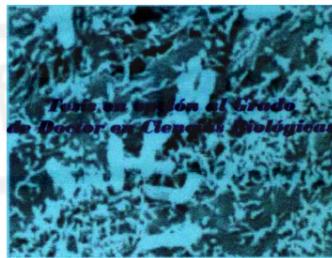


CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA. DIRECCIÓN DE BIOTECNOLOGÍA

Inducción de mediadores inflamatorios por cepas vacunales de *Vibrio cholerae*



Autor: Lic. Boris Luis Rodríguez González

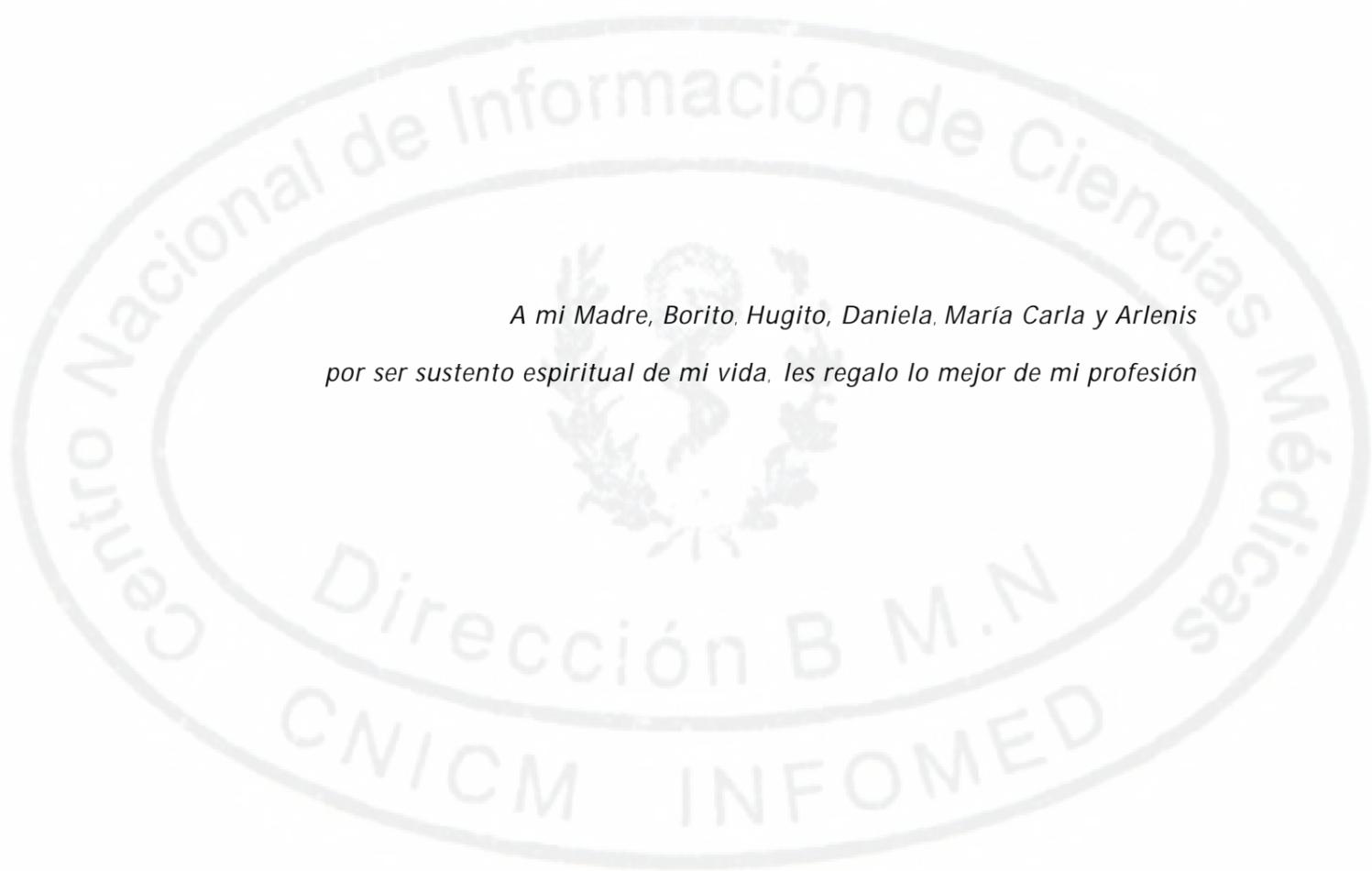
Tutor: Inv. Tit., Lic. Anselmo Otero González, Dr. CsB

Asesores:

Inv. Tit., Lic. Armando Rojas Rubio, Dr. CsB

Inv. Tit., Lic. Jorge Sarracent Perez, Dr. CsB

Ciudad de La Habana
2004



*A mi Madre, Borito, Hugito, Daniela, María Carla y Arlenis
por ser sustento espiritual de mi vida, les regalo lo mejor de mi profesión*

Agradecimientos

Es ahora el momento de dar las gracias a todos los que de una manera a otra han contribuido para la realización de esta tesis, la cual se desarrolló en el Departamento de Genética de la Dirección de Biotecnología del Centro Nacional de Investigaciones Científicas en el marco del proyecto de desarrollo de una vacuna cubana contra el cólera.

En primer lugar, quisiera agradecer al proyecto CÓLERA y a todos sus integrantes, en especial a los presentes y ausentes del grupo, devenido en departamento de GENÉTICA: Tania, Elsa, Javier, Talena, Arlenis, Karén, Edith, Eriel, Juana, Victor y Caridad. Quiero, además, agradecer especialmente a Fando, por todas las fructíferas discusiones y Yussuani, por estar siempre dispuesto a ayudar en cualquier cosa.

A los miembros del proyecto del Instituto Finlay y el IPK, por todo el apoyo recibido. En especial a Hilda, Yidy, Gemma, Baby, Yadira, Vilma, felicita, Amelia y Maestre.

A mi tutor Dr. Anselmo Otero y a mis asesores Dr. Armando Rojas y Dr. Jorge Sarracent, por toda su sabiduría, dedicación y valiosos consejos. En especial al Mandy, por ayudarme desde el principio a comprender, un poco, el fascinante mundo de las citocinas.

A Oliver, Luis,, Lily y Cheyla, por la magnífica revisión del documento y todas sus sugerencias. A los Drs. María Cristina Pico y Manuel Araña, que fueron oponentes en la predefensa de esta memoria, por su minuciosa revisión del documento y por todas sus valiosas recomendaciones.

A todos los compañeros viejos y nuevos del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, con los cuales he compartido todos mis años de trabajo. En particular, a Gustavo, Irelio, Jose Luis, el Papo, Dulce, Ofelita y Mirta, por ayudarme y estar siempre pendientes del desarrollo de esta tesis. A Carlos, Contreras, Ramón, Matilde, Blanca y otros, que en los momentos difíciles me dieron su voto de confianza. A los estudiantes, William e Israel, que realizaron sus tesis de diploma en este tema, por toda su ayuda con la parte experimental y por haber aprendido de ellos también.

A mi hermano Leyva a mis amigos Frank, Raulito, Manacho y Yampier, por estar siempre dispuestos a ayudarme y RESOLVERME todo lo que estuviera a su alcance.

A todos aquellos que no mencione involuntariamente, reciban mi agradecimiento.

Por último y de manera muy especial, a mi FAMILIA por haberme permitido robarle el tiempo que le debo, por su apoyo incondicional y por ayudarme a ser cada día mejor.

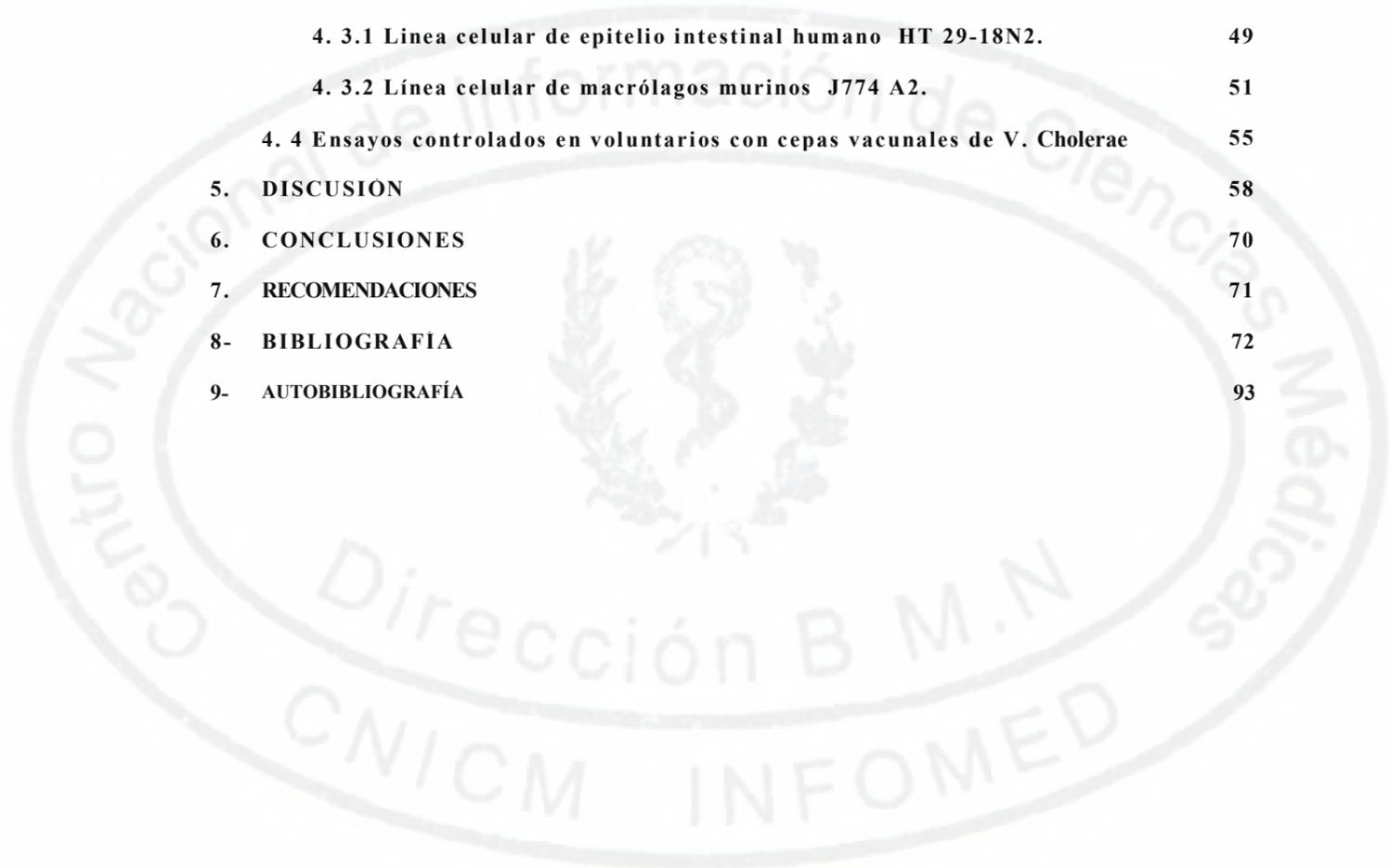
A Arlenis, POR TODO, GRACIAS.

ÍNDICE

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN LAS TESIS.

	Página
1- INTRODUCCION	
Antecedentes	1
Hipótesis.	3
Objetivos.	3
Tareas.	4
Novedad científica.	5
Breve descripción del contenido de la tesis.	5
2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	6
2. 1 Colera, agente causal.	6
2. 2 Patogénesis y factores de virulencia.	8
2. 3 Las células epiteliales y su expresión de mediadores inflamatorios.	14
2. 4 Respuesta inmune e inflamación.	15
2. 5 Toxina del cólera e inmunomodulación.	19
2. 6 Vacunas contra el cólera reactogenicidad.	20
3- MATERIALES Y METODOS.	26
3. 1 Cepas y cultivos celulares.	26
3. 2 Reactivos empleados y preparación del LPS de <i>L. cholerae</i> .	27
3. 3 Preparación de los inoculos bacterianos para la línea HT 29-I8N2.	27
3. 4 Experimentos de adherencia y vitalidad celular.	28
3. 5 Experimentos de inducción de mediadores inflamatorios en las líneas celulares HT 29-I8N2 y.J774. A2.	29
3. 5.1 Línea celular de epitelio intestinal humano HT29-18N2.	29
3. 5.2 Línea celular de macrófagos murinos .J774. A2.	33
3.6 Acción de la toxina del cólera sobre la respuesta de mediadores inflamatorios en las líneas celulares HT29-18N2 y.J774. A2.	34
3.6. 1 Línea celular de epitelio intestinal humano HT 29-18 A2.	34
3.6. 2 Línea celular de macrófagos murinos J774. A2.	36
3. 7 Ensayos controlados en voluntarios con cepas vacúnales de <i>X. cholerae</i> .	37

