS.** Cultivos de células Vero (A), se trataron con Actinomycin D (B), sobrenadante de *V. cholerae* diluido 1:20 (C), sobrenadante más 500  $\mu$ M de DIDS (D), y 500  $\mu$ M de DIDS (E). Las células se procesaron mediante la técnica de TUNEL para evaluar la apoptosis por citometría de flujo. La utilización de DIDS fue capaz de inhibir la fragmentación del DNA inducida por la hemolisina HlyA en células Vero.



**Fig. 20. Inhibición de la apoptosis en células Jurkat mediante la utilización de DIDS.** Cultivos de células Jurkat (A), se trataron con Actinomicina D (B), sobrenadante de *V. cholerae* diluido 1:20 (C), sobrenadante más 500  $\mu$ M de DIDS (D), y 500  $\mu$ M de DIDS (E). Las células se procesaron mediante la técnica de TUNEL por citometría de flujo. La utilización de DIDS fue capaz de inhibir la fragmentación del DNA inducida por la hemolisina HlyA en células Jurkat.

células correspondieron a células viables (Fig. 20-E). Para validar el experimento, se incluyó un tratamiento de células Jurkat con Actinomicina D resultando una población apoptótica del 98% (Fig. 20-B).

Estos resultados nos permiten determinar que el empleo del inhibidor de canales aniónicos DIDS a una concentración de 500  $\mu$ M es capaz de inhibir la apoptosis inducida por la hemolisina HlyA de *V. cholerae* tanto en células Vero como en células Jurkat.

## VII. DISCUSIÓN

Nuestro grupo reportó recientemente que muchas cepas de *V. cholerae* no-O1 asociadas con enfermedades diarreicas en México, poseen una actividad vacuolizante en cultivos de células epiteliales, y que dicha actividad es debida a la hemolisina HlyA. Los cultivos de células Vero tratados con altas dosis de la hemolisina, además de presentar abundantes vacuolas citoplásmicas, pierden contactos intercelulares produciendo un redondeamiento y desprendimiento que conduce a una lisis celular. (Figueroa-Arredondo et al, 2001).

El proceso de vacuolización es visto como una respuesta fisiológica, presumiblemente para reparar el daño, pero poco se conoce acerca del mecanismo homeostático intracelular que opera para repararlo (Henchís and Wheatley, 1999). Se ha sugerido que la hemolisina HlyA puede ser removida de la membrana plasmática mediante endocitosis hasta alcanzar compartimentos endosomales tardíos. El canal aniónico formado por la hemolisina se encuentra asociado a compartimentos intracelulares en donde se localiza la ATPasa vacuolar. Se ha propuesto que la presencia de un canal de gran conductancia formado por la hemolisina HlyA promueve la actividad de esta ATPasa. Este evento conduce a un incremento en la capacidad del organelo para acumular bases débiles, permitiendo el ingreso de agua y causando su hinchamiento, lo que lleva a la formación de grandes vacuolas. Además, Moschioni et al (2002), han determinado que el canal aniónico es responsable de la muerte celular vía necrosis, misma que presentan las células tratadas con altas concentraciones de hemolisina,

como lo hemos corroborado en este estudio. No obstante, las células vacuolizadas no sufren necrosis, sino apoptosis, como lo demostramos aquí.

En este trabajo investigamos la posible inducción de apoptosis como una vía de muerte celular alterna a la necrosis, inducida por la hemolisina HlyA de *V. cholerae* en las células vacuolizadas. Nuestros resultados concuerdan con los resultados publicados por autores que han determinado que otras toxinas formadoras de poros son capaces de inducir apoptosis en células eucarióticas. Por ejemplo, la toxina VacA de *H. pylori* es una proteína formadora de poros capaz de inducir vacuolización y apoptosis en células epiteliales (Tómbola et al, 1999; Cover et al, 2003; Kuck et al, 2001) La  $\alpha$ -toxina de *Staphylococcus aureus* es una proteína que también forma poros e induce degradación del DNA en linfocitos T (Jonas et al, 1994).

