



FACULTAD DE
CIENCIAS

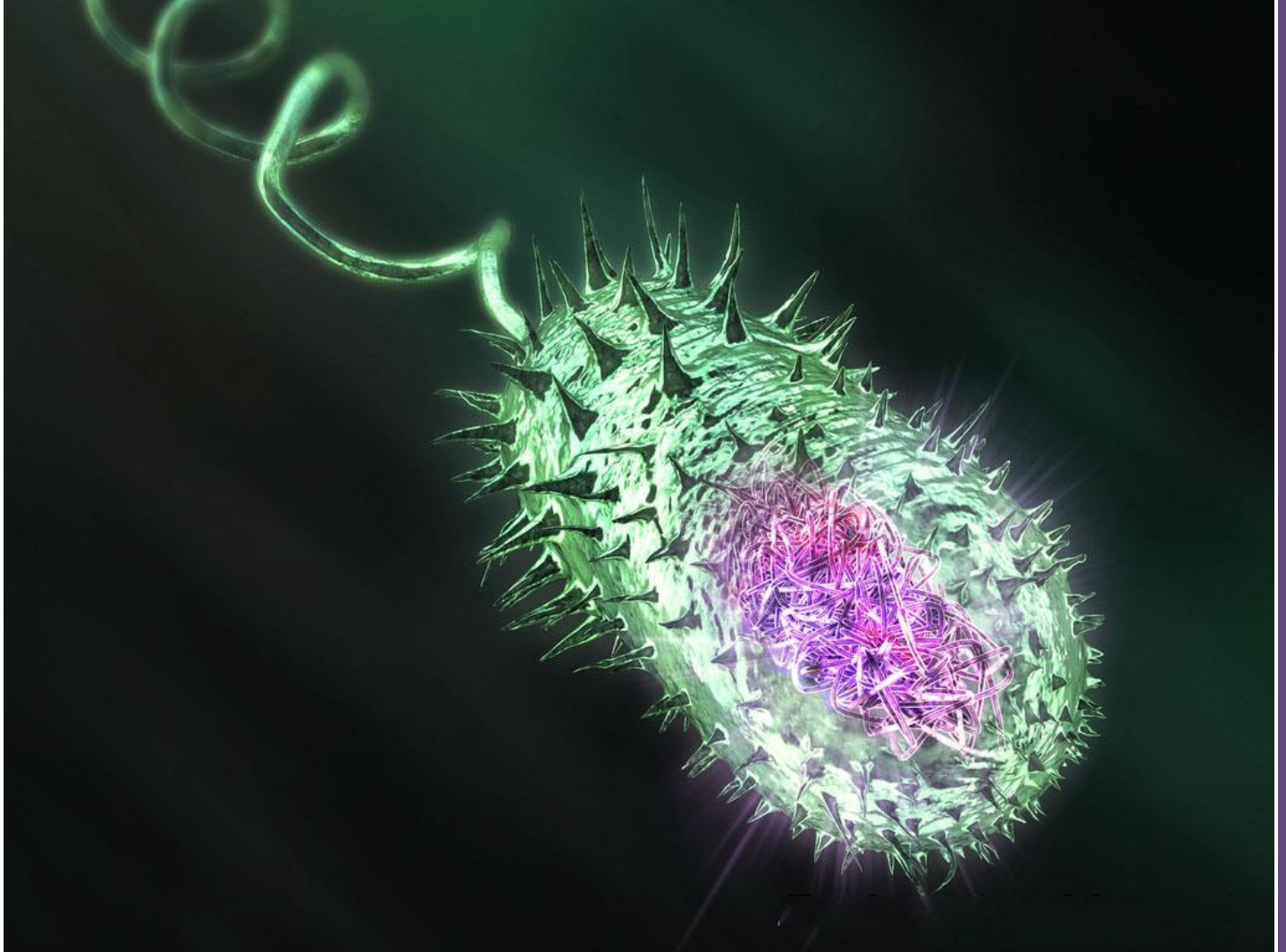
Microbiología clínica

Grado en Bioquímica

Departamento de Biología Molecular



U. A. M. © 2015



MICROBIOLOGÍA
CLÍNICA

TEMA 18:
GÉNERO VIBRIO

Antonio Queiro Palou
Diana Regidor López
Vanesa Nieto Calonge
Irene Gamero Redondo

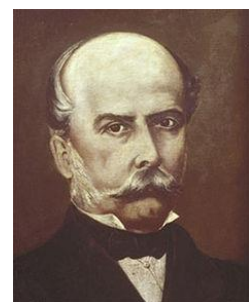
1. INTRODUCCIÓN

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.



Figura 1: Mapa con la distribución de los casos de cólera reportados entre 2010 y 2013. Adaptado de http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Cholera_outbreaks.png

Actualmente es endémica en el Sur de Asia y muchas partes de África y Latinoamérica, 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 2: Pacini
Fuente: Wikipedia.*

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 microscopía. Posteriormente, fue renombrado con su actual denominación por Koch en 1883, quien demostró la relación casual con la enfermedad.

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%.

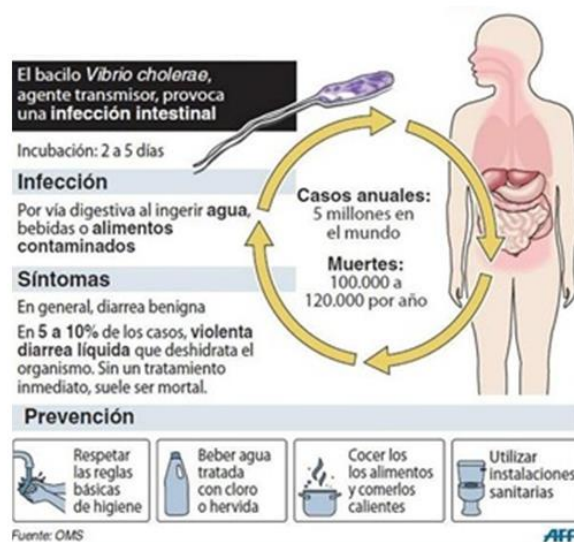


Figura 3: V. cholerae como agente transmisor de cólera. Adaptado de http://medicinacubana.blogspot.com.es/2013_01_01_archive.html

Con el objetivo de reducir el número de casos de cólera, se han desarrollado una serie de **medidas preventivas**. Entre estas medidas preventivas destacan: el cuidado de la higiene personal, vacunación y asegurarse de que el agua y los alimentos que se consumen estén libres de contaminación bacteriana (coccción de alimentos, adecuado tratamiento del agua, etc.).

