



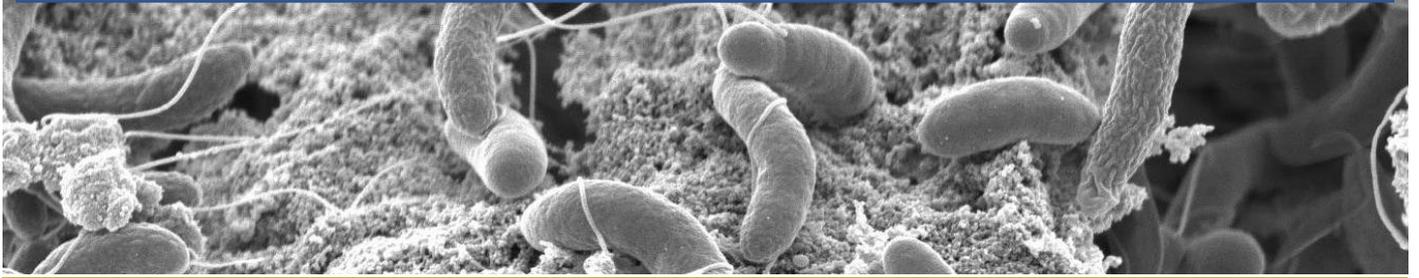
FACULTAD DE  
CIENCIAS

## Microbiología clínica

Grado en Bioquímica  
Departamento de Biología Molecular  
JMRR-UAM © 2019

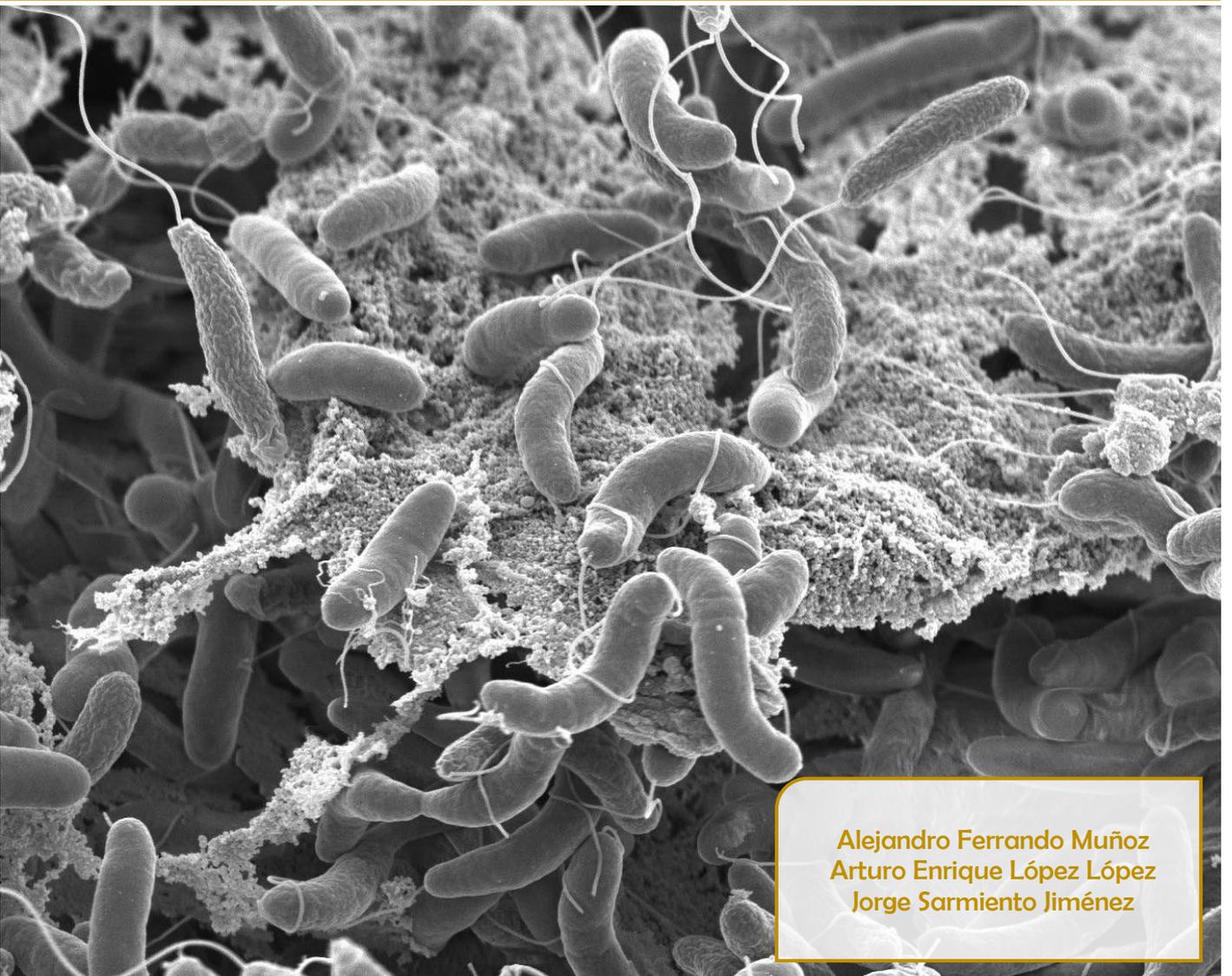
UAM

Universidad Autónoma  
de Madrid



## Tema 19

# Género *Vibrio*



Alejandro Ferrando Muñoz  
Arturo Enrique López López  
Jorge Sarmiento Jiménez

## **ÍNDICE DE CONTENIDOS**

<b>1.</b>	Introducción	2
<b>2.</b>	Ciclo biológico de <i>V. cholerae</i>	4
<b>3.</b>	Genes asociados con virulencia	8
<b>3.1.</b>	Evolución, adherencia y producción de toxinas	8
<b>3.1.1.</b>	El elemento genético CTX	10
<b>3.1.2.</b>	Evolución de virulencia en <i>V. cholerae</i>	14
<b>3.2.</b>	Proteínas de secreción	15
<b>3.2.1.</b>	Modificadores de colonización	15
<b>4.</b>	La toxina cólera	17
<b>4.1.</b>	Estructura y función	17
<b>4.2.</b>	Transporte de la toxina al interior celular	19
<b>4.3.</b>	CT como diana terapéutica	22
<b>5.</b>	Regulación de virulencia	22
<b>6.</b>	Aplicaciones inmunológicas de la toxina	25
<b>7.</b>	Referencias	26
<b>8.</b>	Direcciones de Internet	28

## 1. Introducción

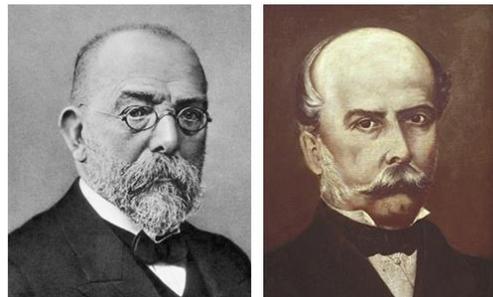
El cólera es una enfermedad que se conoce desde hace mucho tiempo y ha sido mencionada incluso en los escritos más antiguos. Normalmente se ha identificado con el subcontinente de la India, pero ha sido capaz de cruzar todo el globo. Desde el comienzo del siglo XX, se han dado siete pandemias que se expandieron en oleadas, que fueron facilitadas por la aumentada movilidad de las poblaciones humanas. La última pandemia se produjo en 1961.

Actualmente es endémica en el Sur de Asia y muchas partes de África y Latinoamérica (**Figura 1**), donde los brotes están particularmente asociados con la pobreza y pobre sanidad. Se producen alrededor de 5 millones de casos al año. La enfermedad es la causa de unas 120.000 muertes al año, de las que la mayoría son de niños. Además, recientemente, como ocurrió tras el terremoto de Haití en 2010, la bacteria se ha hecho endémica en regiones del mundo que se creían libres del cólera. Desde su detección en la isla, más de 700.000 personas han contraído el cólera y más de 8500 personas han muerto por su causa.



**Figura 1.** Mapa con los países en los que se han reportado casos de cólera entre los años 2010-2014. Adaptado de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

El agente etiológico, *Vibrio cholerae*, fue descubierto inicialmente por Pacini durante una epidemia de cólera en Florencia (Italia) en 1854, que lo nombró como el “bacilo-coma” por la forma de “coma” que tiene en las preparaciones de microscopia. Posteriormente, fue renombrado con su actual denominación por Koch en 1883, quien demostró la relación casual con la enfermedad (Figura 2).