En este trabajo determinamos que las células epiteliales Vero vacuolizadas presentan marcadores de muerte celular vía apoptosis, tanto de las características de etapas tempranas (translocación de fosfatidilserina) como tardías (fragmentación del DNA). La detección de células marcadas con anexina V-FITC, un marcador de etapas tempranas de apoptosis, mostró que los tratamientos con hemolisina son inductores de apoptosis. Lo anterior se sustenta debido a que el empleo del sobrenadante de *V. cholerae* 69750 diluido 1:20 induce vacuolización en el 80% de las células Vero, y es esta misma dilución capaz de inducir una mayor población de células positivas para la tinción con anexina V-FITC, es decir, células apoptóticas. Este resultado demuestra un efecto dosis dependiente en la aparición de este marcador temprano de apoptosis con respecto a la dilución del sobrenadante de la cepa vacuolizante 69750 (Fig. 7). Estos datos

correlacionan el efecto vacuolizante con la inducción de apoptosis en células Vero.

Para apoyar que la hemolisina tiene un efecto inductor de apoptosis que no es exclusivo de células Vero, se empleó la línea de células Jurkat. La línea de células Jurkat ha sido ampliamente utilizada como modelo *in vitro* de células del sistema inmune en estudios de apoptosis (Abraham and Weiss, 2004). Observamos que las células Jurkat son susceptibles de ser intoxicadas por la hemolisina vacuolizante HlyA, induciendo una muerte celular exclusivamente vía apoptosis (Fig. 9). Esta conclusión se basa en el hecho de encontrar un 89% de células positivas al marcaje con anexina V-FITC. Estos datos sugieren que las células Jurkat son más susceptibles al efecto inductor de muerte celular vía apoptosis que las células Vero. Esta hipótesis se basa en el hecho de que no detectamos células Jurkat marcadas con yoduro de propidio características de necrosis (2%). Por el contrario, las células Vero sometidas al mismo tratamiento que las células Jurkat, presentan una población necrótica que corresponde al 39% y una población en apoptosis tardía del 43%. Existen diferentes grados de susceptibilidad a la intoxicación por la hemolisina HlyA en la formación de vacuolas, siendo este efecto vacuolizante más evidente en células Vero comparadas con células HeLa y A431, sin embargo, la vacuolización no ocurre en células MDCK-1 y BHK (Moschioni et al, 2002).

En este trabajo investigamos el posible procesamiento de PARP en células Vero y Jurkat intoxicadas con hemolisina HlyA. Mediante ensayos de Western-blot, utilizando anticuerpos policlonales anti-PARP, revelamos el patrón de procesamiento de esta proteína. Observamos que en las células

Vero vacuolizadas PARP no es procesada, ya que encontramos una banda de 113 kDa que corresponde al tamaño de la proteína completa (fig. 10 carril 4). Sin embargo, en células Jurkat intoxicadas por la hemolisina, detectamos los fragmentos de 113 kDa y de 89 kDa (Fig. 10 carril 7). Este resultado nos indica que la intoxicación con la hemolisina involucra el procesamiento de PARP sólo en células Jurkat. Se ha demostrado que linfocitos, fibroblastos, hepatocitos y células neuronales *PARP*<sup>-/-</sup> presentan una vía apoptótica normal cuando ésta se induce con TNF- $\alpha$  y anti-Fas, sugiriendo que la fragmentación de PARP es consecuencia del proceso apoptótico y no un componente integral del mismo (Wang et al, 1997). Recientemente se ha demostrado en células Hep3B tratadas con el inductor de apoptosis camptotecina, que la proteína PARP no es fragmentada a pesar de que las células exhiben características apoptóticas (Adjei et al, 1996). Otros estudios han reportado que fibroblastos expuestos a agentes alquilantes (MNNG) requieren de la activación de PARP para inducir la translocación del factor inductor de apoptosis (AIF) desde la mitocondria al núcleo. Este evento resulta en una vía de muerte celular programada independiente de caspasas (Yu et al, 2002).

La degradación del DNA en unidades nucleosomales es una de las características bioquímicas de la muerte celular vía apoptosis y es este evento en el que se fundamenta la técnica de TUNEL, un protocolo comúnmente empleado para detectar células apoptóticas en etapas finales (Nagata, 2000). En este trabajo demostramos que las células Vero vacuolizadas y las células Jurkat tratadas con sobrenadantes provenientes de cultivos de la cepa vacuolizante de *V. cholerae* 69750 presentan

fragmentación del DNA en el 88% y 98% respectivamente (Fig. 11-12). Además, hemos determinado que este efecto inductor de apoptosis es debido a la hemolisina vacuolizante HlyA presente en el sobrenadante de la cepa 69750 (Fig. 14-17). Esta conclusión se basa en los experimentos realizados en los que se pre-incubaron anticuerpos anti-hemolisina con el sobrenadante de la cepa 69750. El bloqueo de la hemolisina con anticuerpos impidió el proceso de vacuolización en células Vero (Fig. 13), además de inhibir la fragmentación del DNA en células Vero y en Jurkat. Estos resultados se evidenciaron mediante la técnica de TUNEL detectada por microscopía confocal y citometría de flujo.