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 y la multiplicación en el hospedador humano y la liberación en el medio acuático donde puede persistir durante un largo periodo antes de reinfectar.

Aunque los vibrios pueden ser aislados normalmente de ríos y distribuciones de agua en áreas endémicas, los números que se detectan tras crecimiento en medio de cultivo son frecuentemente una subestimación del nivel de contaminación dada su habilidad para entrar en un estado viable pero no cultivable. Esta forma recuerda un **estado de animación suspendida**. Este estado se dedujo al observar que no existía coincidencia entre el conteo directo de bacterias viables y el número de bacterias determinado por tinción con anticuerpos fluorescentes. La bacteria no puede ser reactivada por simple adición de medio de cultivo de laboratorio, sino que **requiere señales ambientales in vivo para empezar a replicarse**. Presumiblemente esto refleja la serie compleja de estímulos que están asociados con la activación de la expresión de los genes contenidos dentro de los varios regulones de virulencia (como veremos más adelante), al igual que aquellos requeridos para la síntesis celular básica.

En el medio acuático, *Vibrio cholerae* se suele encontrar en su forma más móvil: la forma planctónica (células individuales). Sin embargo, también se puede encontrar en forma de biofilmes en fitoplancton, zooplancton, desechos y diferentes superficies.

Un **biofilm** es una comunidad de microorganismos que, embebida en una matriz extracelular producida por los propios microorganismos, crece adherida a una superficie. En el caso de *Vibrio cholerae*, la adhesión entre el biofilm y la superficie se lleva a cabo por el pili de tipo VI MSHA (mannose-sensitive haemagglutinin) y uno de los principales componentes de la matriz extracelular del biofilm es VPS (*Vibrio polysaccharide*).

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

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 **“biofilmes”**, lo que le permite sobrevivir al bajo pH del estómago humano (Figura 5). Los biofilmes son comunidades microbianas que están rodeadas por una matriz de polisacáridos que las bacterias producen, lo

que les permite sobrevivir a ambientes inhóspitos como son un bajo pH o la presencia de sustancias antimicrobianas.

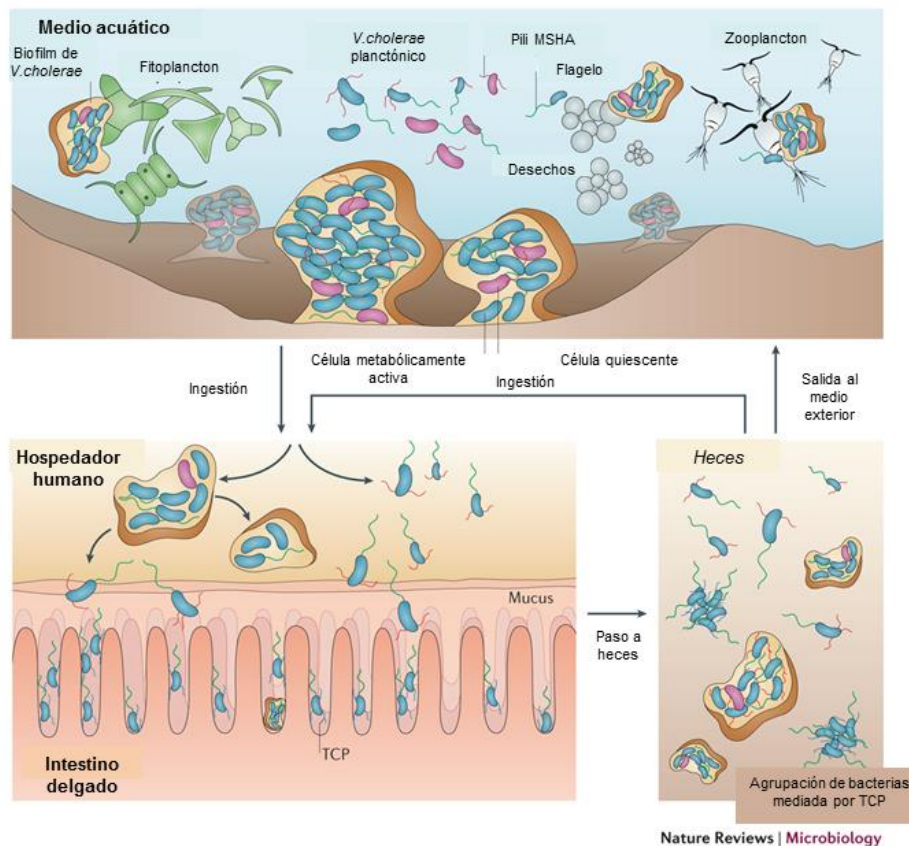


Figura 4: Biofilmes en el ciclo vital de *Vibrio cholerae*. En el medio acuático, *Vibrio cholerae* se encuentra en su forma más móvil: la forma planctónica (células individuales). También se encuentra formando parte de biofilmes en zooplancton, fitoplancton, desechos y otras superficies. La formación de estos biofilmes comienza después de producirse la adhesión de las bacterias a la superficie (mediada por el pili MSHA), cuando estas producen matriz extracelular rica en VPS. *V. cholerae* puede ser ingerida por el humano a través de diversas fuentes presentes en el medioambiente (agua, etc.). Una vez producida la ingestión, durante la colonización intestinal, las bacterias pueden encontrarse en su forma planctónica o de biofilm y producen TCP (toxin coregulated pili). Tanto la forma planctónica de las bacterias como los biofilmes se encuentran en las heces de los infectados. A través de las heces, las bacterias podrán infectar a un nuevo hospedador o volver al medio acuático. Adaptado de Teschler et al. (2015).

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 expresa la proteína OmpU, que protege a la bacteria de los ácidos biliares y de los péptidos antimicrobianos.

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 μm de grosor) para interactuar con el epitelio intestinal. Para ello va a producir una serie de **mucinasas**, cuya caracterización todavía no se ha realizado.