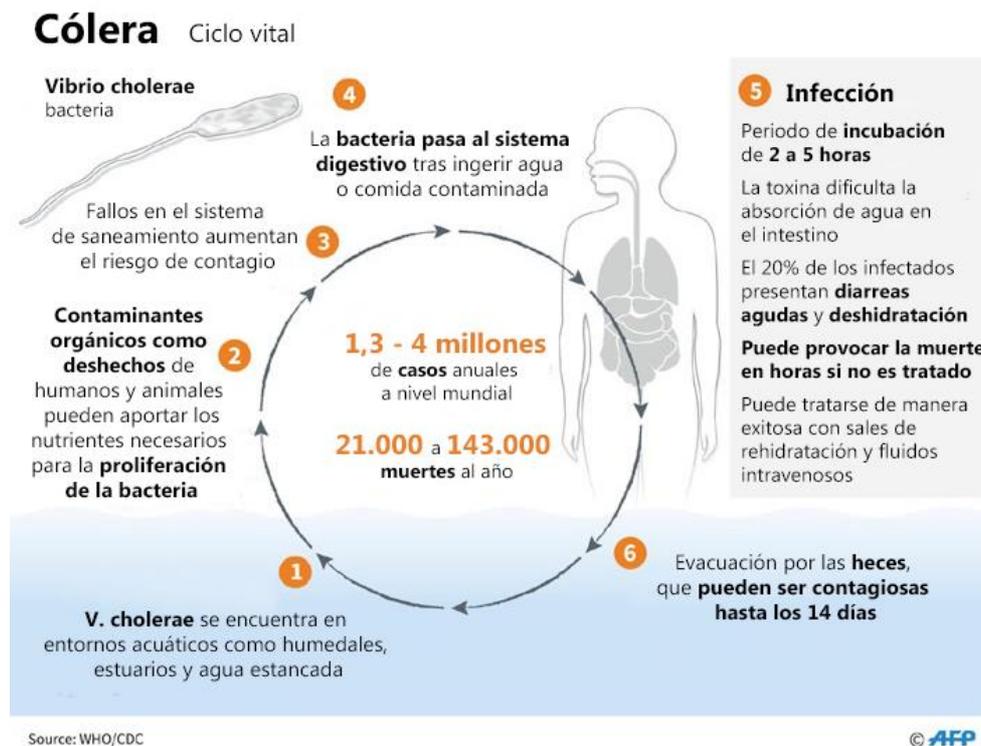


**Figura 2.** Fotografía de Robert Koch y retrato de Filippo Pacini, Instituto y Museo de Ciencia de Florencia.

El género *Vibrio* está constituido por bacilos gram-negativos rectos e incurvados, no esporulados, anaerobios facultativos.

La mayoría de los vibrios son habitantes naturales de estuarios y ambientes marinos. Muchos están asociados con animales vertebrados e invertebrados marinos, y en muchos casos la relación es de simbiosis. Sólo 11 de las más de 30 especies de *Vibrio* identificadas se asocian con casos de enfermedad en humanos, y de éstos sólo unos pocos serotipos de *V. cholerae* tienen la distinción de causar pandemias de cólera. Como veremos más adelante, esta capacidad requiere de la adquisición y expresión de factores de virulencia contenidos en dos fagos filamentosos. Mientras tanto, *V. cholerae* reside en océanos y estuarios, a veces asociado con la superficie e intestino de crustáceos.

El serotipo O1 de *V. cholerae* da lugar en el hombre a un cuadro diarreico, que puede ser mortal a causa de la deshidratación que ocasiona. El proceso está provocado no por la invasión bacteriana, sino por la enterotoxina producida, que altera la fisiología de las células intestinales sin dañarlas. La pérdida de líquidos es destacable, puede llegar a ser de 20 litros en un periodo de 24 h, lo que conduce a una fuerte deshidratación biológica. Sin tratamiento, más del 80% de las personas sintomáticas mueren. Sin embargo, con una adecuada rehidratación, la mortalidad puede disminuir hasta un 1% (Figura 3).

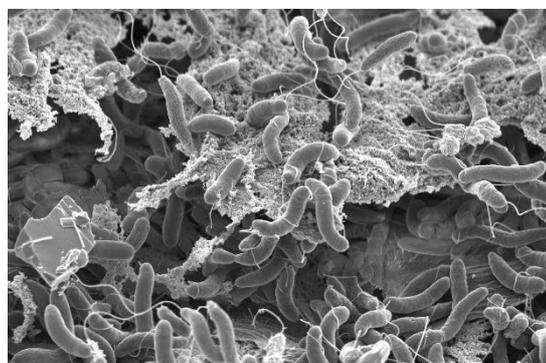


**Figura 3.** Ciclo vital de *V. cholerae* y su efecto en el hospedador humano. Adaptado a partir de la Agence France-Presse (AFP).

## 2. Ciclo biológico de *V. cholerae*

*V. cholerae* es un patógeno que vive en el agua, es propagado por ruta fecal-oral y parece haber desarrollado una serie compleja de caracteres que actúan en diferentes fases del ciclo de vida para asegurar su continuidad en el hábitat natural, la transmisión a y la multiplicación en el hospedador humano y la liberación en el medio acuático, donde puede persistir durante un largo periodo antes de reinfectar.

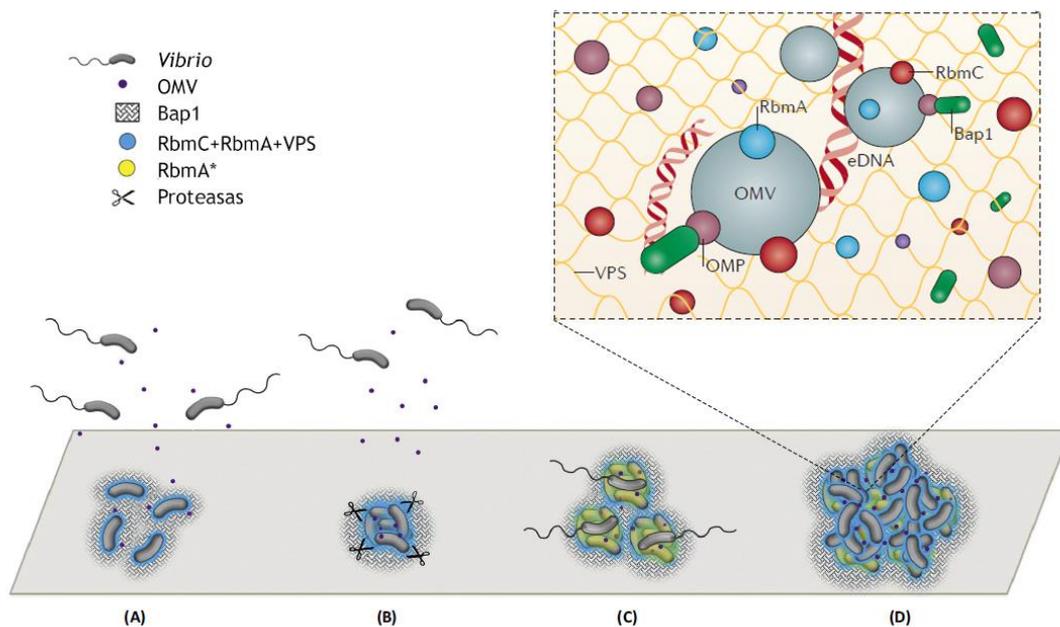
Existen muchos datos que indican que *V. cholerae* forma biofilms, tanto en las fases acuáticas como en las intestinales de su ciclo de vida, y que estas estructuras son importantes para la diseminación y la persistencia (Figura 4). Los biofilms son comunidades microbianas que están rodeadas por una matriz de polisacáridos que las bacterias producen, lo que les



**Figura 4.** Imagen microscópica realizada por G. Knott y M. Blokesch, EPFL.

permite sobrevivir a ambientes inhóspitos, como son un bajo pH o la presencia de sustancias antimicrobianas. También les permite defenderse de depredadores (protozoos) y de bacteriófagos. Con frecuencia, *V. cholerae* forma biofilms sobre los exoesqueletos del zooplancton, dado que estos contienen quitina y la bacteria es capaz de crecer utilizando esta molécula como única fuente de carbono.

Para que tenga lugar la formación del biofilm y su adhesión a las superficies, es necesaria la participación del pili de tipo VI MSHA (“mannose-sensitive haemagglutinin”). Tras la adhesión, donde tiene un papel clave la proteína Bap1, se produce una matriz extracelular compuesta de polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos, siendo elementos fundamentales el polisacárido de *Vibrio* (VPS); las proteínas de la matriz de biopelícula RbmA, RbmC; y ADN extracelular (eDNA). Para que el proceso ocurra de manera exitosa es fundamental la activación proteolítica de RbmA (**Figura 5**).



**Figura 5.** Papel de las proteínas de matriz extracelular en la formación del biofilm de *Vibrio cholerae*. Adaptado de Teschler et al. (2015) y Duperthuy et al. (2015). (A) Las bacterias planctónicas se adhieren a la superficie secretando Bap1 (marcas grises) y comienzan a producir la matriz del biofilm (azul). (B) Secreción de proteasas HAP, PrtV y VC0157 que pueden procesar y activar a RbmA (amarillo). Las vesículas de membrana externa (OMVs) (morado) tienen un papel clave en esta etapa. (C) Maduración de la biopelícula por reclutamiento de bacterias a RbmA\*. (D) Expansión del biofilm formado por las bacterias reclutadas.

La importancia de estas formaciones para la transmisión viene de la observación de que la filtración del agua de partículas mayores de 20  $\mu\text{m}$  reduce de forma significativa los casos de cólera.

Por otro lado, la bacteria también parece ser capaz de adoptar un estado quiescente, con un metabolismo reducido, que es una forma en la que la bacteria puede sobrevivir a condiciones ambientales difíciles.