Se ha demostrado que la hemolisina HlyA forma un poro transmembranal de 0.9 -1.0 nm de diámetro que conduce a la lisis celular debido a la formación de un canal aniónico (Krasilnikov et al, 1992; Zitzer et al, 1997). Recientemente se reportó que la inhibición específica de canales aniónicos por DIDS y SITS no sólo previene la vacuolización sino también la muerte por lisis de las células Vero tratadas con altas concentraciones de la hemolisina HlyA de *V. cholerae*. Estos resultados demuestran que la vacuolización y la lisis de las células se producen cuando el canal aniónico formado por la hemolisina HlyA está activo. Con la finalidad de determinar si el canal aniónico es responsable de la fragmentación del DNA en células Vero y Jurkat, se utilizó el inhibidor DIDS. En este trabajo corroboramos que el empleo de este inhibidor es capaz de prevenir la vacuolización en células Vero tratadas con el sobrenadante de la cepa 69750. Además, demostramos que la utilización de DIDS es capaz de inhibir la fragmentación del DNA tanto en células Vero como en células Jurkat que han sido tratadas con



sobrenadantes de la cepa 69750 de *V. cholerae*. Estos resultados sugieren fuertemente que el canal aniónico de la hemolisina HlyA es responsable de la inducción de apoptosis en células Vero y Jurkat.

En otros estudios se ha reportado que el canal aniónico formado por la hemolisina HlyA permite el flujo de iones potasio, sin embargo, es impermeable a iones divalentes como el calcio (Zitzer et al, 1997). Recientemente se ha demostrado que en etapas tempranas de apoptosis, existe una disminución del volumen celular inducido por la activación de procesos fisiológicos que involucran canales de  $K^+$  y  $Cl^-$ . La estimulación de células HeLa, U397, PC12 y NG108-15 con los inductores de apoptosis estaurosporina,  $TNF\alpha$  o ligando de Fas induce la activación de canales de  $K^+$  y  $Cl^-$ . Además, la utilización de bloqueadores de canales de  $K^+$  (quinina) y  $Cl^-$  (DIDS, SITS) previene la disminución del volumen celular que ocasiona la apoptosis en las cuatro líneas celulares y bajo los mismos estímulos apoptóticos (Okada et al, 2004). En nuestro modelo es probable que el canal aniónico formado por la hemolisina HlyA de *V. cholerae* induzca un desequilibrio en el flujo de iones disminuyendo el volumen celular y conduciendo a la activación de la vía apoptótica.

De manera interesante, nuestros resultados coinciden con los mecanismos de muerte celular por apoptosis ejercidos por otras toxinas formadoras de poros. La toxina vacuolizante VacA producida por *H. pylori*, es una de las proteínas formadoras de poros mejor caracterizada. La proteína VacA tiene la capacidad de inducir apoptosis en células epiteliales vacuolizadas (Cover and Blaser, 1992; Kuck et al, 2001; Cover et al, 2003). Además, se ha evidenciado que la toxina VacA es capaz de asociarse a la

mitocondria e inducir la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, conduciendo a la liberación de citocromo c. Se ha demostrado mediante la utilización de inhibidores como DIDS que la vacuolización y la liberación de citocromo c son consecuencia del canal aniónico formado por la toxina VacA. Estos eventos resultan en la iniciación del proceso apoptótico mediante la vía intrínseca. (Tómbola et al; 1999, 2000, 2001; Galmiche et al, 2000; Willhite et al; 2003, 2004).

Se ha establecido que la proteína HlyA secretada por *V. cholerae* es responsable de la formación de vacuolas en células de origen epitelial (Figuroa-Arredondo et al, 2001). En este trabajo hemos demostrado que la hemolisina HlyA es capaz de inducir fragmentación del DNA en células epiteliales Vero vacuolizadas. Sorprendentemente, la hemolisina HlyA induce apoptosis también en células del sistema inmune (Jurkat). Estos resultados abren la posibilidad de que el blanco celular de la hemolisina no esté limitado a células de origen epitelial. De manera interesante, nuestro trabajo sugiere fuertemente que el canal aniónico formado por la hemolisina HlyA es responsable de la inducción de apoptosis. Aún no se conoce a detalle el mecanismo molecular que opera en el proceso de intoxicación celular por la hemolisina HlyA. Es interesante pensar en la posibilidad que la hemolisina HlyA de *V. cholerae* induzca un mecanismo de muerte celular con características apoptóticas mediante la activación de la vía intrínseca, como ocurre con VacA de *H. pylori*.