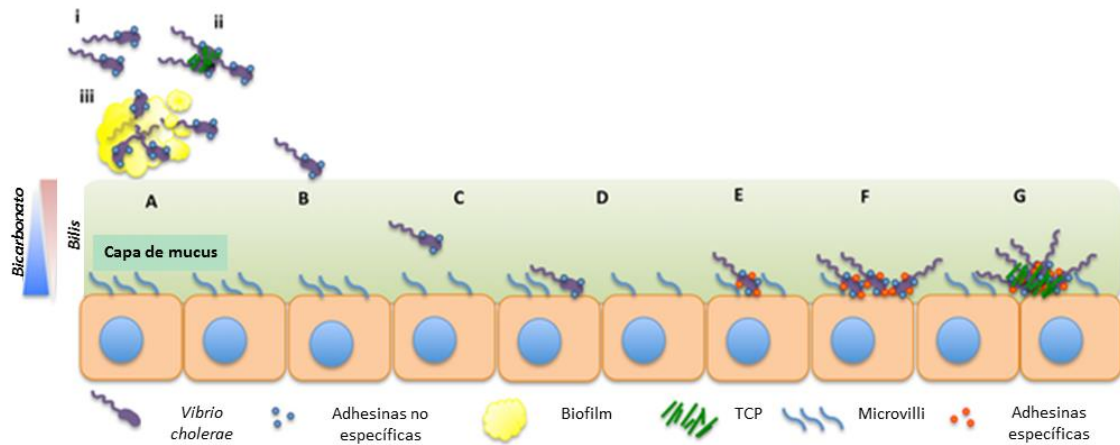


Figura 5: Modelo de la dinámica de colonización intestinal de *V.cholerae*. *V.cholerae* puede ser incorporado al organismo en forma de células individuales (i), en forma de colonias (ii) o como parte de un biofilm (iii) (A). Estas bacterias, a continuación, entrarán en contacto con la capa de mucus del intestino (B). La bacteria debe atravesar esta capa de mucus para entrar en contacto con el epitelio intestinal (C). Una vez que la bacteria alcanza el epitelio intestinal, se cree que se adhiere a él de forma reversible por medio de adhesinas como Gbp4 o Mam7 (D). A continuación, se producen adhesinas específicas que permiten que *V.cholerae* se una al endotelio (E) y las bacterias se multipliquen (F). Una vez que se alcanza cierta concentración de bacterias, se produce TCP (toxin-coregulated pilus) y ello permite que se formen microcolonias y que se produzcan toxinas (G). Por otra parte, los ácidos biliares inhiben la expresión de los factores de virulencia, mientras que el bicarbonato tiene el efecto contrario. Esto sugiere que van a ser factores ambientales los que van a determinar la expresión de los factores de virulencia solo cuando la bacteria ha alcanzado el intestino. Adaptado de Almagro-Moreno et al. (2015).

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.

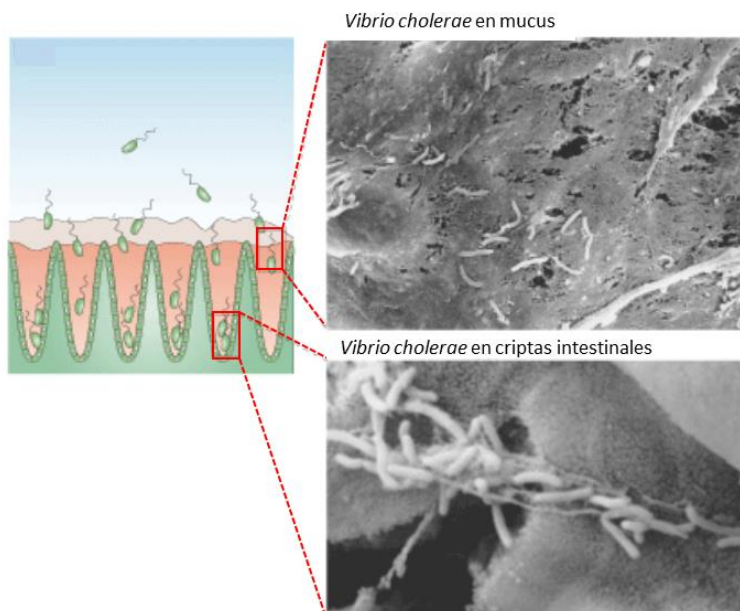


Figura 6: Micrografía electrónica de infección intestinal por *V. cholerae*. Adaptado de Butler et al (2005).

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 tiempo 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.**

Etapa	Sucesos
Etapa 1	Entrada del microorganismo en el hospedador y alcance del intestino.
Etapa 2	La bacteria modifica su expresión génica de acuerdo al ambiente del hospedador.
Etapa 3	Producción de factores (ej: mucinasas) que aumenten la capacidad de colonización de la bacteria.
Etapa 4	Colonización del epitelio intestinal, proliferación de la bacteria y expresión de factores de virulencia.
Etapa 5	La bacteria abandona el hospedador.
Etapa 6	La bacteria modifica su expresión génica para sobrevivir en el ambiente natural.

Tabla 1: Resumen de las diferentes etapas del ciclo de vida de V. 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** (Fig. 7), que recientemente se ha descubierto que corresponde al genoma de un bacteriófago filamentoso y la **isla de patogenicidad TCP**. 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).

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*. 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 TCP Φ .

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 Φ . 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 Φ tiene un genoma de DNA de cadena sencilla de 6,9 kb (Fig. 7), 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 Φ que es diferente a la proteína de replicación de los fagos Ff. El genoma de CTX Φ 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 Φ** , dos procesos que lo distinguen de los fagos Ff (éstos son mantenidos como plásmidos dentro de *Escherichia coli*).



Figura 7. Disposición cromosómica de RS1 y profago CTX en *V. cholerae*. Los genes que son casi idénticos en CTX y RS1 están coloreados de azul y están involucrados en la regulación de la transcripción (*rstR*), replicación (*rstA*) e integración (*rstB*). *rstC* está coloreado de amarillo y codifica un anti-represor de RstR. Los genes en morado (*ctxAB*) codifican las subunidades A y B de la toxina del cólera. Origen de la figura: McLeod et al. (2005).

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**. Este elemento es esencialmente igual a una parte del genoma de CTX Φ (**contiene los genes para la replicación (*rstA*), integración (*rstB*) y regulación transcripcional (*rstR*)**). RS1 también incluye *rstC*, un gen no presente en CTX Φ , que codifica un antirrepresor que facilita la expresión génica de CTX Φ . 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 CTXΦ, VGJΦ y KSFΦ.

En la figura 6 se muestran las **principales etapas del ciclo de vida de CTXΦ** 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 sofisticada que puede llegar a ser la relación entre un fago y su célula hospedadora.