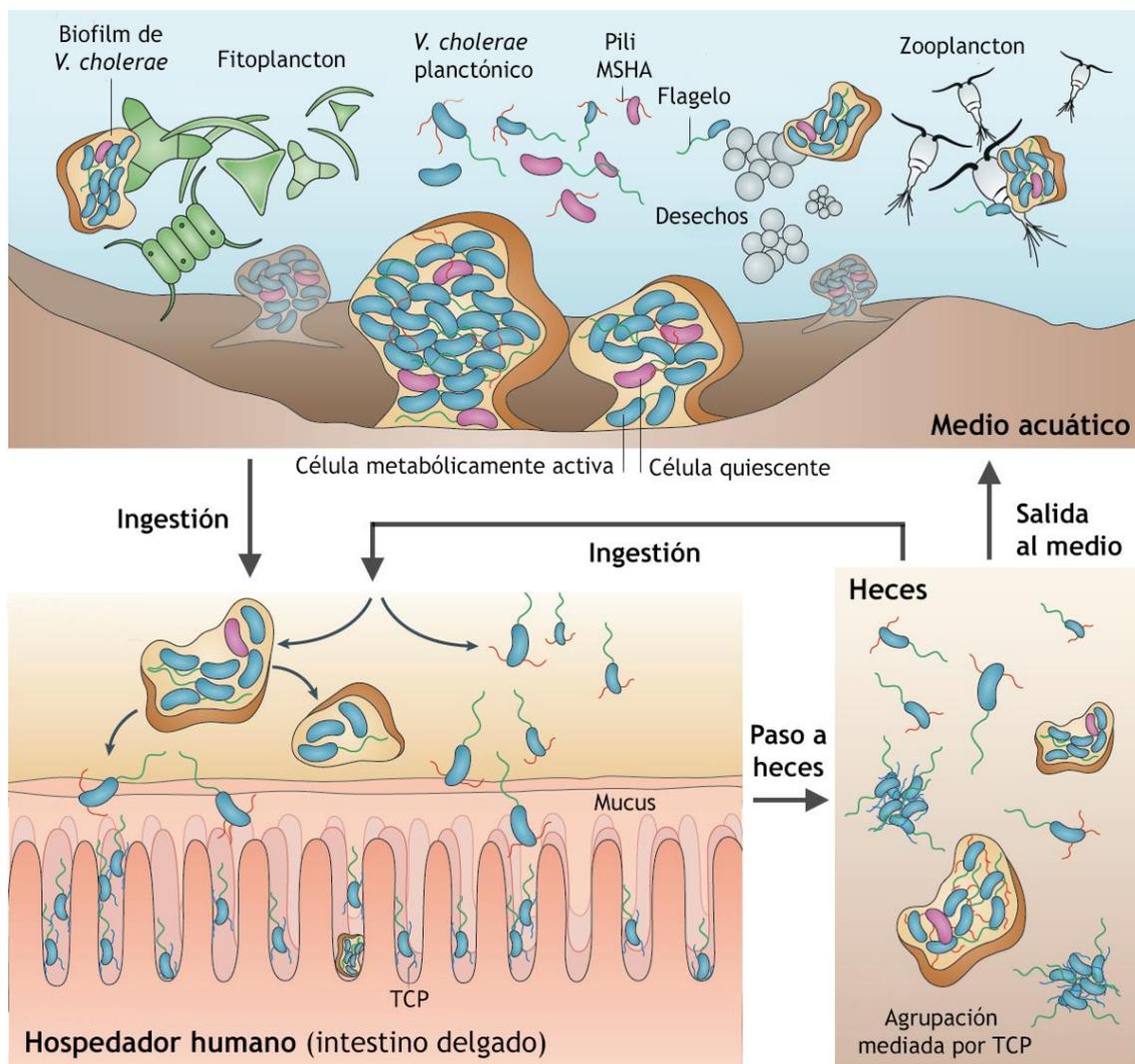
Las fases del ciclo de vida de *V. cholerae* se pueden resumir en las siguientes etapas **(Figura 6)**:

En la etapa 1, los organismos entran en el hospedador vía ingestión de agua o alimentos contaminados. *V. cholerae* debe atravesar el estómago hasta alcanzar el intestino delgado, donde se va establecer. Sin embargo, la bacteria es bastante sensible a pH ácidos, por lo que se piensa que la bacteria va a acceder al tubo digestivo formando parte de “biofilms”, lo que le permite sobrevivir al bajo pH del estómago humano.

A continuación, en la etapa 2, una vez que ha llegado al intestino delgado, la bacteria del cólera siente el ambiente del hospedador y modifica de acuerdo con ello su expresión génica. Así, en esos momentos se expresan proteínas como CadA, una lisina descarboxilasa que consume protones, protegiendo a *V. cholerae* del estrés ácido; o OmpU, que además de proteger a la bacteria de los ácidos biliares y de los péptidos antimicrobianos, desempeña un papel fundamental en la inflamación intestinal, induciendo la expresión de IL-8.

En la etapa 3, la bacteria va a producir factores que aumenten su capacidad de colonización. Lo primero que la bacteria debe solventar es el atravesar la capa de mucus (de unas 150  $\mu\text{m}$  de grosor) para interactuar con el epitelio intestinal. Para ello, va a producir una serie de mucinasas, cuya caracterización todavía no se ha realizado.

En la etapa 4, se va a producir la colonización del epitelio intestinal. *V. cholerae* produce varias adhesinas, entre las que se encuentran proteínas del flagelo, Mam7, GbpA, OmpU y FrhA. Tras la adhesión al epitelio intestinal, la bacteria pierde movilidad, comienza a proliferar e inicia la expresión de virulencia. *V. cholerae* forma microcolonias, agrupaciones que son mantenidas por las propiedades adherentes de la proteína TCP (ver más adelante) y por la proteína TcpF, cuya secreción es mediada por TCP.



**Figura 6.** Biofilms en el ciclo vital de *Vibrio cholerae*. Adaptado de Teschler et al. (2015)

En la etapa 5, la bacteria siente el cambio en el ambiente generado por los efectos de las toxinas y la multiplicación bacteriana. Entonces, los organismos sienten que es el momento apropiado para desprenderse y abandonar al hospedador.

Finalmente, en la etapa 6, una vez que la bacteria se encuentra fuera del hospedador, va a volver a modificar su expresión génica para facilitar la persistencia en el ambiente natural.

En la **Tabla 1** se recogen las principales características de cada una de las etapas.

<b>Etapas del ciclo vital de <i>V. cholerae</i></b>	
<b>Etapa 1</b>	Entrada de <i>V. cholerae</i> en el hospedador y llegada al intestino delgado.
<b>Etapa 2</b>	Modificación de la expresión génica en función del ambiente para adaptarse al medio.
<b>Etapa 3</b>	Producción de factores, como mucinasas, que aumentan la capacidad de colonización del microorganismo.
<b>Etapa 4</b>	Adhesión y colonización en el epitelio intestinal, donde <i>V. cholerae</i> pierde movilidad e inicia la expresión de factores de virulencia.
<b>Etapa 5</b>	La bacteria abandona el hospedador.
<b>Etapa 6</b>	<i>V. cholerae</i> modifica nuevamente su expresión génica para adaptarse al ambiente natural.

**Tabla 1.** Tabla resumen de las distintas etapas del ciclo vital de *Vibrio cholerae*.

### 3. Genes asociados con virulencia

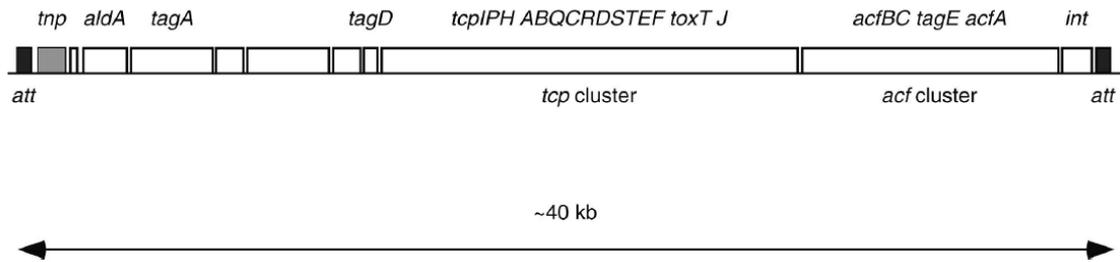
La patogénesis del cólera es un proceso complejo que implica a un número de factores que ayudan al patógeno para alcanzar y colonizar el epitelio del intestino delgado y producir la enterotoxina que altera el transporte de iones por las células epiteliales.

#### 3.1. Evolución, adherencia y producción de toxinas

La evolución molecular de *V. cholerae* es un ejemplo fascinante del papel que los elementos genéticos transponibles han desempeñado en la evolución de un patógeno.

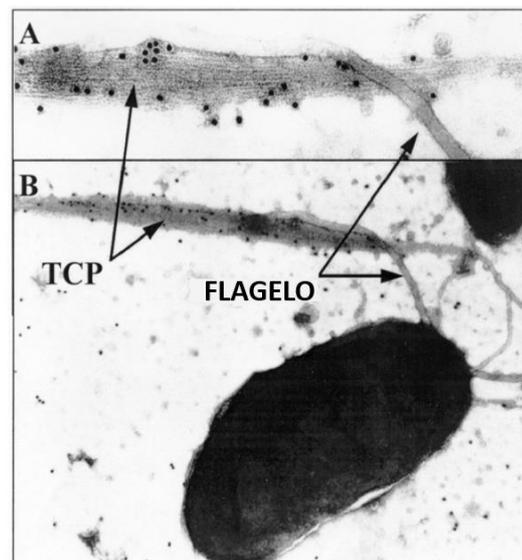
En *V. cholerae*, los principales genes de virulencia se encuentran agrupados, y existen al menos dos regiones del cromosoma en los que los genes responsables de la virulencia se encuentran agrupados. Estos incluyen el elemento CTX, que recientemente se ha

descubierto que corresponde al genoma de un bacteriófago filamentososo y la isla de patogenicidad TCP (**Figura 7**). Ambas regiones de DNA parecen ser el resultado de una transferencia horizontal de genes. De hecho, en la isla de patogenicidad TCP se encuentra el gen codificante para una integrasa (con homología a integrasas de fagos) y el “cluster” está flanqueado por sitios de anclaje específicos (semejantes a los sitios de anclaje *att* del fago lambda).