## VIII. CONCLUSIONES

1. La hemolisina vacuolizante HlyA de *V. cholerae* es una toxina que induce fragmentación del DNA tanto en células Vero y como en células Jurkat.
2. La proteína PARP es fragmentada en células Jurkat intoxicadas con la hemolisina, sin embargo, este procesamiento no fue evidenciado en células Vero vacuolizadas.
3. El empleo del inhibidor de canales aniónicos DIDS previene la formación de vacuolas citoplásmicas en células Vero, confirmando que el canal aniónico es responsable del proceso de vacuolización.
4. La utilización del inhibidor DIDS inhibe la apoptosis inducida por la hemolisina vacuolizante HlyA en células Vero y en células Jurkat, sugiriendo fuertemente que es el canal aniónico formado por la hemolisina el responsable de la inducción de apoptosis.

## IX. PERSPECTIVAS

En este trabajo determinamos que la hemolisina HlyA presente en sobrenadantes de cultivos de la cepa de *V. cholerae* 69750 induce apoptosis en células epiteliales Vero y en células del sistema inmune (Jurkat). Además, determinamos que el empleo del inhibidor de canales aniónicos DIDS previene la apoptosis en ambas líneas celulares. Sin embargo, es importante determinar si las caspasas, proteínas executoras del proceso apoptótico, se encuentran activas en las células Vero y Jurkat intoxicadas por la hemolisina HlyA. Mediante el empleo de inhibidores de caspasas de amplio rango o de inhibidores específicos de caspasas 8 y 9, podríamos determinar de que manera estas proteasas participan en la activación de la apoptosis. Además, estos experimentos nos sugerirían si existe una vía principal de activación que desencadene el proceso apoptótico (intrínseca o extrínseca). Es probable que la hemolisina HlyA sea capaz de asociarse a la mitocondria e inducir la liberación de citocromo c, desencadenando la vía apoptótica de manera intrínseca. La realización de ensayos de co-localización de la hemolisina y la mitocondria nos indicarían si la toxina vacuolizante es capaz de asociarse a este organelo. Además, es interesante corroborar que el canal aniónico formado por la hemolisina HlyA es responsable de la inducción de apoptosis. Para ello se utilizará el inhibidor de canales aniónicos SITS, cuya capacidad de impedir el proceso de vacuolización por la hemolisina ha sido reportado. Estos experimentos apoyarían los resultados presentados en este trabajo en los que empleamos el compuesto DIDS para inhibir la apoptosis en células Vero y Jurkat.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, R.T. and A. Weiss. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signaling paradigm. (2004). *Nat. rev. Immunol.* 4:4;301-308.
- Abrami, L., Fivaz, M., Glauser, P.E., Parton, R.G., and F.G. van der Goot. A pore-forming toxin interacts a GPI-anchored protein and causes vacuolation of the endoplasmic reticulum. (1998). *J. Cell. Biol.* 140:3;525-540.
- Adjei PN, Kaufmann SH, Leung WY, Mao F, Gores GJ. Selective induction of apoptosis in Hep 3B cells by topoisomerase I inhibitors: evidence for a protease-dependent pathway that does not activate cysteine protease P32. (1996). *J Clin Invest.* 98:11;2588-2596.
- Alm, R.A. and P.A. Manning. Characterization of the *hlyB* gene and its role in the production of the El Tor haemolysin of *Vibrio cholerae* O1. (1990). *Mol. Microbiol.* 4:3;413-425.
- Chatterjee, S.N. and K. Chaudhuri. Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae* I. Physical and chemical characterization. (2003). *Biochim. Biophys. Acta.* 1639:2;65-79.
- Chattopadhyay, K., Bhattacharyya, D., and K.K. Banerjee. *Vibrio cholerae* hemolysin. Implication of amphiphilicity and lipid-induced conformational change for its pore-forming activity. (2002). *Eur. J. Biochem.* 269:17;4351-4358.
- Chattopadhyay, K., and K.K. Banerjee. Unfolding of *Vibrio cholerae* hemolysin induces oligomerization of the toxin monomer. (2003). *J. Biol. Chem.* 278:40;38470-38475.