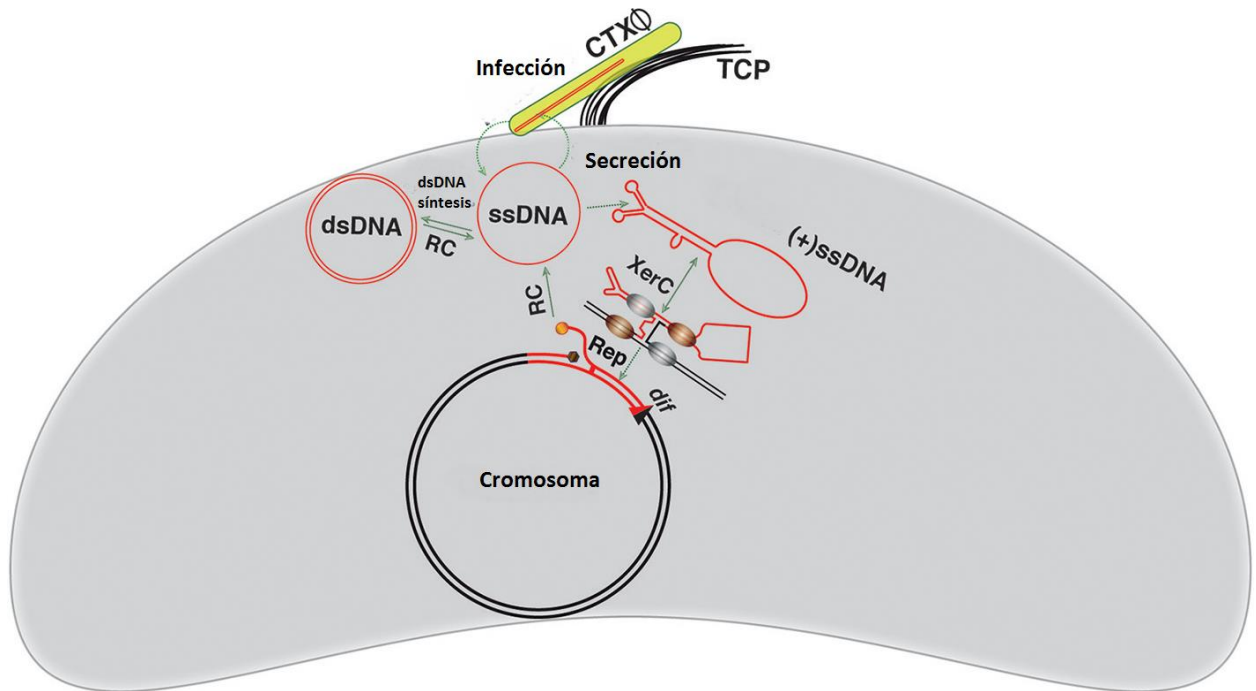


Figura 8. El virión CTX reconoce el receptor TCP de la superficie celular de *V.cholerae* y libera su genoma ssDNA en el citoplasma de *V.cholerae*. Este genoma ssDNA de CTX es convertido a dsDNA o es directamente integrado en el sitio dif cromosomal (Sitio de recombinación cromosomal bacteriano) usando las recombinasas XerC-XerD del hospedador. La replicación del DNA por parte del huésped, posiblemente resuelve los entrecruzamientos de Holiday. Adaptado de Das (2014).

El receptor para CTXΦ 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 CTXΦ. Así, como ocurre con otros fagos Ff, la infección de CTXΦ también ocurriría en dos etapas: primero el fago interactúa 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 Φ 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 (Fig. 9). **CTX Φ 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. La integración de CTX Φ ocurre por recombinación entre las secuencias homólogas en el genoma del fago (*attP*) y del cromosoma I de *V. cholerae* (*attB*).

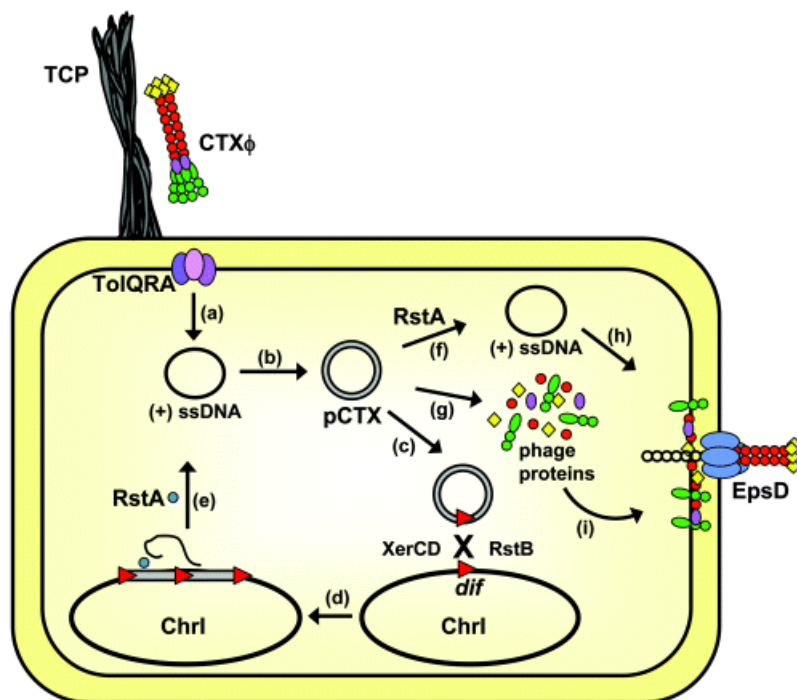


Figura 9. Representación esquemática del ciclo de vida de CTX en *V.cholerae*. Adaptada de McLeod et al. (2005).

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 Φ 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 Φ , a través de partículas del fago, y la transmisión vertical del profago a las células hijas.

Una vez que el genoma de CTX Φ 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 CTXΦ depende **del represor RstR**. Este represor está codificado en el fago, pero no tiene homólogo en los fagos Ff. Como ocurre con los lisógenos λ, el tratamiento de los lisógenos CTXΦ 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 CTXΦ.

CTXΦ, al igual que otros fagos filamentosos, es secretado desde *V. cholerae* sin producir la lisis celular. La **proteína Zot**, codificada en CTXΦ y homóloga a la proteína pI de los fagos Ff, es la encargada del **ensamblaje y secreción del fago**. Sin embargo, a diferencia de los fagos Ff, CTXΦ 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, **CTXΦ 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 CTXΦ depende de factores bacterianos para mediar la integración, la transcripción y la secreción de las partículas virales. CTXΦ 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 CTXΦ es ventajosa para la bacteria. Los lisógenos CTXΦ pueden producir la toxina cólera, cuya actividad favorece la multiplicación y diseminación de la bacteria.

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 (Fig. 10).

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 (Fig. 10).