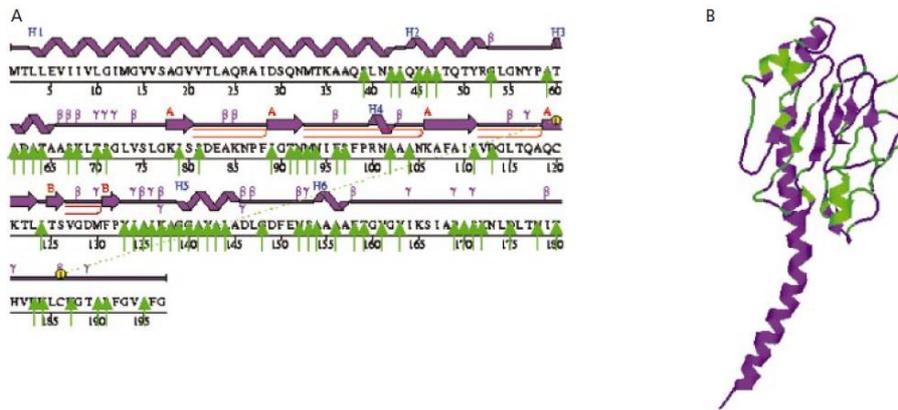


**Figura 7.** Organización genética de la isla de patogenicidad TCP de *V. cholerae*. Imagen de Faruque et al. (2003).

En este *locus* se encuentran los genes codificantes para proteínas implicadas en la formación del pilus o fimbria tipo IV, un factor absolutamente esencial para la colonización de humanos por *V. cholerae* (**Figura 8**). Cuando estas bacterias son crecidas en condiciones óptimas para la expresión del gen *tcpA* (pilina) se hacen altamente hidrofóbicas y tienden a autoaglutinarse en cultivo, lo que sugiere que una función del pilus sobre la superficie puede ser la de pegar a las bacterias en los sitios de colonización sobre la superficie de la mucosa intestinal. *TcpA* (pilina), la subunidad mayoritaria del pilus tipo IV, parece ser la proteína de la cubierta del fago TCPΦ (**Figura 9**).



**Figura 8.** Micrografía electrónica de transmisión de *V. cholerae* expresando TCP. Adaptada de Manning (1997). El panel A es una magnificación del panel B. El flagelo polar se indica con fines comparativos.



**Figura 9.** (A) Posición de aminoácidos conservados y polimórficos (flechas verdes) en la estructura secundaria de *TcpA*. (B) Plegamiento secundario predicho para *TcpA*. Imagen de Boyd y Waldor (2002).

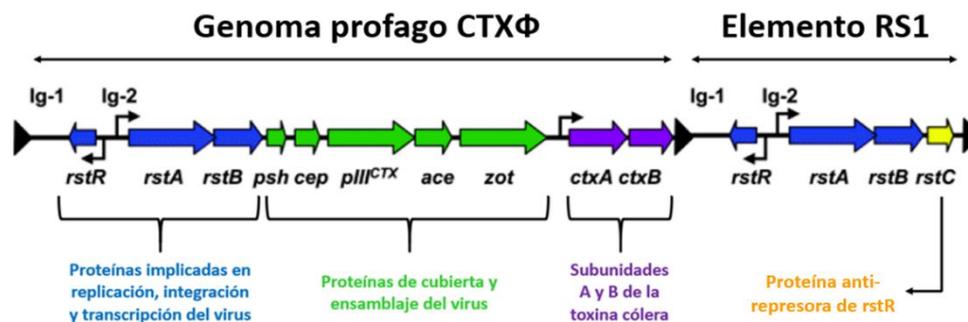
### 3.1.1. El elemento genético CTX

En 1996 se demostró que el elemento CTX es en realidad un bacteriófago filamentoso específico de *V. cholerae*, al que se le ha denominado CTX $\Phi$ . El genoma de este fago incluye los genes que codifican para la toxina cólera, que es la molécula responsable de la patogénesis asociada a la infección por este patógeno.

CTX $\Phi$  tiene un genoma de DNA de cadena sencilla de 6,9 kb (Figura 10), que es muy similar al de los genomas de colifagos filamentosos específicos de pilus-F (fagos Ff) tales como f1, fd y M13. Los genes codificantes para proteínas de la cubierta y las implicadas en el ensamblaje y secreción son muy similares a los existentes en los fagos Ff. En cambio, *rstA* codifica para una proteína importante para la replicación de CTX $\Phi$  que es diferente a la proteína de replicación de los fagos Ff. El genoma de CTX $\Phi$  también se distingue por la presencia del gen *ctxAB*, codificante de las cadenas A y B de la toxina cólera, y de los genes *rstB* y *rstR*. Estos dos últimos genes son importantes para la integración y lisogenia de CTX $\Phi$ , dos procesos que lo distinguen de los fagos Ff (éstos son mantenidos como plásmidos dentro de *Escherichia coli*).

Con frecuencia, las cepas toxigénicas de *V. cholerae* contienen múltiples profagos CTX insertados en el más largo de los dos cromosomas que tiene esta bacteria. Además, entre los profagos CTX se encuentra el elemento RS1 (Figura 10). Este elemento es

esencialmente igual a una parte del genoma de CTX $\Phi$  (contiene los genes para la replicación (*rstA*), integración (*rstB*) y regulación transcripcional (*rstR*). RS1 también incluye *rstC*, un gen no presente en CTX $\Phi$ , que codifica un anti-represor que facilita la expresión génica de CTX $\Phi$ . RS1 carece de los genes para las proteínas de la cubierta, ensamblaje y toxina cólera y no es capaz de una transmisión autónoma. RS1 utiliza las proteínas de la cubierta y ensamblaje de otros fagos filamentosos específicos de *V. cholerae*, tales como CTX $\Phi$ , VGJ $\Phi$  y KSF $\Phi$ .

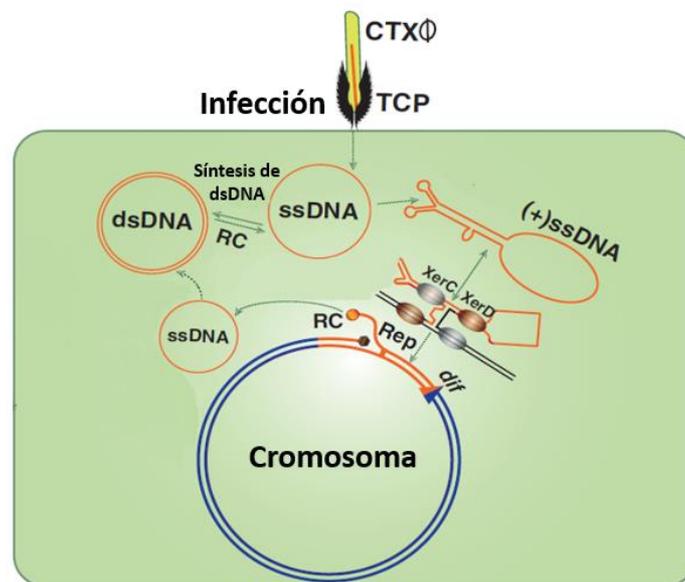


**Figura 10.** Disposición cromosómica del elemento RS1 y el profago CTX $\Phi$  en *V. cholerae*. Adaptada de McLeod et al. (2005).

En la **figura 11** se muestran las principales etapas del ciclo de vida de CTX $\Phi$  que son: i) infección; ii) integración del genoma del fago en el cromosoma I; iii) replicación del DNA del fago; iv) ensamblaje y secreción de los nuevos fagos. El ciclo de vida de este fago es un ejemplo de lo sofisticado que puede llegar a ser la relación entre un fago y su célula hospedadora.

El receptor para CTX $\Phi$  en la superficie celular de la bacteria es el pilus codificado en la isla de patogenicidad TCP. También se requieren para la infección las proteínas TolQRA de *V. cholerae*; en particular el componente TolA del complejo actúa como co-receptor para CTX $\Phi$ . Así, como ocurre con otros fagos Ff, la infección de CTX $\Phi$  también ocurriría en dos etapas: primero el fago interacciona con TCP, un receptor que se proyecta más allá de la pared celular, y desde allí sería transferido a la proteína periplasmática TolA. La unión a TolA induce el desensamblaje del DNA del fago y su entrada en el citoplasma. Una vez en el citoplasma, el genoma de cadena sencilla de CTX $\Phi$  es copiado por proteínas de la bacteria para generar DNA de cadena doble y circular (el plásmido pCTX).

En la mayoría de los casos, este plásmido se va a integrar de forma específica de sitio en el cromosoma (**Figura 11**). CTX $\Phi$  no codifica su propia integrasa, sino que recluta dos proteínas de la bacteria, XerC y XerD, que van a mediar su integración. En el proceso interviene la proteína RstB, codificada en el genoma del fago. XerC y XerD son tirosin recombinasas responsables de la resolución de los dímeros que se generan por recombinación homóloga entre las dos copias del cromosoma en el proceso de replicación (**Figura 11**). La integración de CTX $\Phi$  ocurre por recombinación entre las secuencias homólogas en el genoma del fago (*attP*) y del cromosoma I de *V. cholerae* (*attB*).