- Cherla, R.P., Lee, S.Y., and V.L. Tesh. Shiga toxins and apoptosis. (2003). *FEMS Microbiol. Lett.* 228:2;159-166.
- Coelho, A., Andrade, J.R., Vicente, A.C.P., and V.J. DiRita. Cytotoxic cell vacuolation activity from *Vibrio cholerae* hemolysin. (2000). *Infect. Immun.* 68:3;1700-1705.
- Cover, T.L., and M.J. Blaser. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. (1992). *J. Biol. Chem.* 267:15;10570-10575.
- Cover, T.L. Krishna, U.S., Israel, D.A., and R.M. Peek. Induction of gastric epithelial cells apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. (2003). *Cancer Res.* 63:5;951-957.
- Czajkowsky, D.M., Iwamoto, H., Cover, T.L. and Z. Shao. The vacuolating toxin from *Helicobacter pylori* forms hexameric pores in lipid bilayers at low pH. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:5;2001-2006.
- Danial, K.M., and S.J. Korsmeyer. Cell death: critical control points. (2004). *Cell.* 116;205-219.
- De, S.N. Enterotoxicity of bacteria-free culture filtrate of *Vibrio cholerae*. (1959). *Nature.* 138:4574;1533-1534.
- DeBernard, M., Burroni, D., Papini, E., Rappuoli, R., Telford, J., and C. Montecucco. Identification of the *Helicobacter pylori* VacA toxin domain active in the cell cytosol. (1998). *Infect. Immun.* 66:12;6014-6016.
- Duriez, P.J., and G.M. Shah. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. (1997). *Biochem. Cell. Biol.* 75;337-349.

- Faruque S.M. and G.B. Nair. Molecular ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. (2002). *Microbiol.Immunol.* 46:2;59-66.
- Faruque, SM., Chowdhury, N., Kamruzzaman, M., Dziejman, M., Rhaman, M.H., Sack, D.A., Nair, G.B., and J.J. Mekalanos. Genetic diversity and virulence potential of environmental *Vibrio cholerae* population in a cholera-endemic area. (2004). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:7;2123-2128.
- Fasano, A., Baudry, B., Pumplin, B.W., Wasserman, S.S., Tall, B.D., Ketley, J.M., and J.B. Kaper. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:12;5242-5246.
- Figuroa-Arredondo, P., Heuser, J.E., Akopyants, N.S., Morisaki, J.H., Giono, S., Enriquez, F., and D.E. Berg. Cell vacuolation caused by *Vibrio cholerae* hemolysin. (2001). *Infect. Immun.* 69:3;1613-1624.
- Finkelstein, R.A. and J.J. Lospalluto. Pathogenesis of experimental cholera: preparation and isolation of cholera toxin and cholera toxin B subunit. (1969). *J. Exp. Med.* 130:1;185-202.
- Galmiche, A., Rpsow, J., Doye, A., Cagnol, S., Chambard, J.C., Contamin, S., Thillot, V., Ricci, V., Solcia, E., Obberghen, E.V., and P. Boquet. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. (2000). *EMBO J.* 19:23;6361-6370.
- Goldberg, I., and J.J. Mekalanos. Effect of a *recA* mutation on cholera toxin gene amplification and deletion events. (1986). *J. Bacteriol.* 165:3;723-731.

- Goldberg, S.L. and J.R. Murphy. Cloning and characterization of the hemolysin determinants from *Vibrio cholerae* RV79(HlyA<sup>+</sup>), RV79(HlyA<sup>-</sup>), and 569B. (1985). *J. Bacteriol.* 162:1;35-41.
- Guimarães, C.A., and R. Linden. Programmed cell death. Apoptosis and alternative deathstyles. (2004). *Eur. J. Biochem.* 27:9;1638-1650.
- Hall, R.H., and B.S. Drasar. *Vibrio cholerae* HlyA hemolysin is processed by proteolysis. (1990). *Infect. Immun.* 58:10;3375-3379.
- Harris, J.R., Bhakdi, S., Meissner, U., Scheffler, D., Bittman, R., Li, G., Zitzer, A., and M. Palmer. Interaction of the *Vibrio cholerae* cytolysin (VCC) with cholesterol, some cholesterol esters, and cholesterol derivatives: a TEM study. (2002). *J. Struct. Biol.* 139:2;122-135.
- Henderson, I.L., Navarro, F., and J.P. Nataro. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. (1998). *Trends. Microbiol.* 6:9;370-378.
- Henics T, and D.N. Wheatley. Cytoplasmic vacuolation, adaptation and cell death: a view on new perspectives and features. (1999). *Biol Cell.* 91:7;485-498.
- Honda, T., and R.A. Finkelstein. Purification and characterization of a hemolysin produced by *Vibrio cholerae* biotype El Tor: another toxic substance produced by cholera vibrios. (1979). *Infect. Immun.* 26:3;1020-1027.
- Huntley, J.S., Hall, A.C., Sathyamoorthy, V., and R.H. Hall., Cation flux studies of the lesion induced in human erythrocytes membranes by the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahemolyticus*. (1993). *Infect. Immun.* 61:10;4326-4332.