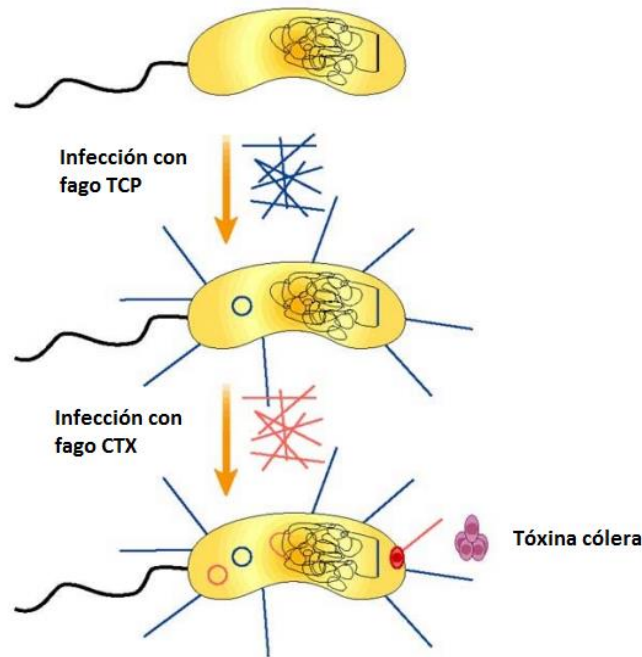


Figura 10. Adquisición de factores de virulencia por *V. cholerae*. La infección con TCP ϕ (azul) fue un paso fundamental en la evolución de la virulencia de las cepas no patógenas de *V. cholerae*. Este bacteriófago tipo IV no solo sirve como un factor de colonización, sino también como un receptor para la toxina del cólera codificado por CTX ϕ (rosa). Ambos bacteriófagos pueden integrarse en el genoma bacteriano y formar intermediarios de replicación episomal (círculos). La producción de la toxina del cólera y la biogénesis de CTX ϕ dependen de una secretina (rojo) codificada en el genoma bacteriano. Modificado 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 mucinasa, es capaz de romper la fibronectina, y se ha sugerido que está implicada en la activación proteolítica de la toxina cólera.

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 luz" ("shedding"). Así, además de facilitar la rotura del mucus, Hap también actúa como un separador, rompiendo receptores para un número de adhesinas y ayudando a liberar a la bacteria al ambiente.

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. 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^{Ser}, está flanqueada por repeticiones directas y tiene el gen codificante para una integrasa de bacteriófago.

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 (Fig. 11).

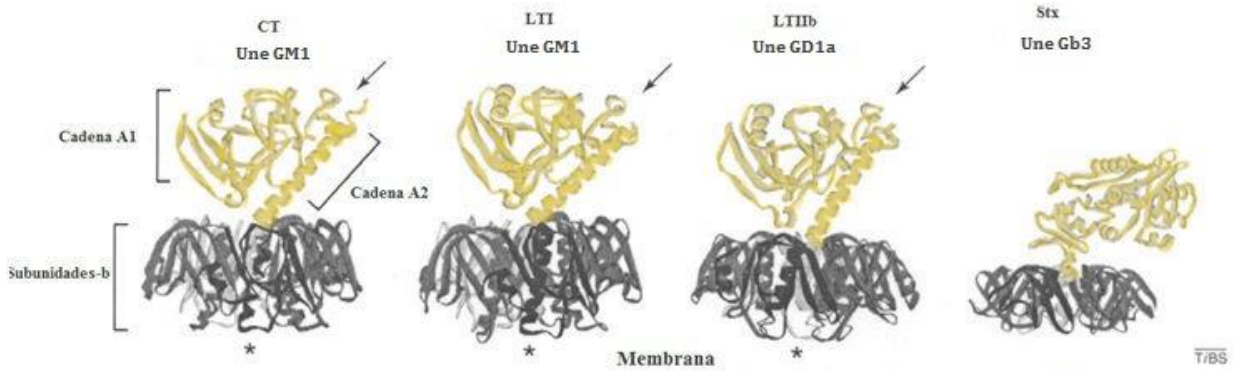


Figura 11. Estructura cristalina de las toxinas AB₅. Se muestran (desde la izquierda) la toxina del cólera (CT), toxinas termolábiles de *Escherichia coli* Tipo I y Tipo IIb (LTI y LTIIb), y la toxina Shiga (Stx). Las estructuras se vieron hacia los lados con la superficie de las subunidades B que contienen los sitios de unión para sus receptores de membrana hacia abajo. Las subunidades B de todas las toxinas son pentámeros y una cinco (posiblemente más para Stx) receptores de glicolípidos. Las subunidades A se muestran en amarillo. Las cadenas A1 y A2 en CT, LTI y LTIIb están unidos por un bucle flexible (no se resuelve en la estructura cristalina) que contiene un sitio de escisión proteolítica apretado por un enlace disulfuro. Las flechas marcan el sitio del bucle y la escisión proteolítica. El motivo Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) (indicado por un asterisco) de las subunidades A en CT, LTI y LTIIb también se enfrentan a la membrana, como se indica. La subunidad de Stx no tiene un motivo KDEL. Adaptado de Lencer and Tsai (2003).

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] es 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 (Fig. 12).

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 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 endoplasmático, que es el motivo KDEL.

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 su blanco, la adenilato ciclasa, se localiza. El fragmento A₁ 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⁻, bicarbonato (HCO₃⁻) y agua.

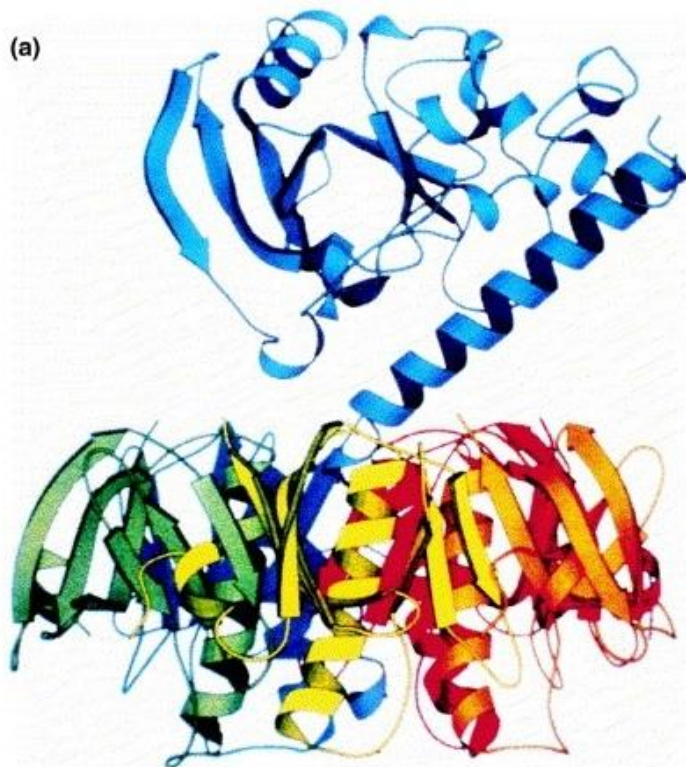
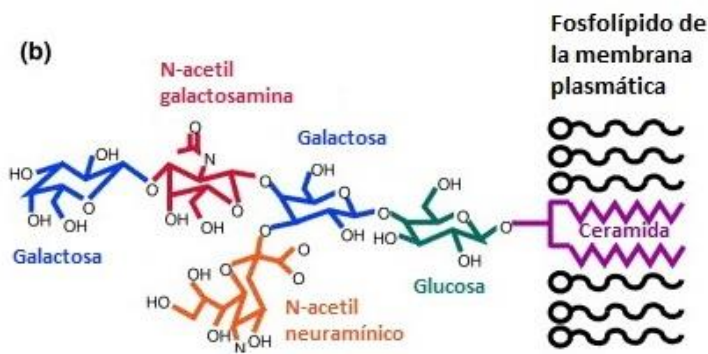