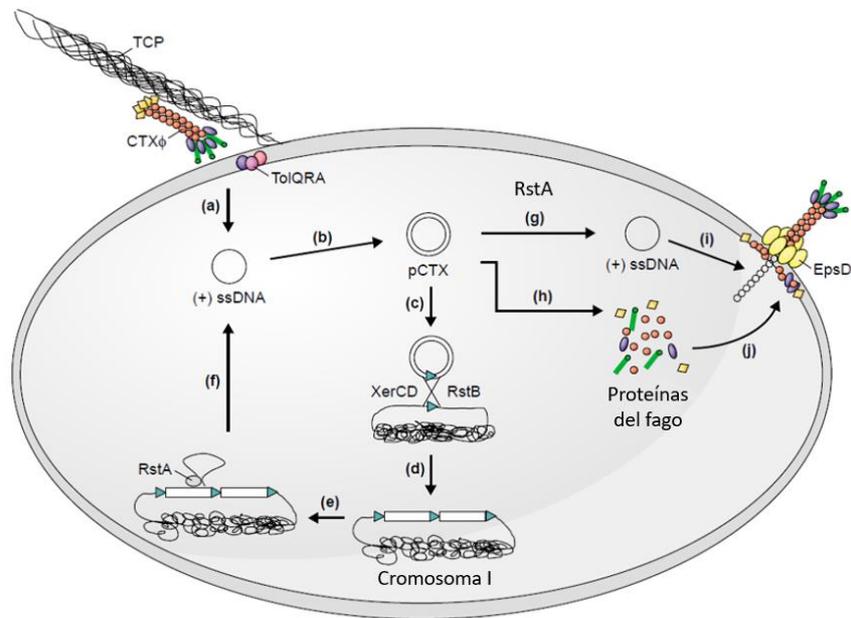
**Figura 11.** Ciclo de infección, integración y replicación del genoma del fago CTX $\Phi$ . Adaptada de Pant et al. (2016).

La mayoría de los fagos que se integran en los cromosomas de su bacteria hospedadora lo hacen de forma reversible, de tal forma que, tras la activación, el genoma se escinde desde el cromosoma. Sin embargo, la escisión del profago CTX $\Phi$  del cromosoma de *V. cholerae* parece no ocurrir nunca. A cambio, el profago integrado actúa como un molde para la síntesis de DNA viral, que va a producir DNA de cadena sencilla (ssDNA). La producción del ssDNA requiere de la participación de la RstA del fago y de la DNA polimerasa bacteriana. Este proceso inusual de replicación es ventajoso para el fago, pues permite la transmisión horizontal del DNA CTX $\Phi$  a través de partículas del fago, y la transmisión vertical del profago a las células hijas.

Una vez que el genoma de CTX $\Phi$  se integra en el cromosoma de *V. cholerae*, el fago entra en un estado lisogénico, en el que la expresión de los genes del fago se encuentra reprimida. De forma análoga a lo que ocurre con los fagos de la familia lambda, cuya lisogenia depende de la expresión del represor transcripcional ci, la lisogenia de CTX $\Phi$  depende del represor RstR. Este represor está codificado en el fago, pero no tiene homólogo en los fagos Ff. Como ocurre con los lisógenos  $\lambda$ , el tratamiento de los lisógenos CTX $\Phi$  con agentes que dañan el DNA y que inducen la respuesta SOS, tales como la luz UV y la mitomicina C, promueven la transcripción del profago y la producción del virión CTX $\Phi$ .

CTX $\Phi$ , al igual que otros fagos filamentosos, es secretado desde *V. cholerae* sin producir la lisis celular. La proteína Zot, codificada en CTX $\Phi$  y homóloga a la proteína pl de los fagos Ff, es la encargada del ensamblaje y secreción del fago. Sin embargo, a diferencia de los fagos Ff, CTX $\Phi$  no codifica para una secretina, un poro de la membrana externa que sirve de canal para la secreción de viriones fuera de la célula. En su lugar, CTX $\Phi$  es secretado a través del canal EpsD, codificado en el cromosoma de la bacteria. EpsD forma parte del sistema de secreción tipo II que también media la secreción de la toxina cólera, la proteasa hemaglutinina, la quitinasa y otras proteínas.

En resumen, el fago CTX $\Phi$  depende de factores bacterianos para mediar la integración, la transcripción y la secreción de las partículas virales, tal como queda reflejado en la **figura 12**, que proporciona una visión global del ciclo del fago en el interior de la bacteria. CTX $\Phi$  y *V. cholerae* han coevolucionado para permitir al fago utilizar funciones de la bacteria sin comprometer la biología de *V. cholerae*. Por otro lado, la presencia de CTX $\Phi$  es ventajosa para la bacteria. Los lisógenos CTX $\Phi$  pueden producir la toxina cólera, cuya actividad favorece la multiplicación y diseminación de la bacteria.



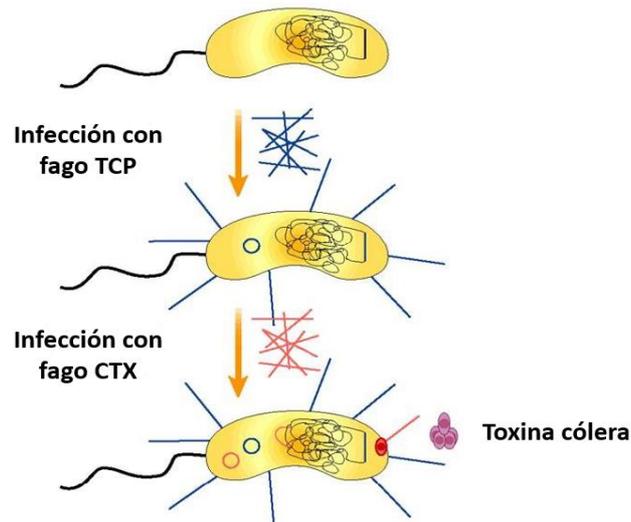
**Figura 12.** Representación global del ciclo de vida del fago CTXΦ en *V. cholerae*. Adaptada de Davis y Waldor (2003).

### 3.1.2. Evolución de virulencia en *V. cholerae*

La isla de patogenicidad TCP codifica para un pilus que, además de ser un factor importante de colonización, es el receptor para CTXΦ. Así, las cepas que pueden colonizar al hospedador humano son preferencialmente capaces de adquirir los genes que codifican para la toxina cólera.

Así, la emergencia, literalmente desde las profundidades de los océanos, de este patógeno potencialmente fatal dependió de la adquisición secuencial de dos elementos genéticos: un bacteriófago (TCPΦ) que codifica un factor de colonización que, a su vez, es el receptor de un segundo bacteriófago (CTXΦ), que codifica para una potente toxina (Figura 13).

Por tanto, la infección con TCPΦ fue la etapa crítica en la evolución de virulencia a partir de cepas no patogénicas de *V. cholerae*. Ambos bacteriófagos pueden integrarse en el genoma bacteriano y formar intermediarios de replicación episomal. La producción de la toxina cólera y la biogénesis de CTXΦ dependen de la secretina, codificada en el genoma bacteriano (Figura 13).



**Figura 13.** Adquisición de factores de virulencia por *V. cholerae*. Adaptada de Donnenberg (2000).

### 3.2. Proteínas de secreción

*V. cholerae* produce un gran número de proteínas de secreción, algunas de las cuales se han clasificado como toxinas. Otras son fundamentalmente enzimas hidrolíticas que pueden influir el proceso de colonización y que también tienen el potencial de proveer de una fuente de nutrientes básicos.

#### 3.2.1. Modificadores de colonización

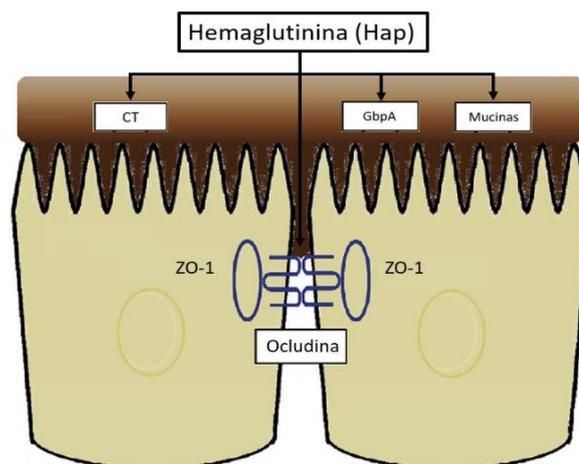
Entre las enzimas hidrolíticas que secreta *V. cholerae* se encuentran DNasas, proteasas, quitinasa y neuraminidasa.

Se han identificado dos DNasas que se implican en lo siguiente. La cubierta mucosa del epitelio intestinal es rica en DNA debido presumiblemente al alto recambio de las células epiteliales. Esto contribuye a la viscosidad y reduce la habilidad de las bacterias para penetrar este sistema de defensa natural. Sin embargo, la producción de DNasas puede proveer un medio no sólo de facilitar el pasaje, sino que haciendo esto, también provee de nutrientes adicionales en la forma de los productos de hidrólisis de DNA.

Se han descrito múltiples proteasas; una de ellas, la proteína soluble hemaglutinina (Hap) es una molécula particularmente interesante. Se ha mostrado que tiene actividad

mucinas, es capaz de romper la fibronectina, y se ha sugerido que está implicada en la activación proteolítica de la toxina cólera (Figura 14).

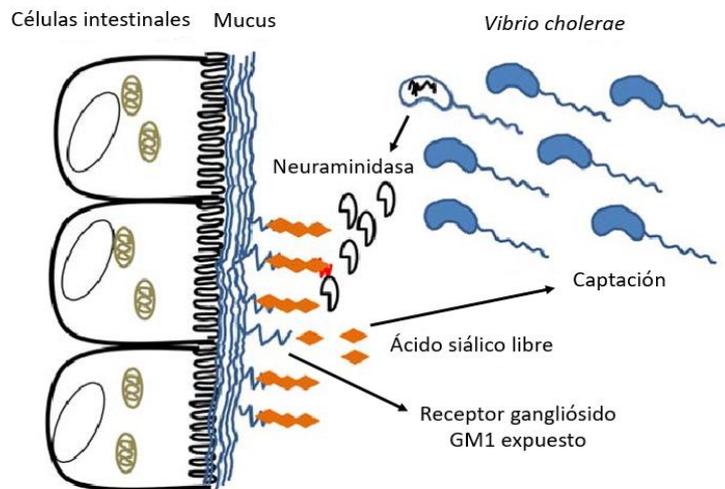
El pretratamiento de células epiteliales en cultivo con Hap previene la adherencia de la bacteria, y los mutantes *hap*, aunque no tienen afectada la virulencia, presentan una reducida "salida a la luz" (*shedding*). Así, además de facilitar la rotura del mucus, Hap también actúa como un separador, rompiendo receptores para un número de adhesinas (como por ejemplo la adhesina celular GbpA) y ayudando a liberar a la bacteria al ambiente. La hemaglutinina también está implicada en la separación de las uniones estrechas ("tight junctions") en el intestino delgado a través de la degradación de la proteína ocludina, favoreciendo la secreción de fluidos de forma paracelular (Figura 14).