- Huntley, JS., Sathyamoorthy, V., Hall, RH., and A.C. Hall. Membrane attack induced by HlyA, a pore-forming toxin of *Vibrio cholerae*. (1997). *Hum Exp Toxicol.* 16:2;101-105.
- Ichinose, Y., Yamamoto, K., Nakasone, N., Tanabe, M.J., Takeda, T., Miwatani, T., and M. Iwanaga. Enterotoxicity of el Tor-like hemolysin of non-O1 *Vibrio cholerae*. (1987). *Infect. Immun.* 55:5;1090-1093.
- Ilver, D., Barone, S., Mercati, D., Lupetti, P., and J.L. Telford. *Helicobacter pylori* toxin VacA is transferred to host cells via a novel contact-dependent mechanism. (2004). *Cel Microbiol.* 6:2;167-174.
- Ikigai, H., Akatsura, A., Tsujimaya, H., Nakae, T., and T. Shimamura. Mechanism of membrane damage by El Tor hemolysin of *Vibrio cholerae* O1. (1996). *Infect. Immun.* 64:8;2968-2973.
- Jonas, D., Walev, I., Berger, T., Liebetrau, M., Palmer, M., S. Bhakdi. Novel path to apoptosis: small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradation. (1994). *Infect Immun.* 62:4;1304-1312.
- Kaper, J.B., Morris, J.G., and M.V. Levine. Cholerae. (1995). *Clin. Microbiol. Rev.* 8:1;48-86.
- Krasilnikov O.V., Muratkhodjaev, J.N., and A.O. Zitzer. The mode of action of *Vibrio cholerae* cytolysin. The influences on both erythrocytes and planar lipid bilayers. (1992). *Biochim. Biophys. Acta.* 1111:1;7-16.
- Kuck, D., Kolmerer, B., Iking-Konert, C., Krammer, P.H., Stremmel, W., and J. Rudi. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. (2001). *Infect Immun.* 69:8;5080-5087.

- Lencer, W.I. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions. *V. cholerae*: invasion of the intestinal epithelial barrier by a stably folded protein toxin. (2001). *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280:5;G781-G786.
- Nguyen, V.Q., Caprioli, R.M., and T.L. Cover. Carboxy-terminal proteolytic processing of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. (2001). *Infect. Immun.* 69:1;543-546.
- Manning, P.A., Brown, M.H., and M.W. Heuzenroeder. Cloning of the structural gene (*hly*) for the haemolysin of *Vibrio cholerae* Tor strain 017. (1984). *Gene.* 3:1;225-231.
- Mekalanos, J.J., Duplication and amplification of the toxin genes in *Vibrio cholerae*. (1983). *Cell.* 35:1;253-263.
- Mekalanos, J.J., Cholera toxin genetic analysis, regulation, and role in pathogenesis (1985). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 118;97-118.
- Menzl, K., Maier, E., Chakraborty, T., and R. Benz. Hly<sub>a</sub> hemolysin of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. Identification of the hemolytic complex and evidence for the formation of anion-selective ion-permeable channels. (1996). *Eur. J. Biochem.* 240:3;646-654.
- Mitra, R., Figueroa, P., Mukhopadhyay A.K., Shimada, T., Takeda, Y., Berg, D.E., and G.B. Nair. Cell vacuolation, a manifestation of the El Tor hemolysin of *Vibrio cholerae*. (2000). *Infect. Immun.* 68:4;1928-1933.
- Moschioni M., Tombola, F., de Bernard, M., Coelho, A., Zitzer, A., Zoratti, M., and C. Montecucco. The *Vibrio cholerae* haemolysin anion channel is required for cell vacuolation and death. (2002). *Cel Microbiol.* 4:7;397-409.