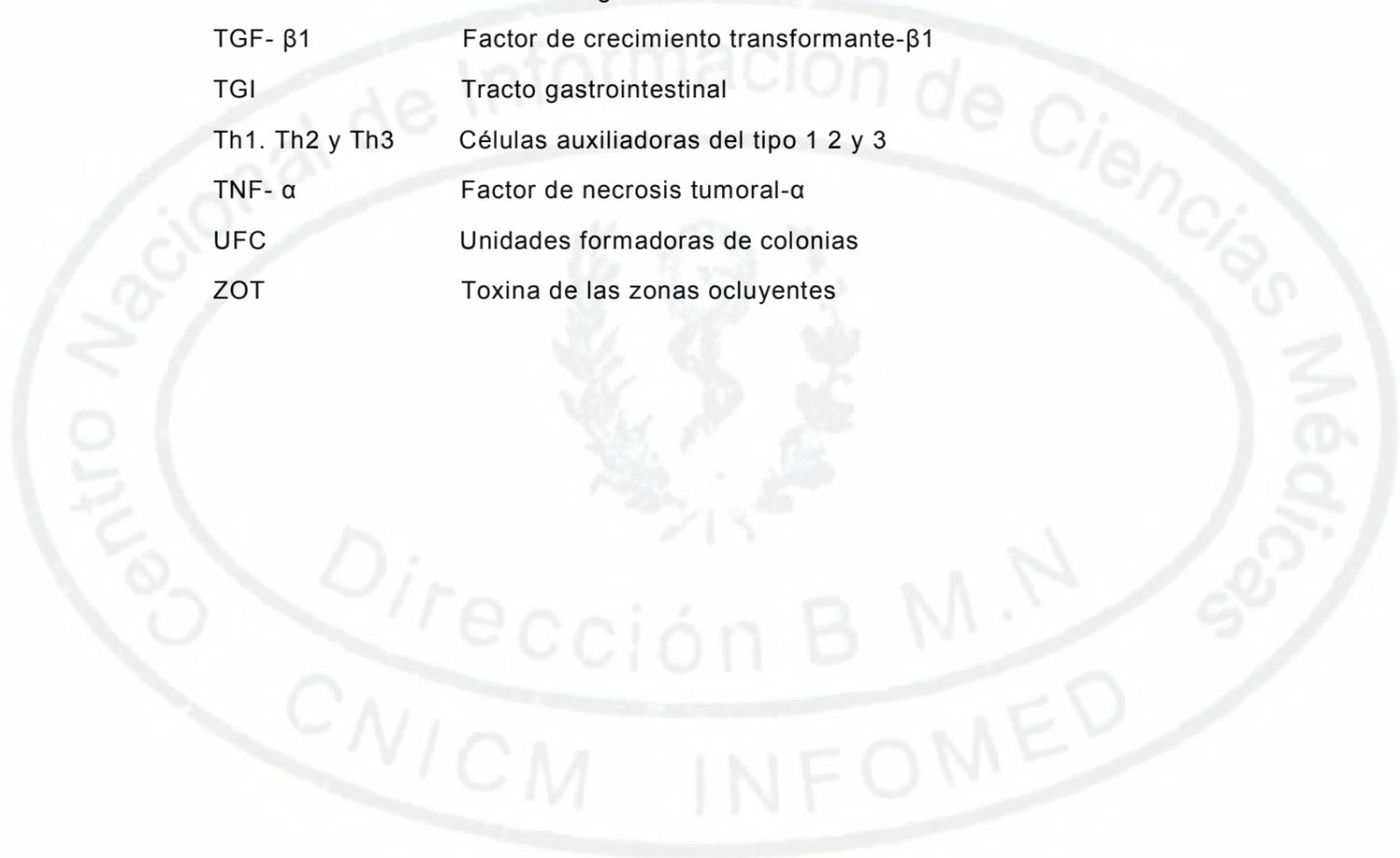
3. 8	Procesamiento estadístico.	39
4	RESULTADOS.	41
4.1	Inoculo, adherencia y vitalidad celular.	41
4.2	Experimentos de inducción de mediadores inflamatorios en las líneas celulares HT 29-18N2 y J774 A2.	42
4. 2.1	Línea celular de epitelio intestinal humano HT 29-18N2.	42
4. 2.2	Línea celular de macrófagos murinos. J774 A2.	48
4. 3	Acción de la toxina del cólera sobre la respuesta de mediadores inflamatorios en las líneas celulares HT 29-18N2 y J774 A2.	49
4. 3.1	Línea celular de epitelio intestinal humano HT 29-18N2.	49
4. 3.2	Línea celular de macrófagos murinos J774 A2.	51
4. 4	Ensayos controlados en voluntarios con cepas vacunales de V. Cholerae	55
5.	DISCUSIÓN	58
6.	CONCLUSIONES	70
7.	RECOMENDACIONES	71
8-	BIBLIOGRAFIA	72
9-	AUTOBIBLIOGRAFÍA	93



Abreviaturas empleadas en la tesis

ACE	Enterotoxina accesoria a la TC
AcM	Anticuerpo monoclonal
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Acido desoxirribonucleico de simple cadena
ADP	Adenosma-5 -difosfato
AMPc	Adenosma-5'-monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Cl	Iones cloruro
DS	Desviación estándar
EUA	Estados Unidos de América
FMA	Forbol 12-meristato 13-acetato
GM-1	Gangliosido GM-1
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HAP	Hemaglutinina proteasa
Hyal	Hemolisis
IF N-	Interferon-
IL	Interleucina
iNOS	Enzima óxido nítrico sintasa inducible
LBA	Medio Luria Bertani con agar
L-NMMA	N-monometil L-arginina
LPS	Lipopolisacárido
MCP 1	Proteína quimioatrayente de monocitos-1
MFRHA	Hemaglutinina resistente a manosa y fucosa
MSHA	Hemaglutinina sensible a manosa
NAD'	Nicotinamida-adenin-dinucleótido
NO	Oxido nítrico
OMPs	Proteínas de membrana externa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGE.	Prostaglandina E,

PGs	Prostaglandinas
RER	Respuesta de explosión respiratoria
RT-PCR	Reacciones de transcripción reversa y PCR
RTX	Toxina de secuencias repetidas
SNE	Sistema nervioso entérico
SSTF	Solución salina tamponada con fosfatos
TC	Toxina del cólera
TCB	Subunidad B de la toxina del cólera
TCP	Pilina corregulada con la TC
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante- β 1
TGI	Tracto gastrointestinal
Th1. Th2 y Th3	Células auxiliaoras del tipo 1 2 y 3
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α
UFC	Unidades formadoras de colonias
ZOT	Toxina de las zonas ocluyentes



Síntesis

El colera es una enfermedad diarreica aguda que ha sido tradicionalmente considerada secretoria y no inflamatoria. Sin embargo, las reacciones adversas (reactogenicidad) producidas por las cepas vacunales vivas de colera en los voluntarios inmunizados parecen deberse fundamentalmente a un incremento de la respuesta inflamatoria intestinal. En esta tesis se analizó la expresión de mediadores inflamatorios en la línea celular de intestino humano HT29-18N2 y en la de macrófagos murinos J774 A2 expuestas a cepas vacunales de *Vibrio cholerae* y al lipopolisacárido bacteriano respectivamente. Además se estudió la acción de la toxina del cólera sobre la respuesta de mediadores inflamatorios en ambas líneas celulares. Finalmente se monitorió la aparición de diarreas en los voluntarios inoculados oralmente con cepas vacunales de *V. cholerae* y se determinó la presencia de lactoferrina como marcador inflamatorio en sus heces. Las células HT29-18N2 cocultivadas con las cepas vacunales reactogénicas de *V. cholerae* expresaron más transcritos de la interleucina-8, el factor de necrosis tumoral- α y del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos que las expuestas a las cepas vacunales no reactogénicas. Además estas células también secretaron más interleucina-8 y factor de necrosis tumoral- α en respuesta a las cepas reactogénicas y se demostró la necesidad del contacto estrecho vibriones/células epiteliales en la producción de las citocinas inflamatorias. De igual forma el lipopolisacárido bacteriano indujo la producción de óxido nítrico y del factor de necrosis tumoral- α en los macrófagos pero no activó una respuesta de explosión respiratoria en ellos. Por otra parte la toxina del colera disminuyó la producción de la interleucina 8 inducida por las cepas vacunales de *V. cholerae* también disminuyó la producción de óxido nítrico inducida por el lipopolisacárido bacteriano y la respuesta de explosión respiratoria de la línea celular J774 A2 frente al forbol 12-meristato 13 acetato. Por el contrario esta toxina aumentó la cantidad del factor de necrosis tumoral- α producida por los macrófagos frente al lipopolisacárido de *V. cholerae*. Finalmente los voluntarios inoculados con las cepas vacunales que produjeron diarreas (JBK70 y 81) tuvieron una mayor presencia y cantidad de lactoferrina en sus heces que los voluntarios inmunizados con la cepa vacunal 638 que no produjo diarrea. Estos resultados representan una evidencia del componente inflamatorio de la reactogenicidad y sugieren que la toxina del colera podría tener una función moduladora de la respuesta inflamatoria intestinal en los seres humanos infectados con *V. cholerae*. Además el modelo de células epiteliales aquí desarrollado es útil para evaluar la reactogenicidad de las cepas vacunales vivas de colera antes de pasar a estudios en voluntarios y sirve para estudiar la respuesta de las células intestinales a los vibriones y a la toxina cólera, lo que permitirá un mayor conocimiento de la participación de estas células en la patogenia del colera.

1- Introducción

Antecedentes.

El cólera es una enfermedad que causa diarreas severas en los humanos. La TC producida por *V cholerae* de los serogrupos 01 y 0139 provoca el escape de enormes cantidades de líquido y electrolitos hacia la luz del intestino, lo cual produce una rápida y profusa diarrea acuosa en forma de agua de arroz, disminución del volumen sanguíneo circulante, acidosis metabólica, disminución drástica de potasio y en último término colapso vascular y muerte (cólera gravis) (CDC/NCID OPS 1994 y Sack y col 2004).

La diarrea del cólera ha sido tradicionalmente considerada como secretoria y no inflamatoria. No obstante, se ha observado una mayor presencia de células inflamatorias y mediadores de inflamación (neutrófilos, eosinófilos, mastocitos, macrófagos, IL-8, TNF- α , lactoferrina, NO, PGE₂, proteína C reactiva, superóxido dismutasa, entre otros) en la mucosa intestinal, las heces y/o el suero de pacientes con cólera gravis al compararlos con voluntarios sanos (Mathan y col 1995, Silva y col 1996, Janoff y col 1997 y Qadri y col 2002 y 2004). Pero la presencia de estas células y mediadores inflamatorios en el cólera es menor que la observada en las diarreas inflamatorias causadas por *Shigella* (Ragib y col 2000) y *Vibrio parahaemolyticus* (Qadri y col 2003) y debe ser útil en el establecimiento de la respuesta inmune adaptativa contra los vibriones (Qadri y col 2002 y 2004). Además se ha demostrado que las cantidades de IL-8 y lactoferrina en las heces de voluntarios inoculados oralmente con cepas toxigénicas de *V. cholerae* 01 y 0139 son mucho menores que las detectadas en las heces de los voluntarios inmunizados con la cepa vacunal reactogénica CVD110 (Silva y col 1996). Teniendo en cuenta que la diarrea producida por la cepa vacunal tuvo un mayor componente inflamatorio que la diarrea producida por las cepas toxigénicas, estos investigadores sugirieron que algunos factores de virulencia presentes en las cepas toxigénicas (eliminados de las cepas vacunales vivas), pudieran ser capaces de disminuir la respuesta inflamatoria de los humanos infectados con *V. cholerae* (Silva y col 1996). Sin embargo, la posible regulación de algunos de estos factores como es el caso de la TC sobre la producción de mediadores inflamatorios en las células del epitelio intestinal o los macrófagos inducida por cepas vacunales vivas o el LPS de *V. cholerae* no ha sido estudiada.

Se han desarrollado diferentes vacunas con el objetivo de proteger a los humanos contra el cólera, siendo las más promisorias las de células vivas atenuadas por ingeniería genética, dada la amplia y duradera protección demostrada por ellas en los voluntarios inmunizados (Levine y col , 1988a y 1988b) Sin embargo las vacunas vivas tienen dos desventajas principales 1- el impacto ambiental que producen al ser excretadas por los voluntarios, por el riesgo de readquirir los genes tóxicos (Waldor y Mekalanos, 1996 y Davis y Waldor. 2003) y 2- los efectos adversos (reactogenicidad) producidos en los individuos inmunizados tales como, diarrea, vómito, fiebre, dolor de cabeza, dolor abdominal, meteorismo, acidez y malestar general La diarrea es el principal efecto adverso que define la reactogenicidad de las cepas vacunales vivas de *V. cholerae* (Levine y col 1988a Tacket y col 1993 y Taylor y col 1994).