Figura 12. Estructura de la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (Etx) (a) y su principal receptor celular de superficie, GM1-gangliósido (b).

(a) La subunidad A (azul), que comprende los fragmentos A1 y A2, forma una estructura en cuña. La longitud de la hélice del fragmento A2 es visible y su fragmento C-terminal puede ser insertado en un poro central formado por la subunidad B. Los monómeros de la subunidad B están dispuestos en un anillo pentamérico, se mantienen unidos por interacciones no covalentes altamente estables.



(b) GM1-gangliósidos consiste en un pentasacárido unido a una cola de ceramida anclado en la cara exterior de la membrana plasmática. GM1 se encontró preferentemente situado en microdominios de membranas insolubles a detergentes. Adaptado de Williams (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 brefeldina A es la 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 (Fig. 13). 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 glicoesfingolípidos).

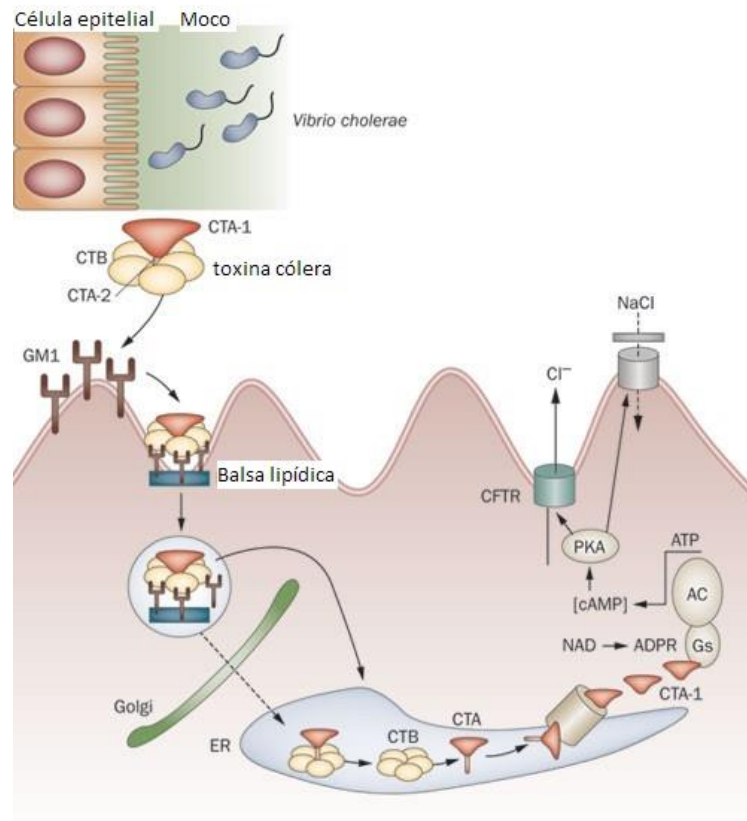


Figura 13. Tras la colonización del intestino delgado por *V. cholerae*, la toxina cólera es secretada. Ésta interactúa con los receptores de gangliósidos GM1 (que se encuentran principalmente en balsas lipídicas de la membrana celular) y es endocitada. Posteriormente la toxina alcanza el retículo endoplásmico, pasando o no previamente por el Golgi, dependiendo del tipo celular. Allí, la subunidad A se disocia de las subunidades B y sale hacia el citosol mediante el sistema ERAD, pero evitando ser degradada y plegándose correctamente. Dicha subunidad activa a la adenilato ciclasa, generando un aumento en las concentraciones de cAMP, lo que activa a la PKA. Se produce la fosforilación del canal de cloruro CFTR, y la secreción de Cl⁻ y agua. Imagen modificada de Clemens et al (2011).

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 (Fig. 14).

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.