**Figura 14.** *Dianas de la hemaglutinina en el intestino delgado durante la infección por V. cholerae. Adaptada de Benítez y Silva (2016).*

La potente neuraminidasa (NanH) parece tener un papel durante la mayor parte de la infección. La toxina cólera reconoce el gangliósido GM1 como su receptor; sin embargo, GM1 no es el glicolípido más abundante en la membrana. En cambio, otros polisialogangliósidos predominan. NanH convierte estas moléculas en GM1 retirando los ácidos siálicos adicionales, lo que resulta en un aumento de la densidad de receptores para la toxina cólera (Figura 15). Recientemente, se ha encontrado que el gen para esta neuraminidasa se encuentra situado en una isla de patogenicidad. Esta región, llamada VPI-2 ("*Vibrio cholerae* pathogenicity island") tiene una longitud de 57,3

kb, está insertada en el gen para tRNA<sup>Ser</sup>, está flanqueada por repeticiones directas y tiene el gen codificante para una integrasa de bacteriófago.



**Figura 15.** Actuación de la neuraminidasa NanH sobre los polisialogangliósidos del intestino. Adaptada de Haines-Menges et al. (2015).

La producción de quitinasa presumiblemente tiene relevancia en la fase de ambiente acuático. *V. cholerae* se encuentra normalmente en asociación con partículas quitinosas y la secreción de una quitinasa puede facilitar el anclaje y la adquisición de nutrientes.

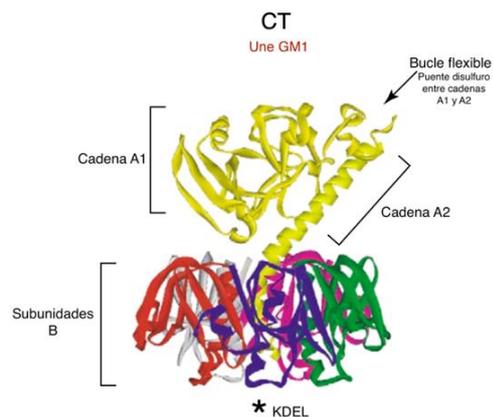
#### 4. La toxina cólera

La toxina cólera (CT) es el factor de virulencia responsable de las diarreas masivas que produce la infección con *V. cholerae*. Para causar la enfermedad, el cólera, la toxina debe atravesar la barrera epitelial intestinal, que es bastante impermeable a macromoléculas.

##### 4.1. Estructura y función

La toxina cólera (CT) es una de las toxinas bacterianas más estudiadas, genéticamente, estructuralmente y en su modo de acción. CT está compuesta de dos subunidades, A y B, codificadas por dos ORF separadas pero solapantes que se localizan dentro del operón *ctxA,B*. **Cinco subunidades B forman una estructura en anillo, en cuyo interior se encaja la subunidad A.**

En la toxina madura, la subunidad A se encuentra rota proteolíticamente en las cadenas A1 y A2, que se mantienen juntas por un puente disulfuro, presente en una región flexible en cuanto a conformación, e interacciones no covalentes. El extremo C-terminal de la cadena A2 se inserta en el anillo formado por las subunidades B y esto hace que el complejo permanezca unido. Además, el extremo C-terminal de la cadena A2 contiene la señal de retención en el retículo endoplásmico, que es el motivo KDEL (Figura 16).

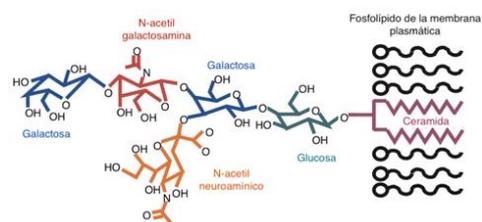


**Figura 16.** Estructura cristalina de la toxina cólera (CT). Adaptada de Lencer & Tsai (2003). Destacan las subunidades A1, A2 y B, así como el motivo KDEL y el puente disulfuro entre subunidades A.

**La cadena A1 es la que entra en el citosol y causa la enfermedad.** Una vez en el citosol del enterocito, esta proteína se dirige hacia la membrana basal, donde se localiza su blanco, la adenilato ciclasa. El fragmento A<sub>1</sub> ADP-ribosila el componente regulador Ns (Gs) de la adenilato ciclasa. La ribosilación de Ns hace que éste se mantenga en un estado de activación continuo, lo que conduce a la producción de grandes niveles intracelulares de cAMP, lo que a su vez activa a la protein-quinasa A, que fosforila y, por tanto, activa una serie de proteínas implicadas en la secreción de Cl<sup>-</sup>, bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y agua.

**La subunidad B es una lectina que une el dominio oligosacárido del gangliósido GM1, que es el receptor de membrana para la toxina.**

El gangliósido GM1 [Gal(β1-3)GalNAc(β1-4)(NeuAc(α2-3))Gal(β1-4)Glc(β1-1)ceramida], un gangliósido que se encuentra distribuido sobre la superficie celular de todas las células de mamíferos. La parte pentasacárida del GM1 se encuentra expuesta sobre la superficie celular a la que se ancla por la cola de ceramida (Figura 17).

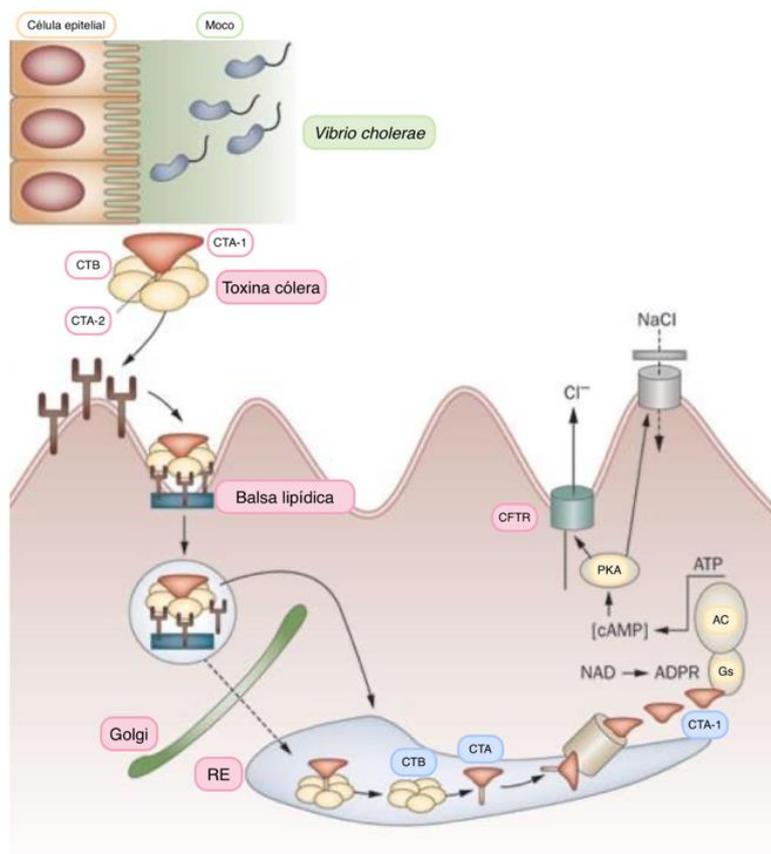


**Figura 17.** Gangliósido GM1 anclado a la cara externa de la membrana plasmática. Adaptada de Williams et al. (1999).

#### 4.2. Transporte de la toxina al interior celular

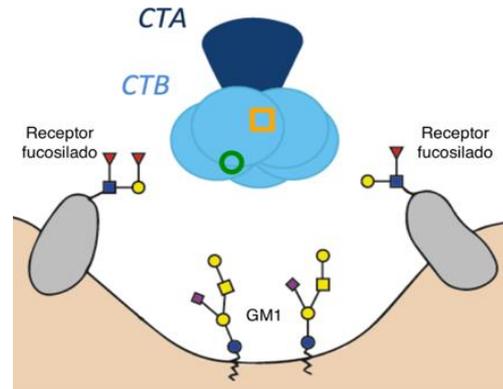
La primera indicación de que la CT podría ser transportada desde la membrana plasmática al retículo endoplasmático (RE) se obtuvo con el uso de la droga brefeldina A. Se encontró que esta droga inhibía completamente la acción de CT. El efecto conocido de la brefeldina A es el de bloquear el transporte a nivel del aparato de Golgi y el RE.

Así, se plantea que CT interacciona con la superficie celular a través de su unión al gangliósido GM1. La unión se realiza a través de la subunidad B, hecho que conduce a la asociación de CT con balsas lipídicas ("lipid rafts", microdominios de membrana ricos en colesterol y glicosfingolípidos) (Figura 18).



**Figura 18.** Internalización, recorrido y acción de la toxina cólera. Adaptada de Clemens et al. (2011)

Sin embargo, esta interacción entre el gangliósido GM1 y el sitio de unión primario en las subunidades B no es la única que se produce. CT posee, además, sitios de unión secundarios que unen receptores fucosilados, como algunos oligosacáridos de Lewis (**Figura 19**).