Las bases moleculares de la reactogenicidad no se conocen pero se piensa que puede deberse al desarrollo de una respuesta inflamatoria a nivel de la mucosa intestinal Mekalanos y col en 1995 al observar que las cepas vacunales motiles inducían mayor reactogenicidad que las cepas vacunales no mótils en los voluntarios inoculados (Coster y col 1995 y Kenner y col 1995). postularon la hipótesis de que las reacciones adversas podrían deberse a la inducción de citocinas proinflamatorias en las células del epitelio intestinal en respuesta al contacto estrecho entre las bacterias y dichas células. Sin embargo, no existen trabajos previos donde se aborde la producción de citocinas inflamatorias en células del epitelio intestinal por la interacción con cepas vacunales de *V. cholerae* Además se ha observado la infiltración de macrófagos y neutrófilos en la mucosa intestinal de los pacientes de cólera (Mathan y col . 1995 y Qadn y col . 2002) y se piensa que el NO y las moléculas resultantes del estrés oxidativo (peróxidos y superóxidos) pueden jugar un papel importante en los mecanismos de defensa del hospedero contra los vibriones (Janoff y col , 1997 y Qadn y col . 2002) Sin embargo poco se sabe de la inducción de mediadores inflamatorios en los macrófagos expuestos al LPS de *V cholerae*. que conjuntamente con la respuesta de las células del epitelio intestinal, puedan desencadenar un proceso inflamatorio en la mucosa intestinal de los voluntarios inoculados oralmente con cepas vacunales vivas de *V cholerae*

La primera evidencia experimental del componente inflamatorio de la reactogenicidad se obtuvo cuando la cepa vacunal reactiva CVD110 se inoculó por vía oral en voluntarios sanos y produjo grandes cantidades de lactoferrina y un incremento de la IL-8 en sus heces, mientras que la cepa vacunal no reactiva CVD103-HgR indujo niveles mucho menores de estos marcadores inflamatorios en las heces de los voluntarios (Silva y col. 1996). La IL-8 es un potente quimioatrayente de leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos) y linfocitos T (Oppenheim y col. 1991 y Eckmann y col. 1993a), mientras que el aumento de la lactoferrina es un marcador del incremento de los neutrófilos en el TGI de los humanos (Sánchez y col 1992 y Guerrant y col, 1992). Sin embargo, dado que en este estudio solo se empleó una cepa reactiva y otra no reactiva se podría pensar que la mayor presencia de marcadores inflamatorios en las heces de los voluntarios que recibieron la cepa reactiva se deba a características intrínsecas de la cepa. Este hecho implica que se deban realizar nuevos ensayos en voluntarios con el empleo de otras cepas vacunales vivas de *V. cholerae* para corroborar la presencia de un componente inflamatorio en la reactividad. Atendiendo a estos antecedentes, nos formulamos la siguiente **hipótesis**

Las cepas vacunales de *V. cholerae* y su principal componente superficial el LPS inducen una respuesta de mediadores inflamatorios en células de epitelio intestinal y macrófagos cuya magnitud es modulada por la acción de la toxina cólera en cepas toxigénicas y que esta relacionada con la capacidad de las cepas vacunales vivas de producir reactividad e inducir un incremento de neutrófilos en el TGI de individuos inoculados por vía oral

Para dar respuesta a nuestra hipótesis nos planteamos los siguientes **objetivos**

- 1 Evaluar la inducción de mediadores inflamatorios *in vitro* en células de epitelio intestinal y macrófagos por la interacción con cepas vacunales de *V. cholerae* y el LPS respectivamente
- 2 Evaluar la acción de la toxina del cólera sobre la respuesta de mediadores inflamatorios inducida por cepas vivas de *V. cholerae* y el LPS en células de epitelio intestinal y macrófagos. respectivamente
- 3 Determinar si las cepas vacunales de *V. cholerae* que producen reactividad inducen una mayor presencia de neutrófilos en el TGI de los individuos inoculados

Para dar cumplimiento a cada objetivo se ejecutaron las siguientes **tareas**

Objetivo 1:

- a) Análisis de la adherencia y el crecimiento de las cepas de *V cholerae* a diferentes tiempos sobre la línea de epitelio de colon humano HT29-18N2
- b) Estudio de la vitalidad de las células epiteliales cuando son coincubadas con las cepas de *V⁷ cholerae*
- c) Determinación de los niveles de expresión de ARNm de varios mediadores inflamatorios en las células HT29-18N2 expuestas a la cepa reactogénica JBK70 y no reactogénica CVD103-HgR, así como a dos de nuestras cepas candidatos vacunales vivas o inactivadas por calor
- d) Detección de las concentraciones de los mediadores inflamatorios en los sobrenadantes de cultivo de las células HT29-18N2 expuestas a los mismos estímulos de c
- e) Ejecución de las mismas tareas de c y d en experimentos donde se utilicen aditamentos tipo Transwell para impedir las interacciones directas entre los vibriones y las células epiteliales
- f) Análisis de la inducción de NO, el TNF- α y la RER en la línea de macrófagos murinos J774 A2 por la acción del LPS de *V cholerae* 01

Objetivo 2:

- a) Cuantificación de la cantidad de la TC producida por cepas toxigénicas de *V cholerae* al ser cultivadas con las células de la línea HT29-18N2 y comparación con la cantidad producida en las condiciones óptimas de expresión de esta toxina *in vitro*
- b) Estudio de la acción de la TC sobre la respuesta de mediadores inflamatorios de las células HT29-18N2 con el empleo de cepas de *V cholerae* toxigénicas, no toxigénicas y de estas últimas en presencia de la TC
- c) Estudio de la acción de la TC sobre las respuestas de NO, el TNF- α y la RER de los macrófagos frente al LPS bacteriano

Objetivo 3:

- a) Colección, pesaje y clasificación de todas las heces de los voluntarios de los diferentes ensayos clínicos durante los cinco días posteriores a la inoculación de la cepa vacunal y el placebo

b) Detección de los niveles de lactoferrina en las heces de todos los voluntarios de los ensayos clínicos durante los 5 días posteriores a la inoculación de la cepa vacunal y el placebo La **novedad científica** de la presente tesis se resume en los siguientes aspectos

- 1- Se demuestra por primera vez que las cepas vacunales de *V cholerae* y su principal componente superficial, el LPS bacteriano, inducen una respuesta de mediadores inflamatorios en las células de epitelio intestinal y los macrófagos
- 2- El haber demostrado que las interacciones directas entre los vibriones y las células de la línea HT29-18N2 son imprescindibles para inducir en ellas una respuesta de citoquinas inflamatorias
- 3- Se evidenció por primera vez el efecto regulador de la TC sobre la respuesta de mediadores inflamatorios de las células HT29-18N2 y los macrófagos inducida por cepas vivas de *V cholerae* y el LPS bacteriano
- 4- Se confirma, con una cepa reactogénica control (JBK70) y dos de nuestros candidatos a vacunas contra el cólera, que las cepas vacunales de *V cholerae* que producen reactogénicidad, inducen una mayor presencia de neutrófilos en el TGI de los individuos inoculados que una cepa no reactogénica

Además en términos prácticos, el modelo aquí desarrollado con la línea de células HT29-18N2 es útil para evaluar la reactogénicidad de los candidatos vacunales vivos de cólera antes de pasar a estudios en voluntarios y sirve para continuar los estudios de la respuesta de las células intestinales a los vibriones a sus componentes y a la TC. lo que permitirá una mejor comprensión de la participación de estas células en la inmunidad y la patogenia de esta enfermedad.

Este trabajo de tesis consta de 9 capítulos. Introducción (5 páginas). Revisión bibliográfica (20 páginas). Materiales y métodos (15 páginas). Resultados (17 páginas) Discusión (12 páginas), Conclusiones (1 página). Recomendaciones (1 página) Bibliografía (212 citas 21 páginas) y Autobiografía (2 páginas) Además en las dos primeras páginas se muestra un Índice resumido con los epígrafes y sub epígrafes de la tesis, seguido de una hoja con las abreviaturas empleadas en la tesis y luego una síntesis de una página.

2- Revisión bibliográfica.

2.1 Cólera, agente causal.

El cólera es una enfermedad diarreica aguda producida por la colonización intestinal de cepas de *V cholerae* de los serogrupos 01 u 0139 (CDC/NCID OPS 1994 y Kaper y col 1995) La diarrea cólerica es producida por la acción de la TC dada su capacidad de aumentar los niveles intracelulares de adenosina-5 - monofosfato cíclico (AMPc) los que a su vez incrementan la actividad de los canales de iones cloruros (Cl⁻) que finalmente provoca un flujo creciente de agua hacia la luz del intestino. Éste constituye el evento decisivo desencadenante del cuadro diarreico (Finkelstein. 1992. Spangler, 1992 y Kaper y col 1995)

Los primeros informes del cólera datan de principios del siglo XIX cuando en 1817 en el sudeste de Asia comenzó una epidemia que rápidamente se expandió por todo el mundo, convirtiéndose en la primera pandemia de cólera de la que se tengan datos confiables. No obstante, esta enfermedad parece que ha acompañado al hombre desde mucho antes, ya que Hipócrates (460-377 AC) y Galeno (129-216 DC) describieron un padecimiento con síntomas muy parecidos al cólera. Las 7 pandemias de cólera que se conocen han sido causadas por cepas de la especie *V cholerae* 01 descubierta y nombrada así por Pacini en 1854 quien observó al microscopio un gran número de bacterias con forma de "coma" en la mucosa del intestino delgado de víctimas de la epidemia que azotó a Florencia en ese año. En 1883 Robert Koch estudiando el cólera en Egipto, lo cultivó por primera vez y según la apariencia de coma que tenía en el aislamiento inicial lo denominó *Kommabazillen* aunque luego de pasar en el laboratorio puede revertir a formas rectas. Este microorganismo fue llamado por varias décadas *Vibrio comma* hasta que los trabajos de Pacini fueron reconocidos como los primeros y retomó su nombre original *V cholerae*.

V cholerae se encuentra ubicado en la División II de Bacterias. Parte 8 según el Manual Beigey correspondiente a bacilos Gram negativos y anaerobios facultativos. Aquí se incluyen dos familias Enterobacteriaceae con doce géneros y Vibrionaceae donde la característica común a sus cinco géneros y que los dife-

rencia de la familia anterior, es que son oxidasa positivos y cuando se mueven lo hacen a través de un flagelo polar (Buchanan y col , 1974)

En la familia Vibrionaceae se encuentra el género *Vibrio* que son bacilos que miden de 0.5-0,8 µm de diámetro por 1.4-2.6 µm de largo no forman endoesporas ni microquistes Pueden crecer sin grandes requerimientos nutricionales y preferiblemente a pH 7 aunque toleran condiciones de pH hasta 9.5 pero son sensibles al pH ácido y los iones Na⁺ estimulan su crecimiento (Buchanan y col 1974)

Hasta 1992. el único serogrupo de *V. cholerae* capaz de producir epidemias y pandemias era el 01 que se divide en los biotipos Clásico y El Tor sobre la base de criterios bioquímicos y fenotípicos como son la sensibilidad a la polimixina B la reacción con fagos específicos para cada biotipo. la prueba de Voges- Proskauer y el empleo de las propiedades hemolíticas y hemaglutinantes características de cada uno Ambos biotipos se encuentran separados en los serotipos Ogawa Inaba e Hikojima atendiendo a diferencias antigénicas en su lipopolisacárido superficial aunque el último de ellos aparece raras veces De las 7 pandemias de cólera, las 6 primeras fueron causadas por vibriones del biotipo Clásico, mientras que la última está siendo causada por el biotipo El Tor de *V cholerae* 01 Sin embargo, en Octubre de 1992 ocurrió una epidemia en Madras India causada por *V cholerae* del serogrupo no-01 con la subsiguiente propagación a otras ciudades (Franzon y col . 1993) Esta cepa epidémica no estaba relacionada con ninguno de los 138 serogrupos de *V cholerae* conocidos (serogrupo 01 y los 137 serogrupos no-01) por lo que le fue asignado un nuevo serogrupo 0139 con el sinónimo Bengal para indicar su aislamiento inicial de las áreas costeras de la Bahía de Bengala (Shimada y col 1993) Debido a que esta cepa causa una enfermedad que no se diferencia del cólera provocado por *V. cholerae* 01 puede ser considerada el segundo agente etiológico del cólera (CDC/NCID OPS 1994 y Johnson y col 1992) Los biotipos Clásico y El Tor no son aplicables a *V cholerae* 0139 y tampoco es válido para los restantes serogrupos no 01 (Kay y col 1994)

V cholerae 0139 está relacionado con las cepas El Tor de *V. cholerae* 01 (Calía y col 1994 y Johnson y col 1994) con las que comparte varias propiedades como son morfología cultivo los genes que codifican para la TC así como para la /O I la ACE y la TCP Sin embargo a diferencia de *V cholerae* 01. los antige-

nos superficiales del LPS de esta cepa no-01 no son reconocidos por los anticuerpos específicos anti-01. Esto está dado porque el polisacárido O del LPS de la pared celular de los vibriones 0139 difiere en longitud y composición al de *V. cholerae* 01 (Albert, 1994). Por otra parte, al igual que la mayoría de los serogrupos no-01, *V. cholerae* 0139 posee una cápsula (Weintraub y col 1994 y Comstock y col 1995) que no está presente en cepas 01. La mayor parte de los aislamientos de esta cepa son resistentes a trimetropina, sulfametatoxazol, estreptomina, furazolidona y al agente vibriostático O/129 (Finkelstein 1992).

2. 2 Patogénesis y factores de virulencia.

El cólera se transmite por la vía fecal-oral. La infección debida a *V. cholerae* comienza con la ingestión de agua y/o alimentos contaminados. Este microorganismo, una vez ingerido, debe vencer la barrera de la acidez gástrica para llegar al intestino delgado. Ya en el duodeno y el yeyuno debe adherirse y atravesar la barrera de mucus que separa los enterocitos de la luz intestinal, contrarrestar la peristalsis, competir con la microbiota normal y adherirse a los enterocitos de la mucosa intestinal (Colwell y Huq., 1994 y Kaper y col 1995). Así el tamaño del inoculo, la movilidad, quimiotaxis y la expresión de un grupo de factores de virulencia, juegan un papel determinante en la patogenia del microorganismo. Los factores más estudiados involucrados en la patogénesis del cólera son la TC, la toxina accesoria a la TC (ACE), la toxina de las zonas ocluyentes (ZOT), el LPS, la pilina corregulada con la TC (TCP), la hemaglutinina resistente a manosa y fucosa (MFRHA), la hemaglutinina sensible a manosa (MSHA), la hemaglutinina proteasa (HAP), las proteínas de membrana externa (OMPs) y la hemolisina (HlyA).