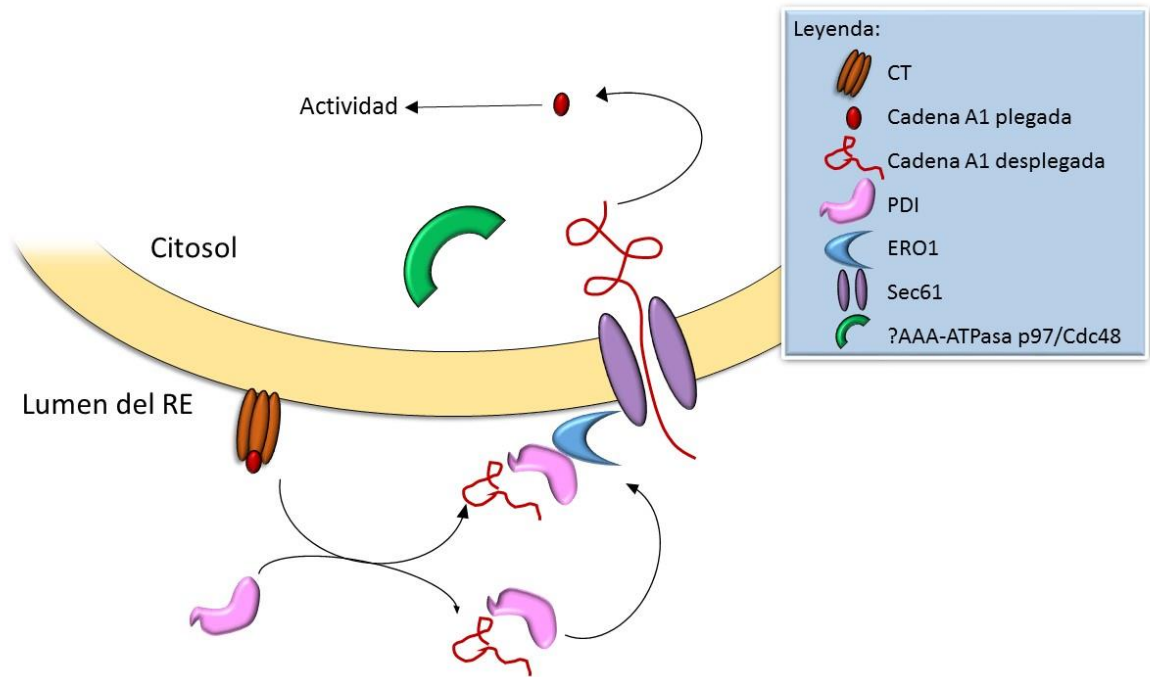


Figura 14. Retrotranslocación de la cadena A1 de la toxina cólera. La forma reducida de la proteína isomerasa de puentes disulfuro (PDI) reconoce a la toxina y disocia a la cadena A1. Ero1 oxida a la PDI liberando la cadena A1, ya desplegada, probablemente dirigiéndola directamente al canal de translocación Sec61. Un factor como p97 AAA-ATPasa podría estar ayudando a la propulsión de la cadena A1 hacia el citosol. Posteriormente la cadena A1 se pliega correctamente, evita ser ubiquitinada, y genera toxicidad. Imagen de elaboración propia, basada en una figura de Lencer y Tsai (2003).

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**.

Algunos estudios sugieren impedir el que la cadena A1 adquiera un estado desplegado como posible diana terapéutica, mediante el uso de chaperonas químicas como el ácido 4-fenilbutírico (aprobado por la FDA para el tratamiento de enfermedades causadas por problemas en el ciclo de la urea). De esta manera no sería reconocida por el sistema ERAD como una proteína mal plegada, impidiendo así que ejerza su toxicidad.

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 que pudiera ser el mismo poro que transporta proteínas durante el proceso de biosíntesis, es decir, **Sec61**.

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.

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** (Fig. 15). 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, que es responsable de unión al DNA y 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**. Esta proteína consta 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.

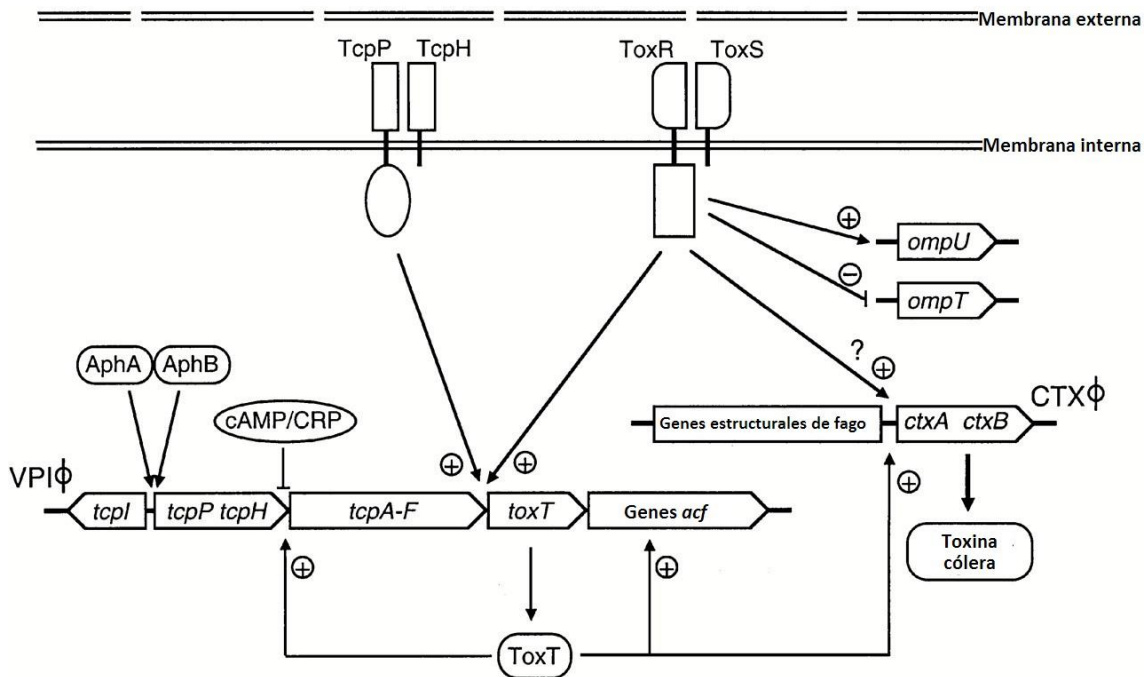


Figura 15. Regulación de virulencia en *V. cholerae*. AphA y AphB activan la transcripción de *tcpPH*. TcpP/TcpH y ToxR/ToxS cooperan en la activación de la transcripción de *toxT*. ToxT activa la transcripción de los genes desde *tcpA* a *tcpF*, *ctxA*, *ctxB* y los genes *acf* (“accessory colonization factor”). Imagen modificada 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* (Fig. 16).

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, LuxV 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 la 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 (Fig. 16). Esta proteína actúa inhibiendo los factores de virulencia, dado que la proteína reprime la transcripción de *aphA*.