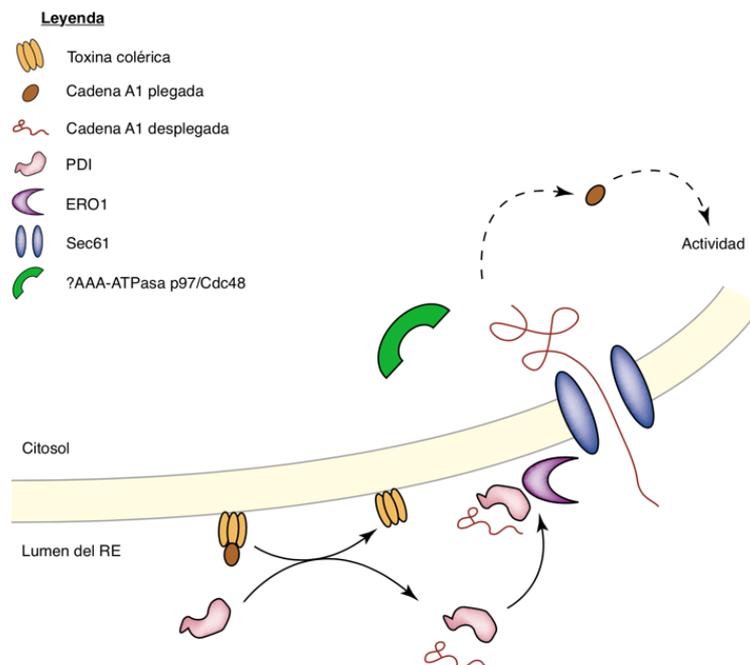


- Sitio de unión secundario (receptores fucosilados)
- Sitio de unión primario (GM1)

**Figura 19.** Dibujo esquemático de CT y sus receptores glicanos. Adaptada de Heim et al. (2019)

A continuación, se produce la internalización y la toxina se observa en endosomas que recircularizan desde el aparato de Golgi al RE. En este proceso interviene la proteína ERD2, proteína que une el motivo KDEL, que es una señal de retención en el RE.

**La CT llega al RE perfectamente ensamblada.** Allí, la subunidad A es reducida, y la cadena A1 es desensamblada del resto de la toxina, desplegada y transportada al citosol (**Figura 20**).



**Figura 20.** Retrotranslocación de la cadena A1 de la toxina colérica. Adaptada de Lencer & Tsai (2003).

En el RE, la toxina utiliza la maquinaria encargada de monitorizar y degradar las proteínas mal plegadas. Este sistema de control de calidad de proteínas, llamado **ERAD** (“*ER-associated degradation*”), se encarga de que las proteínas mal plegadas, presentes en la vía de secreción, sean reconocidas, desplegadas y translocadas al citoplasma para su degradación por el proteasoma. En la etapa final del proceso, las proteínas son poliubiquitinadas en el citosol para su direccionamiento hacia el proteasoma. Sin embargo, CT no sufre esta última etapa.

Las subunidades A y B de CT se encuentran plegadas de una forma estable: incluso después de la rotura y reducción de la subunidad A, la cadena A1 permanece fuertemente unida a la subunidad B. Para desensamblar la cadena A1 del resto de la toxina, se requiere la intervención de la isomerasa de puentes disulfuro (**PDI**, “*protein disulfide isomerase*”), localizada en el RE.

En la siguiente etapa, la proteína **Ero1** (una oxidasa asociada a la membrana del RE) oxida a la PDI, lo que conduce a la liberación de la cadena A1 en su estado desplegado.

El canal que media el paso de la toxina desde el RE al citoplasma no es conocido con exactitud, pero existen muchas evidencias que apoyan pudiera ser el mismo poro que transporta proteínas durante el proceso de biosíntesis, es decir, **Sec61**. Un factor como **p97 AAA-ATPasa** podría estar ayudando a la propulsión de la cadena A1 hacia el citosol.

Finalmente, una vez en el citoplasma, la cadena A1 de CT debe evitar la degradación por el **proteasoma**. La poliubiquitinación es el principal mecanismo que marca las proteínas para ser degradadas en el proteasoma, y la ubiquitinación ocurre en las lisinas. Curiosamente, **la cadena A de la toxina es extremadamente pobre en lisinas**. Así, se piensa que la escasez de lisinas en la cadena A1, junto con una habilidad para replegarse de una forma rápida, protegen a la toxina de la degradación en el citoplasma.

#### 4.3. CT como diana terapéutica

CT es una diana ideal para el desarrollo de drogas terapéuticas. Se ha descubierto que moléculas como virstatina inhiben la expresión del gen *toxT*, el cual codifica para un factor de transcripción que activa la expresión del gen que codifica para CT, quedando bloqueada la expresión de la CT desde uno de los primeros pasos necesarios para su producción.

Este tratamiento tiene una corta ventana temporal de oportunidad, ya que, si la bacteria se divide demasiado antes de llevar a cabo la inhibición de la expresión de *toxT*, se producirán grandes cantidades de CT que provocarán su efecto patogénico en el hospedador.

### 5. Regulación de virulencia

La regulación de los genes asociados a virulencia en *V. cholerae* está muy influenciada por las condiciones ambientales, bajo pH y baja sal, en las que el microorganismo se va a enfrentar y va a requerir de estas toxinas. La expresión coordinada de los genes de virulencia se obtiene a través de la actividad de un **sistema en cascada de factores reguladores**.

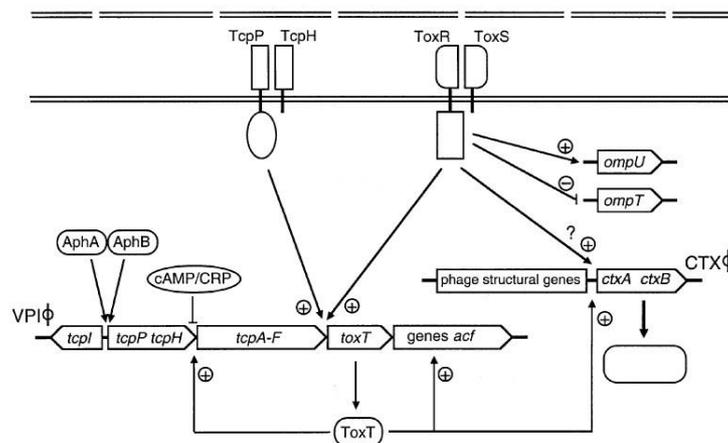
El activador transcripcional que directamente activa la expresión de los genes de virulencia es la proteína **ToxT (Figura 21)**. ToxT es miembro de la familia de activadores transcripcionales AraC/XylS. ToxT activa la transcripción tras unirse a unas secuencias de 13-pb de DNA, denominadas **Toxbox**. Una vez unida al DNA, ToxT activa la expresión de los genes *ctxAB* y *tcpA* (y otros), presumiblemente al interactuar también con la RNA polimerasa.

La expresión de ToxT, a su vez, está regulada por el “**regulón ToxR**”. ToxR posee tres dominios: un dominio citoplasmático responsable de la unión al DNA y la activación de la transcripción, un dominio transmembrana y un dominio periplásmico de función desconocida. Para su actividad, ToxR, requiere de la presencia de otra proteína, **ToxS**. Estas proteínas constan de un dominio situado en el periplasma, además del dominio

transmembrana. Aunque todavía no se ha demostrado, su función pudiera ser la de estabilizar a ToxR y promover su dimerización.

Para regular la expresión de ToxT, ToxR actúa en conjunción con un segundo activador transcripcional, **TcpP**, que, al igual que ToxR, se encuentra localizada en la membrana y tiene un dominio citoplasmático de unión a DNA y activación, y un dominio periplasmático. TcpP también requiere la presencia de una proteína efectora de unión a membrana, **TcpH**, que parece interactuar con TcpP a través del dominio periplasmático.

La transcripción del operón que codifica estos dos genes, TcpP y TcpH, es muy **dependiente de factores ambientales, tales como la temperatura y el pH**. Además, los niveles de TcpP están regulados por la interacción con TcpH. Así, en células que carecen de TcpH, TcpP resulta degradado rápidamente. TcpP también resulta degradada, aún en la presencia de TcpH, en condiciones no favorables para el desarrollo de virulencia como es un pH de 8,5.



**Figura 21.** Regulación de virulencia en *V. cholerae*.  
Adaptada de Cotter y DiRita (2000)

El operón *toxRS* parece estar activo de forma constitutiva, pero la **transcripción de *tcpPH* es regulada por dos activadores, AphA y AphB**, que están codificados por dos genes situados en distintas localizaciones del cromosoma bacteriano. **AphA sirve como el punto de conexión entre la expresión de los genes de virulencia asociado a la baja densidad de cultivo.**

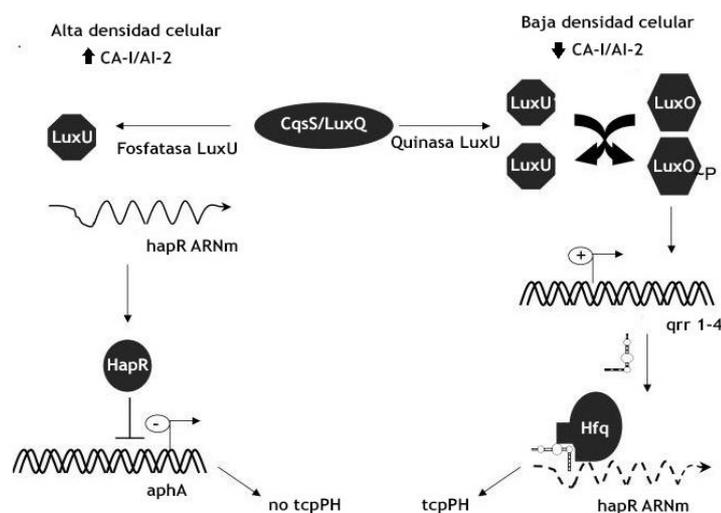
En las bacterias existen sistemas para detectar la densidad poblacional, que se denominan “**Quorum sensing**”. En *V. cholerae* existen varios de estos sistemas. No obstante, todos estos sistemas confluyen en un punto central que es **HapR**, quien a su vez va a regular la expresión de *aphA* (**Figura 22**).