El cólera es una enfermedad mediada por la TC. El primero en advertir la presencia de una toxina mediadora de la enfermedad fue Robert Koch en 1884, quien dijo que el 1/ *cumma* producía un veneno especial que actuaba en el epitelio intestinal y que posiblemente era el responsable de los síntomas del cólera (Koch, 1884). La TC es una enterotoxina termolábil que está codificada por los genes *ctxA* y *ctxB* que codifican para las subunidades TCA (27215 Da) y TCB (11677).

Da), las cuales se ensamblan en una razón de una molécula de A por 5 de B (Gilí, 1976) La subunidad A se sintetiza como un polipéptido único que es procesado proteolíticamente dando lugar a dos polipéptidos, A1 y A2 unidos por un puente disulfuro (Spangler, 1992) Ninguna de estas subunidades individualmente tiene actividad toxigénica en animales o en sistemas de células intactas Se han propuesto diversos mecanismos que explican la acción de esta toxina. El clásico plantea que la TCB se une a la porción oligosacarídica del gangliosido GM-1 (King and van Heningen, 1973) y provoca cambios conformacionales que favorecen la acción de la HAP sobre la subunidad A. separándola en A1 y A2 La subunidad A1 penetra al interior de la célula y cataliza la transferencia de ADP del NAD⁺ a la subunidad α de la protoma G La modificación de esta subunidad promueve la activación persistente de la enzima adenilato ciclase y el aumento consecuente de los niveles de AMPc lo que a su vez produce la activación de la proteína quinasa A la cual activa canales de CC en la membrana plasmática. La permeabilidad incrementada a los CI provoca un flujo indiscriminado de agua y electrolitos hacia la luz del intestino, lo que constituye el evento decisivo en la diarrea colérica (Fin- kelstem, 1992 Spangler, 1992 y Kaper y col. 1995.). Sin embargo, se plantea que el mecanismo explicado anteriormente no justifica totalmente el efecto secretor de la TC y se ha encontrado que las PG y el SNE contribuyen de manera importante a la gran pérdida de líquido intestinal producido por esta toxina Estudios realizados en modelos animales vinculan las PG con la patogénesis del cólera, ya que se han encontrado niveles aumentados de PGE- en el intestino de diferentes animales tratados con la TC (Beubler y col. 1989, Peterson y col . 1989 y 1994). Además, los pacientes de cólera tienen mayores valores de PGE₂ en la fase aguda de la enfermedad que en la de convalecencia (Speelman y col., 1985 y Qadri y col 2002) Se piensa que al aumentar los niveles de AMPc en las células intestinales por la acción de la TC. se activa una fosfolipasa que actúa sobre los fosfolípidos de la membrana produciéndose el ácido araquidónico, principal precursor de las PG las que a su vez pueden por sí mismas estimular la adenilato ciclase y activar corrientes de corto circuito en las células epiteliales (Kimberg y col 1971) lo cual amplifica significativamente la acción secretoria de la TC Por otra parte el SNE juega un papel importante en la secreción y la absorción del intestino al ser estimulado por hormonas y neuropéptidos producidos por células

especializadas de la mucosa intestinal Dos de estas sustancias han sido ampliamente relacionadas con el aumento de las secreciones el péptido vasoactivo intestinal (PVI) y la 5-hidroxitriptamida (serotonina) (Cooke. 1991). Niveles aumentados de serotonina se han detectado en el intestino de animales de laboratorio y en humanos que han sido estimulados con la TC (Mourad y col 1995 y Bearcroft y col 1996) Además, los pacientes de cólera tienen altos niveles de PVI en la sangre (Holmgren. 1992) La TC puede entonces actuar por dos vías 1- la serotonina inducida por esta toxina puede actuar directamente sobre el SNE para que se produzca el PVI. 2- La serotonina puede inducir la secreción de PG que alterarían por si mismas la secreción intestinal o activarían el SNE Los genes que codifican para la TC se encuentran dentro del genoma de un bacteriófago filamentoso denominado CTX ϕ , el cual a su vez está integrado en el cromosoma bacteriano Dicho bacteriófago puede también existir en forma replicativa desde donde se producen las partículas virales, que permiten diseminar los genes de la TC entre las diferentes cepas de *V. cholerae* (Waldor y Mekalanos. 1996 y Davis y Waldor. 2003). Las toxinas ZOT y ACE son también codificadas por genes del fago CTX ϕ (Baudry y col 1992 Trucksis y col 1993 y Waldor y Mekalanos 1996) Estas toxinas fueron identificadas buscando el factor(s) responsable(s) de los efectos adversos (reactogenicidad) encontrados en voluntarios inoculados oralmente con cepas vacunales vivas de *V. cholerae* a las cuales se les habían eliminado los genes *ctxA* y *ctxB* La ZOT afecta la estructura de las uniones estrechas de las células epiteliales y aumenta la permeabilidad del intestino delgado a macromoléculas (Fasano y col , 1991). Esta proteína también participa en la formación de las partículas del fago CTX ϕ (Waldor y Mekalanos. 1996) por lo que parece tener una actividad dual Se ha planteado que dichas actividades están separadas en la molécula La primera de ellas se localiza en la región amino terminal y la segunda, en la carboxilo terminal (Uzzau y col 1999 y Di Pierro y col 2001) Además, se ha demostrado que la ZOT tiene la capacidad de adyugar antígenos suministrados por la vía de las mucosas (Marinaro y col . 1999 y 2003) A diferencia de la ZOT los estudios sobre la ACE no han continuado ya que los bajos niveles producidos por *V. cholerae* no han permitido purificar la proteína. Sin embargo, recientemente la ACE fue expresada en *Pichia pastoris*

y purificada para estudiar su mecanismo de acción (Trucksis y col 1997) La función de esta proteína en el fago CTX ϕ no se conoce aún.

Existen un grupo de moléculas de la superficie de este microorganismo que están involucradas en la patogénesis del mismo El LPS es una de ellas y es la más abundante en la superficie de las bacterias Gram negativas no capsuladas siendo también llamado endotoxina bacteriana Existen evidencias que sugieren que el LPS esta involucrado en la adherencia de *V. cholerae* 01 y 0139 a la mucosa intestinal (Chitnis y col. 1982. Manning y col., 1986 y Nesper y col 2002) Sin embargo el papel más relevante de esta molécula en el cólera es el de estimular una potente respuesta inmune protectora, dada su capacidad de interactuar con varias de las células del sistema inmune de la mucosa intestinal aspecto que trataremos mas adelante

La TCP fue identificada como un factor de colonización que se expresaba en las mismas condiciones de cultivo que la TC (Taylor y col.. 1987) y es la única pilina de los vibriones 01 y 0139 a la cual se le ha demostrado su participación inequívoca en la colonización intestinal de *V cholerae* tanto en modelos animales como en humanos (Herrington y col , 1988, Thelin y col . 1996, Attndge y col 1996 y Tacket y col 1998) La TCP es un homopolímero de una proteína de 20 5 kDa denominada TcpA que esta codificada por el gen *tcpA*. el cual se encuentra en el cromosoma 1 de *V cholerae* dentro de una agrupación de genes relacionados con la formación de pilinas tipo IV (Faast y col , 1989 Shaw y Taylor. 1990 y Rhine y Taylor 1994) Además, se ha encontrado que el TcpA y algunas variantes de esta protema son producidas por cepas de *V cholerae* de los serogrupos no 01 y no 0139 (cepas no epidémicas), por lo que se piensa que dichas cepas pudieran adquirir los genes de la TC y así convertirse en toxigénicas (Said y col . 1995. Ghosh y col 1997 y Nandi y col. 2000). Lo anterior es posible ya que la TCP es el receptor específico del fago CTX ϕ en las cepas de *V cholerae* 01 y 0139 (Waldor y Mekalanos. 1996). Adicionalmente se ha demostrado que los genes que acompañan al gen *lcpA* en el genoma de *U cholerae* forman la isla patogénica de los vibrones (VPI), la que a su vez podría formar una partícula viral (VPIo) cuya envoltura es el TcpA (Karaolis y col 1999) Sin embargo, en estudios muy recientes no se ha podido demostrar la producción de partículas de VPk ϕ en varias cepas de *V chálеме* que portan variantes genéticas de la isla patogénica VPI

(Faruque y col 2003), por lo que este aspecto se mantiene en discusión actualmente. Otro factor muy estudiado es la MSHA, la cual se encuentra fundamentalmente en cepas de *V. cholerae* 01 y 0139 donde forma una pilina característica. Estudios de protección en animales sugirieron que la MSHA podía ser importante en la patogénesis de *V. cholerae* (Osek y col, 1992) más adelante esta pilina se postuló como un importante factor de colonización en los vibriones de biotipo El Tor y el serogrupo 0139 (Jonson y col. 1994). Sin embargo, cepas mutantes del gen *mshA* que codifica para la proteína MshA, subunidad estructural mayoritaria de esta pilina, no mostraron una pérdida del potencial de colonización en el modelo de ratón lactante (Thelin y col., 1996 y Attridge y col, 1996), ni en un estudio realizado en humanos (Tacket y col. 1998). Estos experimentos demostraron que la MSHA no es un factor de colonización en las cepas de *V. cholerae* 01 y 0139. No obstante, se ha sugerido la participación de esta pilina en la formación de bio-películas (biofilm) (Wattmck y col., 1999 y Wattmck y Kolter 1999) ya que la misma parece adherirse a los plancton (Chiavelli y col. 2001), sobre los cuales los vibriones pueden formar las estructuras de bio-película lo que permitiría aumentar la resistencia ambiental de este microorganismo. La MSHA es además el receptor del bacteriófago filamentoso 493 (Jouravleva y col 1998a y 1998b) y en nuestro grupo se ha demostrado que esta pilina es también el receptor del nuevo bacteriófago filamentoso VGJ ϕ , que infecta a *V. cholerae* (Campos y col 2003a) y que es capaz de transmitir eficientemente los genes de la toxina del cólera entre cepas de esta especie bacteriana (Campos y col. 2003b).

Existen otros factores de la superficie de este microorganismo que de alguna manera intervienen en el proceso de colonización, los cuales garantizan la adhesión a las células epiteliales, entre estos se encuentra la MFRHA, que ha sido implicada como un factor de virulencia, pero su papel en la colonización no ha sido aclarado aún. No obstante, en estudios realizados en el modelo del ratón lactante, se ha observado que una cepa mutante del gen que codifica para la actividad MFRHA tiene deficiencia en la colonización (Franzon y col. 1993). Por otra parte, algunas OMPs pueden también jugar un papel en la colonización, ya que se ha visto que anticuerpos específicos contra ellas inhiben la colonización intestinal de *V. cholerae* en el modelo de ratón lactante y se ha comprobado que la OMP de 77 kDa denominada IrgA cuya expresión es regulada por hierro, es importante en la

virulencia (Goldberg y col. 1990 y Sengupta y col, 1992) Además, se piensa que otra OMP. denominada OmpU, juega un papel importante en la adherencia de los vibriones a las células intestinales (Sperandio y col, 1995) El papel de otras OMP en la virulencia esta siendo estudiado (Faruque y col., 1998)

Ademas de la TC que es el principal factor de virulencia del microorganismo, existen otros factores segregados por las cepas de *V cholerae* que juegan papeles importantes en la patogenia de esta bacteria Uno de ellos es la HAP a la cual se le han adjudicado un grupo de funciones: la conocida actividad proteasa que escinde los peptidos A1 y A2 de la TC (Hase y col . 1991) y activa la HlyA producida por esta bacteria (Nagamune y col 1996); la de separar específicamente a los vibriones de la mucosa intestinal (Hase y col. 1991 y Finkelstein y col 1992) la de inactivar el fago CTXφ (Kimsey and Waldor 1998) y la capacidad de disminuir la resistencia transepitelial de las monocapas de células de la línea de epitelio intestinal T84 (Mel y col . 2000) Adicionalmente, se ha demostrado que la producción de esta proteasa es inducida en ambientes con limitaciones de nutrientes y es fuertemente inhibida por la glucosa (Benitez y col. 2001).

Otro factor soluble producido por este microorganismo es la HlyA la cual es segregada fundamentalmente por los vibriones de biotipo El Tor y cuyo gen demostró tener una alta homología entre las diferentes cepas de *V cholerae* (Brown and Manning 1985) Aún cuando esta actividad se ha empleado tradicionalmente para diferenciar las cepas clásicas y El Tor, los aislamientos de algunas cepas El Tor de la séptima pandemia no tienen actividad hemolítica (Barrett y Blake 1981) Esta proteína tiene una potente actividad citolítica en células de epitelio intestinal y se ha evidenciado que el daño celular ocurre por la formación de poros (Zitzer y col 1997) y vacuolas (Figueroa-Arredondo y col 2001) en la membrana de las células afectadas

En investigaciones recientes se han descubierto nuevas toxinas que tienen un efecto directo sobre las células epiteliales, como es el caso de la RTX (Lin y col, 1999 y Fullner y col 2001) así como nuevos factores que pueden regular la virulencia de este microorganismo, como es el caso del factor modulador de la patogenia (Zhang y col 2003)

Si analizamos de conjunto toda esta información, podremos comprender que un gran número de factores de virulencia de esta bacteria son capaces de interactuar

con las células epiteliales y del sistema inmune de la mucosa intestinal e inducir en ellas variadas respuestas

2. 3 Las células epiteliales y su expresión de mediadores inflamatorios.