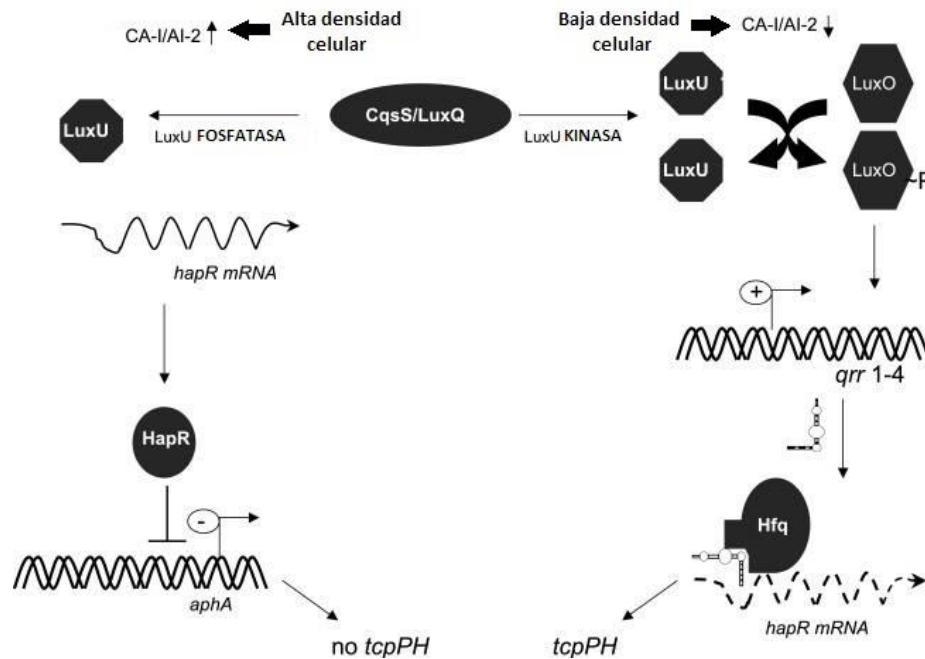


Figura 16. Regulación de los niveles de HapR mediante el mecanismo de “quorum sensing” en *V.cholerae*. Siglas: CAI-1 (*Cholerae* Autoinducer-1), AI-2 (*Autoinducer-2*), CqsS (*Cholerae* quorum-sensing Sensor), *qrr* (*quorum-regulatory RNA*). Imagen modificada de Matson et al. (2007).

Por otro lado, HapR activa la expresión de *hapA*, un gen que codifica para la hemaglutinina/proteasa que, secretada por la bacteria, 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 (Fig. 17).

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.

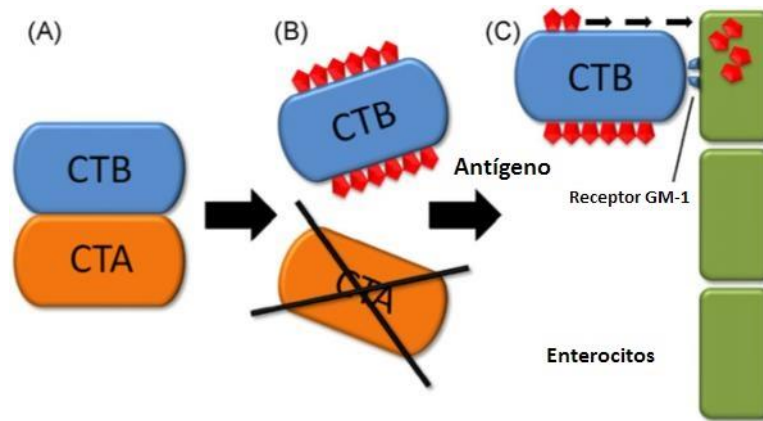


Figura 17. Esquema que muestra la producción de un adyuvante a partir de la toxina cólera. Se muestra cómo se descarta la subunidad CTA, responsable de la toxicidad (aunque existen otros procedimientos en los que se emplea la subunidad CTA). Se une el antígeno de interés a la subunidad CTB, que se une al receptor GM-1 en los enterocitos y promueve el reconocimiento del antígeno por el sistema inmunitario. Imagen modificada de Brunner et al. (2010).

REFERENCIAS

- **Almagro-Moreno, S., Pruss, K. and Taylor, R.K.** (2015). Intestinal Colonization Dynamics of *Vibrio cholerae*. PLoS Pathog. 11: e1004787.
- **Das, B.** (2014) Mechanistic insights into filamentous phage integration in *Vibrio cholerae*. Frontiers in microbiol. 5: 650.
- **Brunner R, Jensen-Jarolim E, Pali-Schöll I.** (2010) The ABC of clinical and experimental adjuvants—A brief overview. Immunol. Letters. 128(1): 29-35.
- **Butler SM, Camilli A.** (2005) Going against the grain: chemotaxis and infection in *Vibrio cholerae*. Nat. Rev. Microbiol. 3: 611–620.
- **Clemens, J., Shin, S., Sur, D., Balakrish Nair G. and Holmgren J.** (2011) New-generation vaccines against cholera. Nat. Rev. Gastroenterol. and Hepatol. 8: 701-710.
- **Cotter, P.A. and DiRita, V.J.** (2000) Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. Annu. Rev. Microbiol. 54: 519-565.
- **Donnenberg, M.S.** (2000) Pathogenic strategies of enteric bacteria. Nature 406: 768-774.
- **Faruque, S.M., Albert, M.J. and Mekalanos, J.J.** (1998) Epidemiology, Genetics, and Ecology of Toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 1301-1314.
- **Lencer, W. I. and Tsai, B.** (2003). The intracellular voyage of cholera toxin: going retro. Trends Biochem. Sci. 28: 639-645.
- **Lipp, E.K., Huq, A. and Colwell, R.R.** (2002) Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. Clin. Microbiol. Rev. 15: 757-770.
- **Robles, L.A., García, R.M., Torres, J.** (1999) Toxinas de *Vibrio cholerae*. Una revisión. Rev. Mex. de Patolog. Clínica. 4: 255-259.

- **Manning, P.A.** (1994) Surface-associated and soluble components of *Vibrio cholerae* involved in bacteria-host interactions. *Cur. Top. Microbiol. Immunol.* 192: 365-281.
- **Matson, J.S., Withey, J.H. and DiRita, V.J.** (2007). Regulatory networks controlling *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infect. Immun.* 75: 5542-5549.
- **McLeod, S.M., Kimsey, H.H., Davis, B.M. and Waldor, M.K.** (2005) CTXphi and *Vibrio cholerae*: exploring a newly recognized type of phage-host cell relationship. *Mol. Microbiol.* 57: 347-356.
- **Ray S., Taylor M., Burlingame M., Tatulian S.A., Teter K.** (2011) Modulation of Toxin Stability by 4-phenylbutyric Acid and Negatively Charged Phospholipids. *PLoS One.* 6(8): e23692.
- **Schmidt, H. and Hensel, M.** (2004) Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 14-56.
- **Teschler J.K, Zamorano-Sánchez D, Utada A.S, Warner C.J.A, Wong G.C.L, Linington R.G, Yildiz F.H** (2015) Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 13: 255 - 268.
- **Williams, N.A., Hirst, T.R. and Nashar, T.O.** (1999) Immune modulation by the cholera-like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic. *Immunol. Today.* 20: 95-101.

En la red:

<http://www.agrobiotecnologia.es/es/grp-biofilmsMicrobianos/index.htm>

<http://image.slidesharecdn.com/infectiousdiseases-140429071128-phpapp02/95/chapter-13-infectious-disease-cholera-term-2-9-638.jpg?cb=1398755865>