- Nagamune, K., Yamamoto, K., Naka, A., Matsuyama, J., Miwatani, T., and T. Honda. *In Vitro* proteolytic processing and activation of the recombinant precursor of El Tor cytolysin/hemolysin (pro-HlyA) of *Vibrio cholerae* by soluble hemagglutinin/protease of *V. cholerae*, trypsin, and others proteases. (1996). *Infect. Immun.* 64:11;4655-4658.
- Nagata, S. Apoptotic DNA fragmentation. (2000). *Exp Cell Res.* 256:1;12-18.
- Olson R., and E. Gouaux.
- Ogierman, M.A., Fallarino, A., Riess, T., Williams, S.G., Attridge, S.R. and P.A. Manning. Characterization of the *Vibrio cholerae* El Tor lipase operon *lipAB* and a protease gene downstream of the *hly* region. (1997). *J. Bacteriol.* 179:22;7072-7080.
- Pearson, G.D., Woods, A. Chiang, S.L., and J.J. Mekalanos. CTX genetic element encodes a site specific recombination system and an intestinal colonization. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:8;3750-3754.
- Peek, R.M., Blaser, M.J., Mays, D.J., Forsyth, M.H., Cover, T.L., Song, S.Y., Krishna, U., and J.A. Pietenpol. *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cells cycle. (1999). *Cancer Res.* 59:24;61224-6131.
- Rader, A.E., and J.R. Murphy. Nucleotide sequences and comparison of the hemolysin determinants of *Vibrio cholerae* El Tor RV79(Hly+) and RV79(Hly-) and classical 569B(Hly-). (1988). *Infect Immun.* 56:6;1414-1419.

- Reyrat, J.M., Pelicic, V., Papini, E., Montecucco, C., Rappuoli, R., and J.L. Telford. Towards deciphering the *Helicobacter pylori* cytotoxin. (1999). *Mol. Microbiol.* 34:2;3754-3757.
- Rudi, J., Kuck, D., Strand, S., von Herbay, A., Mariani, S.M., Krammer, P.H., Galle, P.R., and W. Stremmel. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand system in *Helicobacter pylori*-induced gastric epithelial apoptosis. (1998). *J. Clin. Invest.* 102:8;1506-514.
- Saha, N., and K.K. Banerjee. Carbohydrate-mediated regulation of interaction of *Vibrio cholerae* hemolysin with erythrocyte and phospholipid vesicle. (1997). *J. Biol. Chem.* 272:1;162-167.
- Stoebner, J.A., and S.M. Payne. Iron-regulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *Vibrio cholerae*. (1988). *Infect. Immun.* 56:11;2891-2895.
- Szabó, I., Brutsche, S., Tombola, F., Moschioni, M., Satin, B., Telford, J.L., Rappuoli, R., Montecucco, C., Papini, E., and M. Zoratti. Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. (1999). *EMBO J.* 18:20;5517-5527.
- Taylor, R.K., Miller, V.L., Furlong, D.B., and J.J. Mekalanos. Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor co-ordinately regulated with cholera toxin. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:9;2833-2837.
- Telford, J.L. Ghiara, P., Dell'Orco, M., Comanducci, M., Burroni, D., Tecce, M.F., Censini, S., Covacci, A., and Z. Xiang. Gene structure of

- Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. (1994). *J.Exp. Med.* 179:5;1653-1658.
- Tombola, F., Carlesso, C., Szabo, I., de Bernard, M., Reytrat, J.M., Telford, J.L., Rappuoli, R., Montecucco, C., Papini, E., and M. Zoratti. *Helicobacter pylori* vacuolating toxin forms anion-selective channels in planar lipid bilayers: possible implications for the mechanism of cellular vacuolation. (1999). *Biophys J.* 76:3;1401-1409.
- Tombola, F., Oregna, F., Brutsche, S., Szabo, I., Del Giudice, G., Rappuoli, R., Montecucco, C., Papini, E., and M. Zoratti. Inhibition of the vacuolating and anion channel activities of the VacA toxin of *Helicobacter pylori*. (1999). *FEBS Lett.* 460:2;221-225.
- Tómbola, F., Del Giudice, G., Papini, E., and m. Zoratti. Blockers of VacA provide insights into the structure of the pore. (2000). *Biophys J.* 79:2;863-873.
- Tómbola, F., Pagliaccia, C., Campello, S., Telford, J.L., Montecucco, C., Papini, E., and M. Zoratti. How the loop and middle regions influence the properties of *Helicobacter pylori* VacA channels. (2001). *Biophys J.* 81:6;3201-3215.
- Trucksis, M., Galen, J.E., Michalski, J., Fasano, A., and J.B. Kaper. Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a *V. cholerae* virulence cassette. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:11;5267-5271.
- Valeva, A., Walev, I., Weis, S., Boukhallouk, F., Wassenaar, T.M., Endres, K., Fahrenholz, F., Bhakdi, S., and A. Zitzer. A cellular metalloproteinase