Las células de los diferentes epitelios son las primeras en interactuar directamente con los microorganismos patógenos que llegan a las mucosas. Hace sólo algunos años se tenía la noción de que las células del epitelio intestinal tenían la función exclusiva de absorber los nutrientes y transportar electrolitos. Sin embargo se ha demostrado que las células de este epitelio pueden expresar citoquinas en respuesta a diversos microorganismos patógenos (Eckmann y col. 1993b y Kagnoff y Eckmann. 1997)

Se ha informado que como consecuencia de una invasión bacteriana o por la sola presencia del LPS bacteriano, las células epiteliales colónicas secretan grandes cantidades de IL-8 (Eckmann y col. 1993a y Shuerer-Maly y col. 1994). Además otros factores de virulencia de los microorganismos, como proteínas solubles, flagelos o toxinas bacterianas pueden inducir la expresión de IL-8 en estas células (Savkovic y col. 1996. Steiner y col. 2000 y Sanfilippo y col. 2000). También se sabe que en respuesta a la infección con bacterias invasivas, las células epiteliales del intestino humano pueden expresar otras citoquinas, tales como la MCP-1, el TNF- α , la IL-1 α y β y el GM-CSF (Reinecker y col. 1995. Jung y col. 1995 y Eckmann y col. 1995). Adicionalmente se ha visto, que las células epiteliales del colon humano producen el TGF- β 1 (Suemori y col. 1991 y Sanfilippo y col. 2000) así como que las bacterias enteroinvasivas activan la producción de NO en estas mismas células (Witthóft y col. 1998. Li y col., 1998). Las células de otros epitelios también expresan citoquinas por la interacción con los microorganismos. Así las células epiteliales de la mucosa cérvico-uterina producen la IL-1, la IL-8, la IL-6 y el GM-CSF en respuesta a la infección por *Chlamydia trachomatis* y *C. psittaci* (Rasmussen y col., 1997) y los queratinocitos expresan diferencialmente la IL-1, la IL-6 y la IL-8 al ser infectados por variantes del *Streptococcus pyogenes* (Wang y col. 1997), por sólo citar dos ejemplos.

Adicionalmente, las células epiteliales pueden funcionar como células presentadoras de antígenos ya que expresan las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), cooperando con los linfocitos T intraepiteliales (LTie) así como con los de la lámina propia y los folículos linfoides (Sanz 2001) Se ha demostrado que el IFN- γ aumenta la expresión específica de la proteína CD1d un posible ligando de los LTie en las células intestinales (Colgan y col. 1996) así como que las células de la línea HT29 que expresan las moléculas MHC-II estimulan la producción del TNF- α y el IFN- γ en los LTie (Chen y col 1996).

Todas estas observaciones apuntan hacia un importante papel de las células epiteliales como primera línea de defensa mucosal del hospedero ya que sirven como sensores de las infecciones bacterianas y producen señales que estimulan a las células de la inmunidad innata y adaptativa

2.4 Respuesta inmune e inflamación.

Dentro de los mecanismos inmunológicos que permiten combatir las infecciones se encuentran la inmunidad innata y la adaptativa. En ambas se activan un grupo de células efectoras que producen diferentes biomoléculas mediadoras de la respuesta inmune. Muchas de estas células efectoras y los mediadores producidos por ellas tienen la capacidad de eliminar microorganismos patógenos del TGI humano, lo que amplifica la función de barrera de la mucosa intestinal. La adherencia de los microorganismos a la superficie mucosal es un paso crítico en la colonización; por tanto, la inhibición de la colonización por sustancias con actividad bactericida y la presencia de anticuerpos específicos de la clase IgA son fundamentales en la protección de las mucosas. El ciclo de las células productoras de IgA se inicia en las placas de Peyer. Estas zonas de la mucosa están cubiertas por una capa de células epiteliales especializadas (células M) que son reconocidas por sus importantes funciones inmunológicas. Las células M capturan los antígenos en el lumen intestinal y los transportan de forma intacta hacia el interior de las placas de Peyer donde abundan las células presentadoras de antígenos tales como células dendríticas y macrófagos. Estas captan el antígeno y lo procesan para posteriormente presentárselo a los linfocitos T vía Th3 para así

estimular la proliferación y diferenciación parcial de células B productoras de IgA (Sanz, 2001) Posteriormente, estos linfocitos B pasan a los nodulos linfoides mesentéricos regionales, siendo transportados a través del conducto torácico a la circulación sanguínea de donde regresan al tejido mucosal para sufrir su diferenciación final (Mowat y Vmey. 1997 y Charles y col . 2001). La IgA producida a este nivel se une a un receptor poliglobulinico presente en la membrana basal de las células epiteliales, es internalizada y transportada a su extremo luminal donde finalmente es fragmentado el receptor, dando lugar a la IgA₂ o IgA secretora (IgAs) (Charles y col. 2001)

La IgAs generada contra las moléculas de las superficies microbianas han demostrado que impiden la adherencia de los microorganismos al TGI (Svennerholm y col 1989) Los anticuerpos del isotipo IgA₂ son capaces, además de neutralizar enzimas y toxinas, ya sea mediante el bloqueo de su interacción con los sustratos

o por la inducción de cambios conformacionales en las moléculas que afectan sus funciones biológicas Por lo anterior, la IgAs ejerce su función protectora a travez de una acción antibacteriana y/o antitóxica (Svennerholm y col 1994 y Holmgren y col 1993) Por otra parte se ha visto que la IgAs se unen específicamente a las pilinas bacterianas con grupos manosa en su estructura (Wold y col 1990). lo que aumenta la capacidad de esta inmunoglobulina para aglutinar bacterias con la consiguiente disminución de su adherencia a las mucosas

V cholerae coloniza el intestino humano para luego ponerse en contacto con las células M del TGI. lo que constituye un potente estímulo para el sistema inmune de mucosa El colera produce una potente respuesta inmune mucosal y sistémica contra el LPS bacteriano y la TC. así como contra otros componentes de la superficie del microorganismo Esto resulta en una larga protección contra la enfermedad (Glass y col 1983. Jertborn y col . 1986 y Qadn y col . 1997a y 1997b) Atendiendo a la patogenia de esta afección la bacteria no penetra más allá del epitelio intestinal durante la infección, por lo que la inmunidad protectora contra el colera depende fundamentalmente de los mecanismos preventivos contra la colonización basados en la IgAs Sin embargo, se ha observado que esta enfermedad produce altos títulos de anticuerpos de tipo IgG en sangre contra la TC y el LPS (Oadn y col 1999) lo que ha llevado a pensar que esta clase de inmunoglobulina puede jugar un papel en la protección a nivel de mucosa, ya que

se le ha encontrado con frecuencia en la bilis y en los fluidos intestinales (Jelonek y col , 1993 y Pngent-Delecourt y col.. 1995) Además, se ha demostrado que la IgG es capaz de mactivar un inoculo de *V cholerae* en la mucosa intestinal fSzu y col . 1994 Robbins y col, 1995. Bougoudogo y col, 1995). La infección con *V cholerae* produce una protección de al menos tres años en personas convalecientes de la enfermedad (Kaper y Levine, 1990) e induce una respuesta de anticuerpos vibriocidas en sangre, los cuales están dirigidos contra los antígenos somáticos O de la bacteria (Gras y col 1983 y Qadri y col . 1995). Estos últimos sirven de patrón para la búsqueda de una vacuna efectiva contra el cólera ya que existe una estrecha correlación entre el titulo de anticuerpos vibriocidas sericos y la protección (Glass y col 1983 y Wasserman y col.. 1994).

La inflamación es parte de la respuesta inmune innata y se caracteriza por producir dolor, enrojecimiento, aumento de la temperatura e hinchazón en los tejidos infectados lo que refleja tres cambios fundamentales en los vasos sanguíneos que irrigan estos tejidos En primer lugar se produce un incremento en el diámetro de los vasos sanguíneos, lo que aumenta la irrigación local de sangre y disminuye la velocidad de su flujo en los vasos, de ahí que aumente la temperatura y ocurra un enrojecimiento en la zona de la infección En segundo lugar, las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos expresan moléculas de adhesión específicas que atrapan a los leucocitos, monocitos y linfocitos circulantes y promueven su migración hacia el tejido infectado Por último ocurre un aumento de la permeabilidad vascular con el consiguiente incremento de la salida de liquido células y proteínas de los vasos y su acumulación en las zonas infectadas, lo que produce el dolor y la hinchazón en los procesos inflamatorios Todos los cambios que ocurren en los vasos sanguíneos durante una respuesta inflamatoria son inducidos por un grupo de mediadores y atocinas producidas por las células epiteliales y los macrófagos al enfrentarse con los microorganismos Los mediadores y atocinas que participan en el establecimiento y amplificación de los procesos inflamatorios son llamados de manera general, mediadores y atocinas inflamatorias

Tradicionalmente se ha considerado que la infección con *V cholerae* no produce una respuesta inflamatoria en el TGI humano Sin embargo, el incremento de macrófagos y la presencia de neutrofilos en la mucosa intestinal de los pacientes con

cólera severo han hecho pensar en la participación de un proceso inflamatorio en la enfermedad (Mathan y col. 1995 y Qadri y col 2002 y 2004) Se sabe además que estos pacientes tienen más nitritos y nitratos, metabolitos estables del NO. en el suero, que los individuos sanos o que ellos mismos en la fase de convalecencia de la enfermedad (Janoff y col., 1997 y Qadri y col , 2002) De igual forma los pacientes de cólera severo tienen niveles elevados de superóxido dismutasa en el suero y de mieloperoxidasa en la mucosa intestinal y las heces (Qadri y col 2002 y 2004). lo cual sugiere que el estrés oxidativo puede jugar un papel importante en los mecanismos de defensa innata de los humanos contra el cólera Otro aspecto que apunta hacia la participación de una respuesta inflamatoria en la enfermedad, es el hecho de que los individuos infectados con *V cholerae* 01 y 0139 tienen un incremento del TNF- α , la α -defensina y la eotaxina en la mucosa del intestino delgado, durante la fase aguda de la enfermedad (Qadri y col 2004)

La presencia de IL-8 en las heces de los voluntarios inoculados oralmente con cepas toxigénicas de *V cholerae* y de lactoferrina en las heces de pacientes con cólera clínico o experimental (Silva y col. 1996 y Qadri y col 2002) son también evidencias de la participación de un proceso inflamatorio en el cólera No obstante debemos señalar que los niveles de IL-8 y lactoferrina en las heces de voluntarios inoculados con cepas toxigénicas de *V cholerae* 01 y 0139 fueron mucho menores que los inducidos por la cepa vacunal reactogénica CVD110 (Silva y col 1996) Lo anterior llevó a estos investigadores a sugerir que algún factor presente en las cepas virulentas y ausente en las cepas vacunales, podría ser el responsable de regular la respuesta inflamatoria en los voluntarios que recibieron las cepas toxigénicas de *V cholerae* La IL-8 es un potente quimioatrayente de neutrófilos y linfocitos T (Oppenheim y col 1991 y Eckmann y col . 1993a) Los primeros producen considerables niveles de lactoferrina en sus granulos secundarios (Sánchez y col 1992) por lo que dicha proteína es considerada un marcador de la presencia de neutrófilos en los tejidos (Guerrant y col . 1992) Además, se sabe que la lactoferrina tiene un efecto bactericida sobre varios microorganismos, incluido *V cholerae* (Arnold y col 1980)

Por todo lo anterior queda clara la participación de un proceso inflamatorio en el cólera Pero la presencia de células y mediadores inflamatorios, así como los da-

ños histológicos producidos en la mucosa intestinal de los enfermos de cólera son menores que los observados en pacientes infectados por *Shigella* (Ragib y col . 2000) o *Vibrio parahaemolyticus* (Qadri y col 2003). Estos microorganismos producen diarreas en los individuos infectados, con una alta presencia de células y mediadores inflamatorios en la mucosa intestinal y daños histopatológicos de moderados a severos del TGI, que están ausentes en los pacientes de cólera. Adicionalmente, se ha reconocido que el proceso inflamatorio de los pacientes con cólera clínico es de bajo grado y debe ser útil fundamentalmente para disminuir la cantidad de vibriones en el intestino y para ayudar al establecimiento de la respuesta inmune adaptativa contra *V cholerae* (Qadri y col 2002 y 2004)

2. 5 Toxina del cólera e inmunomodulación.

La TC es uno de los inmunógenos orales más potentes que existen (Lycke y Holmgren. 1986), siendo también capaz de aumentar la respuesta inmune a antígenos que sean suministrados junto con ella (Holmgren y col. 1993.) La TCB y la subunidad B de la toxina termolabil de *Escherichia coli* tienen propiedades adyuvantes posiblemente por su capacidad de unirse específicamente al GM-1 (Francis y col 1992. Ong y col. 2003 y Albu y col., 2003). Sin embargo, esta propiedad es mayor para la TC dada su actividad ADP-ribosil transferasa (Lycke y col 1992 y Bagley y col . 2002).