Estos sistemas de “quorum sensing” cuentan con **moléculas inductoras, como es AI-2** (un diéster de furanosil-borato). **A baja densidad celular**, estas moléculas inductoras están en bajas concentraciones. En estas condiciones, LuxU es fosforilada por una quinasa, produciéndose a continuación una transferencia del grupo fosfato desde LuxU a LuxO. La forma LuxO-P activa la expresión de cuatro RNAs reguladores llamados Qrr1-4 (por “*quorum-regulatory RNA*”). Estos sRNAs, junto con la chaperona Hfq, se unen al mRNA *hapR* y lo desestabilizan. **El resultado es que, a baja densidad, no se produce la proteína HapR.**

Por lo contrario, a alta densidad, los autoinductores aumentan su concentración, los sensores CqsS/LuxQ actúan como una fosfatasa, lo que conduce a la desfosforilación de LuxO, quedando inactiva en su función de inducir la expresión de los genes *qrr*.

Esto da como resultado una expresión estable del mensajero *hapR* y su traducción en la proteína HapR (**Figura 22**). Esta

proteína actúa inhibiendo los factores de virulencia, dado que la proteína reprime la transcripción de *aphA*.



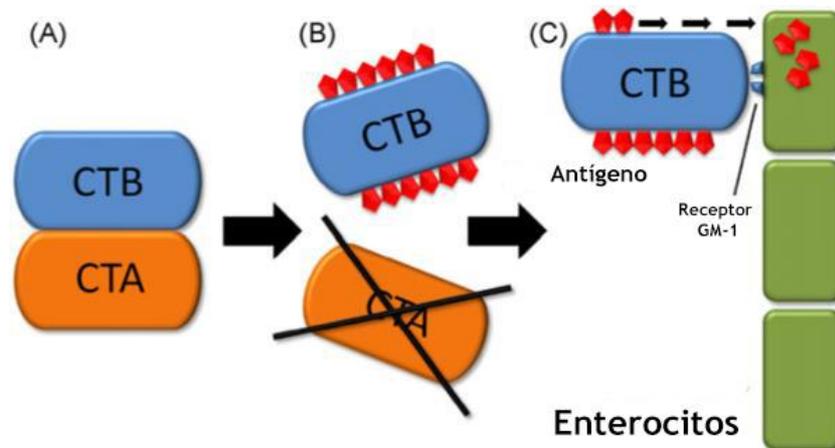
**Figura 22. Regulación de HapR mediante “quorum sensing”.** Adaptada de Matson et al. (2007). Siglas: CAI-1 (*Cholerae Autoinducer-1*), AI-2 (*Autoinducer-2*), CqsS (*Cholerae quorum-sensing Sensor*), *qrr* (*quorum-regulatory RNA*).

Por otro lado, HapR activa la expresión de *hapA*, un gen que codifica para la hemaglutinina/proteasa secretada por la bacteria, que es responsable del desprendimiento de la bacteria del epitelio intestinal.

## 6. Aplicaciones inmunológicas de la toxina

La observación de que CT **actúa como un adyuvante** de la respuesta de anticuerpos tras su administración por **vía intravenosa** fue descrita en 1972. Posteriormente, en 1984 se demostró que estos efectos adyuvantes también se observaban tras su administración por **vía oral**, lo que tiene una importancia destacable para el diseño de vacunas (**Figura 23**).

Sin embargo, **su toxicidad inherente y el desconocimiento de cuál es el mecanismo por el que desarrolla este efecto inmunoestimulador** han desaconsejado hasta este momento su uso en humanos. Aunque actualmente se está realizando una intensa investigación en esta dirección.



**Figura 23.** Producción de un adyuvante a partir de la toxina cólera. Adaptada de Brunner et al. (2010). Se descarta la subunidad CTA y se une el antígeno de interés a la subunidad CTB, la cual une al receptor GM1 y promueve el reconocimiento del antígeno por el sistema inmunitario.

## **7. REFERENCIAS**

- Almagro-Moreno, S., Pruss, K., & Taylor, R. K. (2015). Intestinal colonization dynamics of vibrio cholerae. *PLoS Pathogens*, 11(5), e1004787.
- Benitez, J. A., & Silva, A. J. (2016). Vibrio cholerae hemagglutinin(HA)/protease: An extracellular metalloprotease with multiple pathogenic activities. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 115, 55-62.
- Boyd, E. F., & Waldor, M. K. (2002). Evolutionary and functional analyses of variants of the toxin-coregulated pilus protein TcpA from toxigenic vibrio cholerae non-O1/non-O139 serogroup isolates. *Microbiology (Reading, England)*, 148(Pt 6), 1655-1666.
- Brunner, R., Jensen-Jarolim, E., & Pali-Scholl, I. (2010). The ABC of clinical and experimental adjuvants--a brief overview. *Immunology Letters*, 128(1), 29-35.
- Cegelski, L., Marshall, G. R., Eldridge, G. R., & Hultgren, S. J. (2008). The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nature Reviews. Microbiology*, 6(1), 17-27.
- Clemens, J., Shin, S., Sur, D., Nair, G. B., & Holmgren, J. (2011). New-generation vaccines against cholera. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 8(12), 701-710.
- Conner, J. G., Teschler, J. K., Jones, C. J., & Yildiz, F. H. (2016). Staying alive: Vibrio cholerae's cycle of environmental survival, transmission, and dissemination. *Microbiology Spectrum*, 4(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-2015.
- Cotter, P. A., & DiRita, V. J. (2000). Bacterial virulence gene regulation: An evolutionary perspective. *Annual Review of Microbiology*, 54, 519-565.
- Davis, B. M., & Waldor, M. K. (2003). Filamentous phages linked to virulence of vibrio cholerae. *Current Opinion in Microbiology*, 6(1), 35-42.
- Donnenberg, M. S. (2000). Pathogenic strategies of enteric bacteria. *Nature*, 406(6797), 768-774.
- Duperthuy, M., Uhlin, B. E., & Wai, S. N. (2015). Biofilm recruitment of vibrio cholerae by matrix proteolysis. *Trends in Microbiology*, 23(11), 667-668.
- Faruque, S. M., Albert, M. J., & Mekalanos, J. J. (1998). Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic vibrio cholerae. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 62(4), 1301-1314.

- Faruque, S. M., Zhu, J., Asadulghani, Kamruzzaman, M., & Mekalanos, J. J. (2003). Examination of diverse toxin-coregulated pilus-positive vibrio cholerae strains fails to demonstrate evidence for vibrio pathogenicity island phage. *Infection and Immunity*, 71(6), 2993-2999.
- Haines-Menges, B. L., Whitaker, W. B., Lubin, J. B., & Boyd, E. F. (2015). Host sialic acids: A delicacy for the pathogen with discerning taste. *Microbiology Spectrum*, 3(4), 10.1128/microbiolspec.MBP-2014.
- Heim, J. B., Hodnik, V., Heggelund, J. E., Anderluh, G., & Krenzel, U. (2019). Crystal structures of cholera toxin in complex with fucosylated receptors point to importance of secondary binding site. *Scientific Reports*, 9(1), 12243-2.
- Lencer, W. I., & Tsai, B. (2003). The intracellular voyage of cholera toxin: Going retro. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(12), 639-645.
- Lipp, E. K., Huq, A., & Colwell, R. R. (2002). Effects of global climate on infectious disease: The cholera model. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4), 757-770.
- Manning, P. A. (1994). Surface-associated and soluble components of vibrio cholerae involved in bacteria-host interactions. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 192, 265-281.
- Manning, P. A. (1997). The tcp gene cluster of vibrio cholerae. *Gene*, 192(1), 63-70.
- Matson, J. S., Withey, J. H., & DiRita, V. J. (2007). Regulatory networks controlling vibrio cholerae virulence gene expression. *Infection and Immunity*, 75(12), 5542-5549.
- McLeod, S. M., Kimsey, H. H., Davis, B. M., & Waldor, M. K. (2005). CTXphi and vibrio cholerae: Exploring a newly recognized type of phage-host cell relationship. *Molecular Microbiology*, 57(2), 347-356.
- Pant, A., Anbumani, D., Bag, S., Mehta, O., Kumar, P., Saxena, S., . . . Das, B. (2015). Effect of LexA on chromosomal integration of CTXvarphi in vibrio cholerae. *Journal of Bacteriology*, 198(2), 268-275.
- Schmidt, H., & Hensel, M. (2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 14-56.
- Teschler, J. K., Zamorano-Sanchez, D., Utada, A. S., Warner, C. J., Wong, G. C., Lington, R. G., & Yildiz, F. H. (2015). Living in the matrix: Assembly and control of vibrio cholerae biofilms. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(5), 255-268.

- Williams, N. A., Hirst, T. R., & Nashar, T. O. (1999). Immune modulation by the cholera-like enterotoxins: From adjuvant to therapeutic. *Immunology Today*, 20(2), 95-101.
- Yang, J. S., Jeon, J. H., Jang, M. S., Kang, S. S., Ahn, K. B., Song, M., . . . Han, S. H. (2018). *Vibrio cholerae* OmpU induces IL-8 expression in human intestinal epithelial cells. *Molecular Immunology*, 93, 47-54.

## **8. DIRECCIONES DE INTERNET**

- [https://www.who.int/health-topics/cholera#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cholera#tab=tab_1)