- activates *Vibrio cholerae* pro-cytolysin. (2004). *J. Biol. Chem.* 279:24;25143-25148.
- Waldor, M.K. and J.J. Mekalanos. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. (1996). *Science.* 272:5270;1910-1914.
- Waldor, M.K., Rubin, E.J., Pearson, G.D., Kimsey, H., and J.J. Mekalanos. Regulation, replication and integration functions of the *Vibrio cholerae* CTX $\phi$  are encoded by region RS2. (1997). *Mol. Microbiol.* 24:5;917-926.
- Waldor, M.K., and D. RayChaudhuri. Treasure trove for cholera research. 2000. *Nature.* 406:5795;469-470.
- Wang, Z.Q., Stingl, L., Morrison, C., Jantsch, M., Los, M., Schulze-Osthoff, K., and E.F. Wagner. PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. (1997). *Genes Dev.* 11:18;2347-2358.
- Willhite, D.C., Cover, T.L., and S.R. Blanke. Cellular vacuolation and mitochondrial cytochrome c release are independent outcomes of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin activity that are each dependent on membrane channel formation. (2003). *J. Biol. Chem.* 278:48;48204-48208.
- Williams, S.G., Varcoe L.T., Attridge, S.R., and P.A. Manning. *Vibrio cholerae* Hcp, a secreted protein coregulated with HlyA. (1996). *Infect. Immun.* 64:1;283-289.
- Yamamoto, K., Al-Omani, M., Honda, T., Takeda, Y., and T. Miwatani. Non-O1 *Vibrio cholerae* hemolysin: purification, partial characterization, and immunological relatedness to El Tor hemolysin. (1984). *Infect. Immun.* 45:1;192-196.

- Yamamoto, K., Ichinose, Y., Nakasone, N., Taneba, M., Nagahama, M., Sakurai, J., and M. Iwanaga. Identity of hemolysins produced by *Vibrio cholerae* non-O1 and *V. cholerae* O1, biotype El Tor. (1986). *Infect. Immun.* 51:3;927-931.
- Yamamoto, K., Ichinose, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Nakata, A., Iwanaga, M., Honda, T., and T. Miwatani. Two step processing for activation of the cytolysin/hemolysin of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor: nucleotide sequence of the structural gene (hlyA) and characterization of the processed products. (1990). *Infect. Immun.* 58:12;4106-4116.
- Yu, S.W., Wang, H., Poitras, M.F., Coombs, C., Bowers, W.J., Federoff, H.J., Poirier, G.G., Dawson, T.M., and V.L. Dawson . Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. (2002). *Science.* 297:5579;259-263.
- Zhang, D., Takahashi, J., Seno, T., Tani, Y., and T. Honda. Analysis of receptor for *Vibrio cholerae* El Tor hemolysin with a monoclonal antibody that recognizes glycophorin B of human erythrocyte membrane. (1999). *Infect. Immun.* 67:10;5332-5337.
- Zitzer, A., Palmer, M., Weller, U., Wassenaar, T., Biermann, C., Tranum-Jensen, J., and S. Bhakdi. Mode of primary binding to target membranes and pore formation induced by *Vibrio cholerae* cytolysin (hemolysin). (1997). *Eur. J. Biochem.* 247:1;209-216.
- Zitzer, A., Wassenaar, T.M., Walev, I., and S. Bhakdi. Potent membrane-permeabilizing cytotoxic action of *Vibrio cholerae* cytolysin on human intestinal cells. (1997). *Infect. Immun.* 65:4;1293-1298.

Zitzer, A., Zitzer, O., Bhakdi, S., and M. Palmer. Oligomerization of *Vibrio cholerae* cytolysin yields a pentameric pore and has a dual specificity for cholesterol and sphingolipids in the target membrane. (1999). *J. Biol. Chem.* 274:3;1375-1380.

Zitzer, A., Bittman, R., Verbicky, C.A., Erukulla, R.K., Bhakdi, S., Weis, S., Valeva, A., and M. Palmer. Coupling of cholesterol and cono-shaped lipids in bilayers augments membrane permeabilization by the cholesterol-specific toxin streptolysin O and *Vibrio cholerae* cytolysin. (2001). *J. Biol. Chem.* 276:18;14628-14633.