La TC produce variados efectos en las células del sistema inmune. Se ha demostrado que esta toxina induce una respuesta de células T del tipo Th2 y posiblemente Th3 que se caracteriza por la producción de las citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 y las inmunoglobulinas IgG 1, IgA e IgE (Xu-Amano y col . 1994 y Marinaro y col 1995). Además, se sabe que la TC inhibe la proliferación y la producción de citocinas activadoras de las células del tipo Th1 (Muñoz y col . 1990) y se piensa que esto ocurre fundamentalmente por la inhibición que la TC ejerce sobre la producción de citocinas inflamatorias tales como la IL-1, IL-12 y el $IL-1\alpha$ en los monocitos que derivan en células dendríticas (MDCD) (Braun y col 1999, Gagliardi y col 2000, Martin y col 2001 y Bagley y col, 2002) y por su inhibición sobre la expresión de los receptores de superficie de la IL-12 en las

células T inmaduras (Braun y col 1999). La TC además, estimula la maduración de los MDCC de ratones a células dendríticas (CD) productoras de IL-4 en presencia del IFN- γ o del TNF- α , las que a su vez promueven la proliferación de células del tipo Th2 (De Jong y col . 2002) Muy recientemente se ha demostrado que esta toxina también induce la migración de las CD desde la región subepitelial hacia las áreas ricas en linfocitos T y B de las placas de Peyer (Shreedhar y col . 2003). Todas estas actividades de la TC sobre las células del sistema inmune inhiben la amplificación de un proceso inflamatorio y promueven el establecimiento de una respuesta del tipo Th2

Aun cuando el patrón de atocinas que induce la TC en las células inmunocompetentes ha sido ampliamente estudiado, poco se conoce de la inducción de citocinas en células de epitelio intestinal expuestas a la TC No obstante se ha demostrado que esta toxina induce la producción de la IL-6 en células de epitelio intestinal de ratas (McGee y col 1993) una citocina reconocida como proinflamatoria pero que puede ejercer un efecto anti-inflamatorio ya que es capaz de inhibir la respuesta Th1 en varios sistemas (Barton. 1997). Además se ha informado que la TC induce la producción de la IL-6, la IL-10 una atocina anti-inflamatoria, y del receptor de la IL-1 α una importante molécula anti-inflamatoria en una línea de epitelio intestinal humano (Soriam y col 2002) Todas estas acciones de la TC sobre las células epiteliales fueron dependientes de la actividad ADP-ribosil transferasa de esta toxina y evidencian que la misma induce un patrón de atocinas que puede crear un ambiente anti-inflamatorio en la mucosa intestinal

2.6 Vacunas contra el cólera y reactogenicidad.

El hecho de que las personas expuestas a una infección con *V. cholerae*, después de su convalecencia, raramente vuelven a contraer la enfermedad apunta a la posibilidad de desarrollar vacunas vivas efectivas contra este patógeno humano Mas de cien años enlazan la primera vacuna (viva, parenteral) contra el cólera utilizada en ensayos clínicos en 1885 y los ensayos de los candidatos vacunales actuales Durante todo este tiempo se han realizado grandes esfuerzos para el

desarrollo de una vacuna eficaz contra esta enfermedad, que continúa siendo un gran problema de salud en países subdesarrollados Para sólo poner un ejemplo en la primavera del 2002, en Bangladesh se informaron más de 30 000 casos de colera y en el resto de las áreas endémicas del mundo se informaron brotes anuales de la enfermedad (Sack y col, 2004)

Diferentes autores coinciden en señalar que la vacuna ideal contra el cólera debe inducir una alta y prolongada protección a los pocos días de aplicada y que dicha aplicación debe ser única y oral por ser *V. cholerae* una enterobacteria Además, esta vacuna debe ejercer una estimulación óptima del sistema inmune de la mucosa intestinal sin producir efectos adversos en los vacunados, así como debe tener el menor impacto ambiental posible (Mekalanos y col 1995). Más aun debe proteger a todos los grupos humanos incluyendo a niños pequeños y a individuos que tienen grupo sanguíneo O (un factor de riesgo para el colera gravis Kaper y col 1994) Hasta hoy. no se cuenta con una vacuna totalmente efectiva contra esta devastadora enfermedad, pero existen tres vacunas de colera disponibles comercialmente (Calderwood y Edward 2000):

1- Vacuna parenteral de vibriones inactivados con fenol, la cual consiste en 10^9 organismos de esta bacteria, de los biotipos clásicos y El Tor y los serotipos Inaba y Ogawa Esta vacuna fue efectiva durante seis meses en aproximadamente el 50% de los individuos inoculados cuando los mismos fueron retados con una cepa virulenta de *V cholerae* 01 Esta vacuna no protegió contra el colera causado por el serogrupo emergente 0139 y presento una alta incidencia de efectos adversos (Levine y col. 1992) Por estas razones esta vacuna parenteral. licenciada en los Estados Unidos, tiene un empleo muy limitado y la OMS no recomienda su uso

2- Vacuna de células muertas suplementada con la TCB la cual contiene 1 mg de TCB y 10^7 organismos muertos por tratamiento con formalina o calor, de *V choreare* 01 de los biotipos clásico y El Tor y los serotipos Inaba y Ogawa Esta vacuna es aplicada oralmente en 2 dosis, la segunda de ellas ha sido administrada a los voluntarios entre los 7 y los 42 días posteriores a la primera inoculación fue probada en Bangladesh (Clemens y col 1986 y Clemens y col. 1990). donde mostró un 85 % de eficacia en los primeros 6 meses del estudio Su eficacia disminuyo a un 62% y un 50% a los 12 y 36 meses del ensayo respectivamente

Además, estos estudios revelaron que en los primeros 6 meses la protección fue igualmente alta para los niños de todas las edades y no se observaron efectos adversos en los vacunados. Sin embargo, la eficacia decreció significativamente a los 36 meses para niños de 2 a 5 años (26%). Si se compara con el resto de los individuos mayores de 5 años (63%) (Clemens y col, 1990). Por otra parte, a los tres años de la última inmunización este preparado vacunal sólo protegió a un 39% y un 58% de los individuos contra la infección por *V. Cholerae* de los biotipos El Tor y clásico, respectivamente, así como mostró un efecto protector menor en individuos del grupo sanguíneo O. Esta vacuna presenta como principales dificultades la poca protección que ofrece en niños menores de 5 años y la relativa corta duración de su protección.

3- Vacuna viva atenuada genéticamente. Recientemente se han construido diferentes cepas vacunales vivas utilizando técnicas recombinantes. Entre ellas la JBK70 y la CVD103-HgR generadas en el centro de desarrollo de vacunas en Baltimore EUA. La primera proviene de la cepa toxigénica N16961. No posee genes ni para TCA ni para TCB y aunque brindó una elevada protección contra el reto con una cepa epidémica, indujo una alta reactividad en los vacunados (Devine y col. 1988a). Un aspecto interesante derivado del ensayo con la JBK70 fue la sólida protección alcanzada en ausencia de anticuerpos antitoxina, lo que evidencia que los anticuerpos protectores en esta enfermedad son fundamentalmente contra la bacteria. La segunda, CVD103-HgR, es la única vacuna viva contra el cólera que se comercializa actualmente y se construyó a partir de la cepa clásica 569B por delección del gen que codifica para TCA. Posteriormente, se insertó como marcador un gen de resistencia al mercurio en el locus *hlyA*. Esta cepa ha sido intensamente investigada en ensayos controlados en voluntarios y resultó tener muy pocos efectos adversos al emplearse en una dosis única de 10^8 - 10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) por voluntario. Además, presentó altos niveles de protección (94%-100%) contra las diarreas severas o moderadas producidas por una cepa toxigénica en voluntarios americanos e indujo altos títulos de anticuerpos vibriocidas en el 92% de los vacunados (Levine y col., 1988b; Levine y col. 1993; Tacket y col. 1999). Sin embargo, esta protección no fue igual para las cepas clásicas (82%-100%) que para las cepas El Tor (62%-80%) con independencia del serotipo de la cepa virulenta empleada (Levine y col., 1993; Le-

vine y col. 1994. y Lososky y col , 1996) Por otra parte, no se obtuvieron los mismos resultados al evaluar esta vacuna en 65000 voluntarios de Indonesia donde sólo el 70% de los vacunados desarrollaron una seroconversión de anticuerpos vibriocidas y la incidencia de casos de cólera aunque muy baja para esta zona geográfica, resultó igual para los placebos que para los vacunados (Richie y col . 2000) Teniendo en cuenta lo anterior, esta vacuna presenta como principal dificultad la poca protección que ofrece contra las cepas del biotipo predominante en las zonas endémicas y epidémicas (biotipo El Tor) Además se requieren múltiples dosis para lograr una buena respuesta inmune debido a su pobre capacidad de colonización, heredada de su cepa parental

Como se señala anteriormente, ninguna de las vacunas disponibles comercialmente son capaces de conferir una duradera protección contra el biotipo El Tor. predominante en las epidemias actuales, ni contra el serogrupo emergente 0139 Por lo tanto, varios grupos de trabajo han desarrollado nuevos candidatos vacunales de diferentes tipos, entre los que se encuentran una variante mejorada de bacterias muertas que combina *V cholerae* 01 y 0139 en diferentes presentaciones (Jertborn y col 1996 y Trach y col. 1997 y 2002) una vacuna parenteral del antígeno O del LPS bacteriano conjugado con diferentes proteínas del microorganismo (Gupta y col 1998) y varios candidatos vacunales vivos de *V cholerae* 01 del biotipo El Tor y el serogrupo 0139 (Levine y col. 1993. Pearson y col 1993 y Taylor y col 1999) De todos ellos los candidatos vacunales vivos siguen siendo los más promisorios para lograr una eficaz y duradera protección contra el colera, así como para ser empleados como vectores de expresión para presentar antígenos foráneos en la superficie de la mucosa intestinal (Ryan y col . 1999 y 2000). Nuestro país también ha llevado a cabo un conjunto de investigaciones con el objetivo de desarrollar una vacuna eficaz contra el colera y de ha trabajado fundamentalmente con la variante de vacunas atenuadas por ingeniería genética Como resultado de estas investigaciones, se obtuvo una primera generación de cepas vacunales, las cuales presentan como genotipo relevante la delección de todos los genes del profago CTXo (Benítez y col . 1996) Entre estas cepas se encuentran la 81 y la 413 Las cepas 638 y 1333 se obtuvieron a partir de la 81 y la 413 respectivamente por la interrupción del gen *hap* que codifica para HAP con un gen marcador que codifica para la endoglucanasa A de *Clostridium ther-*

mocellum, la cual tiene actividad celulolítica (Robert y col . 1996). Con esta misma metodología se han obtenido varios candidatos vacunales 0139 (Ledón y col 2003) Las cepas vacunales 81, 413, 638 y 1333 fueron ensayadas en diferentes modelos animales y demostraron que están efectivamente atenuadas y que estimulan una respuesta inmune (Cedré y col ,1998 y García y col . 1998). Estas cepas vacunales tienen que ser evaluadas en ensayos controlados en humanos para conocer si producen efectos adversos y si estimulan una respuesta inmune adecuada, así como se deberá evaluar la eficacia protectora de ellas en estudios de reto con una cepa virulenta de *V cholerae*

Las vacunas vivas tienen dos desventajas fundamentales a) el impacto ambiental que producen estas cepas al ser excretadas por los voluntarios que son inoculados por vía oral, con el consiguiente riesgo de readquirir los genes de la toxina del colera y convertirse en toxigénicas (Waldor y Mekalanos. 1996 y Davis y Waldor 2003) y b) el desarrollo de reacciones adversas en los individuos inmunizados Muchos de los candidatos vacunales vivos contra el cólera han producido "reactogenicidad" en los voluntarios, termino usado para denotar cepas que producen diferentes efectos adversos, tales como diarrea vómito, fiebre, dolor de cabeza dolor abdominal, meteorismo acidez y malestar general Pero es la diarrea el mas frecuente y severo de todos estos efectos adversos, por lo que ella define la reactogenicidad de los candidatos vacunales contra el cólera (Levine y col . 1988a Tacket y col . 1993 y Taylor y col 1994). Las bases moleculares de la reactogenicidad no están claras, pero hay algunas evidencias que apuntan hacia el desarrollo de una respuesta inflamatoria en la mucosa intestinal Mekalanos y col en 1995 fueron los primeros en sugerir una posible respuesta inflamatoria local basados en la significativa diferencia de reactogenicidad observada en los voluntarios que fueron inoculados con cepas vacunales motiles y no mótiles sin que se observara una diferencia en la inducción de la respuesta inmune sistémica entre los dos tipos de cepas vacunales (Coster y col . 1995 y Kenner y col 1995) Entonces, estos investigadores sugirieron que la reactogenicidad podría estar dada por un proceso inflamatorio local dado el estrecho contacto entre las cepas vacunales de *V cholerae* y las células epiteliales Para ello tomaron en cuenta que las células epiteliales están cubiertas por una capa de mucus que dificulta la llegada de los vibriones no motiles hasta la superficie del

epitelio, hecho que disminuye la interacción bacteria/célula epitelial y por tanto la inducción de una respuesta de citocinas proinflamatorias. Por otra parte, la similar respuesta inmune presentada por los voluntarios vacunados con ambos tipos de cepas podría deberse a que las células M. que están cubiertas por una capa menos gruesa de mucus no ofrecen la misma resistencia a la llegada de los vibriones no móviles a ellas (Mekalanos y col., 1995). Por este motivo, estas cepas y sus componentes son transportados a la zona subepitelial en la misma magnitud que las cepas móviles para ser enfrentadas a las células presentadoras de antígenos de las placas de Peyer.

Las primeras evidencias experimentales de la hipótesis inflamatoria se tuvieron con la inmunización por vía oral de voluntarios con la cepa CVD110 (reactogénica) la cual produjo grandes cantidades de lactoferrina y un incremento de IL-8 en las heces de los voluntarios vacunados, mientras que la cepa CVD103-HgR (no reactogénica) solo indujo niveles discretos de estos mediadores inflamatorios (Silva y col., 1996). Lo anterior apunta hacia un componente inflamatorio en la reactogenicidad producida por los candidatos vacunales vivos de *V. cholerae*. Por otra parte se piensa que la reactogenicidad debe ser causada por uno o varios factores reactogénicos producidos por los vibriones. Se ha postulado que las toxinas accesorias de este microorganismo, como son la HylA, la HAP y la RTX pudieran participar en la producción de efectos adversos en los voluntarios inoculados con las cepas vacunales vivas de cólera. Esta idea se basa, en que a todas estas toxinas se les han demostrado acciones específicas sobre las células del epitelio intestinal *in vitro* (Fullner, 2003) que pudieran contribuir a la reactogenicidad por mecanismos inflamatorios u otros mecanismos. Teniendo en cuenta que uno de los dos peores atributos de las vacunas vivas ha sido la reactogenicidad, el conocimiento de los mecanismos y los factores involucrados en los procesos reactogénicos deben influir en el desarrollo de mejores candidatos vacunales.

3- Materiales y métodos.

3.1 Cepas cultivos celulares.

Las cepas de *V cholerae* utilizadas en estos trabajos aparecen en la Tabla 1 Las cepas vacunales muertas por tratamiento térmico conservaron su morfología celular y la integridad de sus antígenos superficiales más importantes (Gemma Año y Arturo Talavera Instituto Finlay. comunicación personal, 2003) Se emplearon dos líneas celulares en los experimentos La primera fue la HT29-18N2 un clon derivado de la línea HT29 (adenocarcinoma de epitelio intestinal humano. ATCC HTB-38) donada por el Dr. Tom E Phillips del Departamento de Microbiología Molecular e Inmunología de la Universidad de Missouri. Columbia EUA La línea de macrófagos munnos J774.A2 (ATCC. HB-197) fue donada por el Dr Rene Delgado del Departamento de Farmacología del Centro de Química Farmacéutica. La Habana. Cuba Antes de la experimentación las células fueron mantenidas en medio Dulbecco modificado (catalogo D-6171) para la HT29-18N2 y RPMI (catalogo R-8005) para la J774 A2 y suplementados con suero fetal bovino al 10%. penicilina estreptomina (100 µg/mL y 100 µg/mL respectivamente) y fungizona (2 5 µg/mL) denominados en lo adelante medios completos Las líneas celulares fueron siempre incubadas en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C Los medios y todos los suplementos fueron suministrados por SIGMA (St Louis. MO EUA)

TABLA 1 Cepas de *Vibrio cholerae* usadas en los experimentos

Cepas	Genotipo y fenotipo relevante
C7258 ¹	Cepa salvaje toxigénica, 01. El Tor, Ogawa. de Perú
81	Mutante \CTXφ. 01 El Tor. Ogawa, de C7258
638	Mutante hap celA de 81
C6706 ¹	Cepa salvaje toxigénica, 01 El Tor, Inaba. de Perú
413	Mutante \CTXφ 01 El Tor, Inaba. de C6706
CVD103HgR	Mutante \ctxA), hlyA mer 01. clásica. Inaba. de 569B
.JBK70 ²	Mutante \ (ctxA ctxB). 01, El Tor, Inaba. de N16961

¹Donadas por el profesor Richard Finkelstein del Departamento de Microbiología Molecular e Inmunología de la Universidad de Missouri. EUA

²Donadas por el profesor James B Kaper del Centro de Desarrollo de Vacunas de Baltimore. EUA.

3.2 Reactivos empleados y preparación del LPS de *V cholerae*.

La TC, el L-NMMA, el FMA, la IL-1 humana, el IFN- γ humano. TNF- α humano y el GM-1 fueron suministrados por SIGMA (St Louis, MO. EUA) El AcM murino 4G1E5 fue obtenido en nuestro laboratorio y reconoce la subunidad B de la TC (Benitez y col . 1996)

La cepa salvaje de *V cholerae* 01. El Tor Ogawa. C7258 fue empleada para purificar el LPS Se utilizó la metodología tradicional (Westphal y Jann. 1965). Las células fueron tratadas con una mezcla de fenol y agua, luego la fase acuosa fue dializada contra una solución de NaCl tamponada con fosfatos. pH 7.4 (SSTF) y el LPS fue recobrado por precipitación con etanol Mas tarde, éste fue tratado con las enzimas proteinasa K. desoxirribonucleasa y ribonucleasa para eliminar las proteínas y los ácidos nucleicos contaminantes Su pureza fue determinada por electroforesis en un gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio y tinción con nitrato de plata Finalmente la concentración del LPS fue determinada por un método colorimétrico (Dubois y col . 1956) Se tomaron 0.2 mL de la solución de LPS y se le añadió igual volumen de una solución de fenol 5% Luego se adiciono 1mL de ácido sulfúrico 98% y se incubo durante 10 minutos a 25 C Al finalizar la incubación se leyó la reacción a 490 nm y se calculó la concentración empleando la formula $D.O_{490nm} \times \text{pendiente de la curva patrón} \times \text{dilución}$ La curva patrón fue una solución de glucosa en el rango de 10-60 $\mu\text{g mL}^{-1}$

3.3 Preparación de los inoeulos bacterianos para la línea HT29-I8N2.

Para enfrentar las células epiteliales con las diferentes cepas vacunales de *V. cholerae* se emplearon siempre placas estériles de 6 pozos (Costar Laboratories Cambridge Mass. EUA) y se prepararon los inóculos bacterianos para los diferentes experimentos según Benitez y col. (1997) Para ello, se emplearon placas de medio Luria-Bertam con agar (LBA Oxoid. UK). donde fueron sembradas las cepas de *V cholerae* en forma de estrías semiconfluentes a lo largo de toda la placa y se incubaron a 37°C durante toda la noche Luego el crecimiento bacteriano fue recogido en 5 ml de medio de Dulbecco y a partir de esas suspensiones celulares se prepararon diluciones 1/1000 de cada cepa Las concentraciones de los vibriones en los moculos fueron determinadas por el método de diluciones senadas en SSTF estéril y siembra de gotas de 10 μL por duplicado en placas con LBA y se expresan en UFC

3. 4 Experimentos de adherencia Vitalidad celular.

Los experimentos de adherencia se realizaron con las 7 cepas de *V. cholerae* y consistieron en determinar la cantidad de bacterias adheridas a las células epiteliales a las 0, 5, 2, 4, y 8 horas posteriores a la inoculación. Para ello se realizó el siguiente protocolo de trabajo. Para cada cepa se tomaron dos pozos de cultivo de células epiteliales crecidos a confluencia a los cuales se les había cambiado el medio completo por medio sin suero fetal bovino y sin antibióticos, 24 horas antes del experimento. Cada pozo fue inoculado con 2 mL de la cepa correspondiente, luego se incubaron durante 30 minutos a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Seguidamente se retiraron los sobrenadantes de cultivo y los pozos se lavaron tres veces con SSTF estéril para eliminar las bacterias no adheridas a las células epiteliales, se les añadió medio fresco y se incubaron bajo las mismas condiciones durante siete horas y media más.

Una vez concluido cada tiempo de incubación, se retiraron los sobrenadantes y se lavaron los pozos 2 veces con SSTF estéril para luego adicionar una solución de SSTF con Tritón X-100 al 1% para lisar las células HT29-18N2. Las placas se agitaron en una zaranda por 30 minutos a 25°C, la suspensión resultante fue homogeneizada por repetidos pipeteos en los pozos y la concentración de vibriones presentes en dichas suspensiones fue determinada por diluciones seriadas en SSTF estéril y siembra de gotas de 10 µL por duplicado en placas con LBA. La vitalidad de las células de la línea HT29-18N2 fue evaluada por el método de tinción por exclusión con el colorante Azul de Trypan y conteo en un hemocitómetro de Neubauer. Los conteos se hicieron en dos pozos independientes que contenían las cepas de *V. cholerae* y se tomaron dos pozos sin bacterias como control de la máxima vitalidad de las células epiteliales. Las determinaciones se hicieron al comienzo y a las 8 horas después de haber inoculado cada cepa de *V. cholerae* para calcular el número de células totales y de células vivas en ambos tiempos y entonces determinar los % de vitalidad.

3. 5 Experimentos de inducción de mediadores inflamatorios en las líneas celulares HT29-I8N2 y J774.A2.

3. 5.1 Línea celular de epitelio intestinal humano HT29-I8N2.

Cepas vacunales vivas de *V. cholerae*.

Para determinar la producción de mediadores inflamatorios por las células epiteliales expuestas a las cepas vacunales vivas o muertas de *V. cholerae* se realizaron tres experimentos independientes con duplicados en cada uno. Las células epiteliales sin estimular fueron empleadas como control negativo de la producción de los mediadores estudiados.

El objetivo fue saber si las cepas candidatas vacunales de *V. cholerae* inducían una respuesta de ARNm de la IL-1 α , la IL-8, el TNF- α , la MCP-1, el GM-CSF, el TGF- β 1 y de la iNOS en el tiempo y si la misma es diferente para las cepas reactivogénicas y no reactivogénicas. También se amplificó el ARNm de la proteína de expresión constitutiva β -actina como control de los niveles de concentración de los ARN totales de partida. En estos experimentos se siguió el mismo protocolo que en los de adherencia y se prepararon los inóculos de la forma descrita anteriormente. La diferencia consistió en que los sobrenadantes de los cultivos a las 8 horas después de inoculadas las cepas vacunales, fueron centrifugados a 13000 x g durante 15 minutos en una centrifuga de tubos eppendorf (Eppendorf, Alemania) y guardados a -20°C con el objetivo de detectar la presencia de mediadores inflamatorios en ellos. Además, luego del lavado de los pozos con SSTF estéril en cada tiempo de toma de muestra se añadió una solución de extracción de ARN en lugar de la solución SSTF con Tritón X-100.

Cepas vacunales muertas de *V. cholerae*.

Las cepas vacunales muertas se añadieron a los cultivos de HT29-I8N2 en una concentración aproximada de 10 UFC/mL y se incubaron durante 8 horas a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂, sin realizar el paso de extracción y lavado que se le hace a cada cepa viva a los 30 minutos después de su inoculación. Al igual que con las cepas vacunales vivas se purificó ARN total de las células epiteliales a las 0, 5, 2, 4 y 8 horas de incubación con los vibriones, para detectar la expresión.

si3n de ARNm de las citocinas IL-8, TNF- α y GM-CSF y se tom3 sobrenadante de los cultivos a las 8 horas para evaluar la presencia de dichas atocinas

Cepas vacunales vivas con aditamentos tipo Transwell.

En los experimentos con aditamentos tipo Transwell se emplearon dispositivos de 24 nm de diámetro con una membrana de 0.1 μm de tamaío de poro (Costar Laboratories, Cambridge, Mass. EUA). para impedir el contacto directo de los vibriones con las células epiteliales Los aditamentos se colocaron dentro de los pozos que contenían las monocapas de células HT29-18N2 adheridas en el fondo se les ańadi3 1 mL de medio Dulbecco fresco y se dejaron incubar por 1 hora a 37°C en atmosfera de 5% de CO₂ Seguidamente las cepas vacunales reacto- genicas vivas fueron inoculadas dentro de los aditamentos a una concentraci3n aproximada de 10⁷ UFC mL⁻¹ y se dejaron crecer durante 8 horas a 37 C en atmosfera de 5% de CO. Al igual que en los experimentos anteriores se purific3 ARN total de las células epiteliales a las 0.5. 2. 4 y 8 horas de incubaci3n con las cepas vacunales, para detectar la expresi3n de ARNm de las atocinas IL-8 TNF- α y GM-CSF y se tom3 sobrenadante de los cultivos a las 8 horas para evaluar la presencia de dichas atocinas en ellos

Extracci3n de ARN.

Se extrajo ARN total luego de enfrentar las células epiteliales con las diferentes cepas vacunales a las 0.5. 2, 4 y 8 horas en los experimentos de inducci3n de mediadores inflamatorios La extracci3n de ARN se realiz3 mediante el m3todo de tiocianato de guanidio fenol-ácido-cloroformo (Chomczynski y Sacchi . 1987) Una vez culminados los tiempos de incubaci3n con las diferentes cepas de *V cholerae* y los controles, los pozos de los cultivos celulares fueron lavados 2 veces con SSTF Luego se les adiciono 0.5 mL de la soluci3n de extracci3n de ARN la cual contenia soluci3n D (tiocianato de guanidio 4 M, citrato de sodio 25 mM pH 7. sarcosil 0.5 % y 2 mercaptoetanol 0.1 M) fenol ácido saturado y acetato de sodio 2 M pH 4 Las células fueron disueltas en esta mezcla, la cual se verti3 en un tubo eppendorf y se le ańadieron 50 μL de cloroformo se agito vigorosamente en vortex y finalmente se centrifug3 a 13000 x g en una centrifuga eppendorf (Eppendorf. Alemania) por 15 minutos para separar las fases Se extrajo la fase acuosa, se le

añadió igual volumen de isopropanol y un décimo de volumen de acetato de sodio 2 M pH 4 y se guardó a -20°C durante toda la noche Posteriormente se repitió la centrifugación a 13000 x g durante 10 minutos y el sedimento se resuspendió en 300 µl de solución D. añadiendo igual volumen de isopropanol e incubándolo por 1 hora a -20 C La mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 13000 x g se lavó el sedimento 2 veces con etanol al 75% y se dejó secar a temperatura ambiente Finalmente el sedimento fue disuelto en 50 µl de agua tratada con dietil-pirocarbonato en un baño a 62°C durante 10 minutos

La verificación de la presencia y la integridad de los ARN se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 12%. Para ello se utilizaron 3 uL de cada solución de ARN La concentración de ARN ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) en cada una de las suspensiones fue determinada empleando la formula. $D O_{250\text{nm}} \times \text{dilución} / 25$ Los ARN se utilizaron para RT-PCR cuando su relación de $D O_{260/280\text{nm}}$ fue mayor o igual que 1.6.

Transcripción reversa y PCR

Para comprobar la producción de los ARNm que codifican la información para los diferentes mediadores inflamatorios se realizaron las técnicas de transcripción reversa y PCR (RT-PCR) Primeramente se procedió a la transcripción reversa del ARNm total en ADNc. empleando el sistema de reverso transcripción de la firma Promega (Madison. WI EUA) y siguiendo las recomendaciones del fabricante Se tomaron 15 µg de cada ARN de partida y la reacción se llevó a cabo por 1 hora en un baño a 42°C

Una vez obtenido el ADNc total se procedió a la realización de la PCR específica para todos los mediadores inflamatorios en estudio y para la [lactina En la PCR se utilizó 1 µL de cada ADNc obtenido, en un volumen final de 50 µL. Cada reacción contenía 0.2 mM de desoxnucleósidos trifosfato. 2 mM de MgCL. 0.5 µM de cada cebador (tanto el cebador con sentido como el antisentido) y 1.25 U de Taq ADN polirnerasa Todos los reactivos utilizados en la PCR fueron de la firma Boeltinger Mannheim (Alemania) Los ciclos de la PCR contenían una desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguida por 30 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de alineación a 60°C, 2 minutos de extensión

a 72°C y se finalizó con 10 minutos de extensión a 72°C Los cebadores usados y los pesos moleculares de cada uno de los fragmentos de ADN amplificados son

β-actina 548 pares de bases

Cebador con sentido 5' GTGGGGCGCCCCAGGCACCA 3'

Cebador antisentido 5' CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC 3'

IL1-α. 420 pares de bases

Cebador con sentido 5' GTCTCTGAATCAGAAATCCTTCTATC 3'

Cebador antisentido 5'

CATGTCAAATTTCACTGCTTCATCC 3'

IL-8, 302 pares de bases

Cebador con sentido 5' ATGACTTCCAAGCTGGCCGTG 3'

Cebador antisentido 5' TTATGAATTCTCAGCCCTCTTCAAAAATTCTC 3'

iNOS 237 pares de bases

Cebador con sentido 5' AAGCCCCAAGACCCAGTGCC 3'

Cebador antisentido 5' CCAGCATCTCCTCCTGGTAGAT 3'

TGF-α 200 pares de bases

Cebador con sentido 5' AACATGATCGTGCGCTCTGCAAGTGCAGC 3'

Cebador antisentido: 5' AAGGAATAGTGCAGACAGGCAGGA 3'

TNF-α 702 pares de bases

Cebador con sentido 5' ATGAGCACTGAAAGCATGATC 3'

Cebador antisentido 5' TCACAGGGCAATGATCCCAAAGTAGACCTGCCC 3'

GM-CSF 286 pares de bases

Cebador con sentido 5' ACACTGCTGAGATGAATGAAACAGTAG 3'

Cebador antisentido 5' TGGACTGGCTCCCAGCAGTCAAAGGGGATG 3'

MCP-1 510 pares de bases

Cebador con sentido 5' TCTGTGCCTGCTGCTCATAGC 3'

Cebador antisentido 5' GGGTAGAACTGTGGTTCAAGAGG 3'

Para comparar las bandas obtenidas en las electroforesis de los productos de las PCR de los diferentes experimentos, se sacaron fotos instantáneas de los geles se digitalizaron y se procesaron con el programa Scion Image (Scion. EUA) Con este programa se calcularon los volúmenes totales de cada una de las bandas y se normalizaron contra la banda de β-actina correspondiente, para luego comparar las densidades relativas de cada una de ellas

Inmunoensayo de enzima ligada (ELISA).

Para corroborar la producción de las citocinas por las células epiteliales expuestas a las cepas vacunales de *V. cholerae* y los controles, fue necesario determinar si las proteínas correspondientes a cada una de ellas estaban presentes en los sobrenadantes de los cultivos de la línea celular HT29-18N2 La medición de la

producción de la IL-8, el TNF- α y el GM-CSF por estas células se llevó a cabo con el juego de ELISA Quantikine de la firma R & D System (Minn , EUA), cuyos límites de detección son de 10, 4 4 y 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente Se tomaron como muestras los sobrenadantes de los cultivos celulares de los experimentos de inducción de mediadores inflamatorios en el tiempo, los cuales fueron diluidos apropiadamente El ensayo se llevó a cabo con los sobrenadantes obtenidos luego de las 8 horas de incubación de las cepas vacunales de *V cholerae* con las células epiteliales, ya que en este tiempo fue donde se observaron las mayores expresiones de los ARNm de las tres citocinas Las concentraciones de IL-8, TNF- α y GM-CSF en los sobrenadantes fueron calculadas empleando una curva estándar de cada una de estas citocinas. En todos los experimentos las células epiteliales estimuladas con la mezcla inductora (TNF- α . 100 ng mL^{-1} ; IL-1 α 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e IFN- γ . 100 U mL^{-1}) se emplearon como control positivo de la inducción de mediadores inflamatorios en esta línea celular

3. 5.2 Línea celular de macrófagos murinos J774.A2.

Inducción de NO y del TNF- α en los macrófagos.

Para los experimentos de inducción de NO y del TNF- α con el LPS de *V cholerae* las células de la línea J774.A2 fueron sembradas siempre en placas estenles de cultivo de 96 pocillos (Costar Laboratories. Cambridge. Mass. EUA). partiendo de una suspensión celular de 10^6 células mL^{-1} Luego 5 pozos, en cada uno de los tres experimentos realizados, fueron estimulados con el LPS de *V cholerae* 01 (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y los sobrenadantes de estos cultivos fueron analizados para detectar la presencia de NO $_2$ y del TNF- α a las 48 y las 18 horas de incubación, respectivamente

Los niveles de NO $_2$ en los sobrenadantes de los cultivos de macrófagos son una indicación de la producción de NO Este compuesto químico se determino con una prueba colorimétrica empleando el reactivo de Griess (Wood y col , 1990) Las alícuotas de los sobrenadantes de cultivo fueron mezcladas volumen/volumen con el reactivo de Griess (1% de sulfanilamida 0 1% de n-ftil-etilendiamina en 2% de ácido fosfórico, todos suministrados por MERCK Alemania) y se dejaron incubar a temperatura ambiente por 10 minutos Luego la absorbancia fue leída a 540

nm y las concentraciones de NO₂ se calcularon empleando una curva estándar de NaNO₂ (0 a 100 nmoles mL⁻¹) Para determinar si la producción de NO de los macrófagos expuestos al LPS se debe a la actividad de la iNOS empleamos una solución de L-NMMA, 500 μM. Inhibidor específico de esta enzima en pozos controles Además, los macrófagos sin estimular fueron empleados como control negativo en los tres experimentos realizados

El TNF-α se detectó mediante el ensayo de actividad citotóxica sobre la línea de ratón L929 (Aggarwal y col, 1984). Los sobrenadantes de los cultivos de macrófagos expuestos al LPS bacteriano fueron añadidos a la línea L929 e incubados durante 24 horas a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Luego se retiraron los sobrenadantes y las células fueron teñidas durante 5 minutos con una solución de violeta cristal 0.5% en metanol/agua (1/4). La absorbancia fue leída a 540 nm y las concentraciones del TNF-α de ratón fueron calculadas empleando una curva estándar de esta citocina (0 a 2000 pg mL⁻¹, BASF-Knoll, Ludwigs-hafen Alemania).

Inducción de la respuesta de explosión respiratoria en los macrófagos.

Se preparó una suspensión de células de la línea J774.A2 de 10⁶ células mL⁻¹ en SSTF se distribuyó en varios tubos eppendorf en alícuotas de 400 μL y se colocaron a 37°C Luego se añadió luminol (40 μg mL⁻¹) y los macrófagos fueron estimulados con el LPS de *V. cholerae* 01 (1 μg mL⁻¹) o con FMA, estimulador específico de la RER a una concentración de 3 μg mL⁻¹ Seguidamente los tubos fueron agitados suavemente y se colocaron en un luminómetro (LKB. modelo 1250, Suecia) Las señales de quimioluminiscencia se midieron durante 5 minutos a intervalos de 1 minuto a 37°C. Los resultados se expresan como el área bajo la curva (mV minuto⁻¹) Las suspensiones de macrófagos sin estimular fueron empleadas como control negativo en los tres experimentos realizados

3. 6 Acción de la toxina del cólera sobre la respuesta de mediadores inflamatorios en las líneas celulares HT29-18N2 J774.A2.

3.6.1 Línea celular de epitelio intestinal humano HT29-18N2.

Acción de la toxina del cólera en la respuesta de producción de la IL-8.

Para estudiar la acción de la TC sobre la respuesta de la IL-8 de la línea epitelial HT29-18N2 a cepas de *V cholerae*, se analizó en primer lugar si esta toxina era capaz de inducir la producción de esta citocina en las células epiteliales. Lo anterior se realizó añadiendo la TC (100 ng mL^{-1}) a tres pozos de cultivo que contenían monocapas de células HT29-18N2 en dos experimentos independientes. Estos cultivos fueron incubados 8 horas a 37 C en atmósfera de 5% de CO_2 y finalmente se colectaron los sobrenadantes para detectar la presencia de la IL-8. Por otra parte, se analizó si la TC era producida por las cepas toxigénicas C7258 y C6706 al ser cultivadas con las células epiteliales durante las 8 horas de experimentación. Las cepas toxigénicas fueron inoculadas tal y como lo describimos anteriormente para las cepas vacunales y se analizó la presencia de la TC en los sobrenadantes de cultivo de las células epiteliales a las 8 horas posteriores a la inoculación de los vibriones. La TC fue detectada empleando el ensayo de GM-1 ELISA según la metodología descrita con anterioridad (Benitez y col 1996). Las placas de micro-ELISA Maxisorp de 96 pozos se incubaron durante 1 h a 37 C con GM-1 preparado a una concentración de $1 \mu\text{g mL}$ en SSTF. Luego se añadió leche descremada al 2% disuelta en SSTF y se incubó 1 h a 37 C. Se lavó dos veces con 0.05 % de Tween-80 en agua destilada ($\text{H}_2\text{O-T}$) y las muestras se añadieron e incubaron durante 1 h a 37°C. En cada placa se incluyeron diluciones seriadas 1:2 de la TC rango ($1.25 - 125 \text{ ng mL}^{-1}$) como patrón de cuantificación. Las placas se lavaron dos veces con $\text{H}_2\text{O-T}$ y se incubaron 1 h a 37 C con el AcM 4E1G5 ajustado a una concentración de $1 \mu\text{g mL}$ en SSTF. Las placas se lavaron nuevamente y se incubaron durante 1 h a 37 C con un conjugado de IgG de carnero-peroxidasa (A-4416, Sigma, EUA) dirigido contra la IgG del ratón. La dilución fue de 1:5000 en SSTF con 0.05% de Tween-80 y leche 1%. Las placas fueron lavadas cinco veces con $\text{H}_2\text{O-T}$. Se reveló la reacción durante 15 minutos con H. O. al 0.04% y O-fenilendiamina (1 mg mL) ambos preparados en citrato disódico 0.1 M pH 5.0. La reacción fue detenida con 50 μl de H_2SO_4 2.5 N y la absorbancia se leyó en un lector de placas (Titertek UK) a una longitud de onda de 492 nm.

Posteriormente se evaluó la cantidad de la IL-8 presente en estos mismos sobrenadantes de cultivo. Las cepas toxigénicas fueron también crecidas en los medios

de máxima expresión de la TC *in vitro* (condiciones óptimas), caldo Luria Bertam pH 6.5 y medio AKI, para las cepas clásicas y El Tor respectivamente (Waldor y Mekalanos. 1996 y Iwanaga y Yamamoto, 1985) Lo anterior nos permitió valorar los niveles de la TC producidos por cada cepa toxigénica en la nueva condición de cultivo

Para analizar la acción de la TC sobre la respuesta de IL-8 de las células epiteliales frente a las cepas vacunales de *V. cholerae* se procedió de la forma siguiente Las cepas se inocularon y cultivaron según el protocolo ya descrito, con la diferencia de que a los 30 minutos, en el paso de extracción y lavado, se añadió medio Dulbecco fresco con la TC a una concentración de 100 ng mL Luego de 8 horas de incubación se tomaron los sobrenadantes para determinar las concentraciones de la IL-8 En todos los casos las cantidades de la IL-8 producidas por las células epiteliales se detectaron empleando el ELISA Quantikine descrito con anterioridad

3. 6.2 Línea celular de macrófagos murinos J774.A2.

Acción de la toxina del cólera sobre la producción de NO y del TNF- α por los macrófagos.

La acción directa de la TC sobre la inducción de NO y del TNF- α en los macrófagos fue evaluada al añadir esta toxina (100 ng mL⁻¹) a 5 pozos de cultivo de la línea J774 A2 en dos experimentos independientes La TC y los macrófagos fueron incubados durante 18 horas (para el TNF- α) ó 48 horas (para el NO) Luego fue evaluada la presencia de estos dos mediadores inflamatorios en los sobrenadantes según la metodología descrita anteriormente (acápites 3 5.2).

Por otra parte la acción de la TC sobre la respuesta de NO y del TNF- α de los macrófagos inducida por el LPS bacteriano fue evaluada de dos formas Primero, la TC (100 μ g mL⁻¹) fue añadida conjuntamente con el LPS de *V. cholerae* 01 (1 μ g mL⁻¹) a 5 pozos de cultivo que contenían los macrófagos en tres experimentos independientes Segundo, la misma concentración de toxina fue añadida entre 0 5-4 horas antes que el LPS bacteriano y luego los cultivos de macrófagos fueron incubados por 18 ó 48 horas más Además se estudio la acción de diferentes concentraciones de la TC (0 100 ng mL⁻¹) sobre la respuesta de NO y del TNF- α

de los macrófagos frente al LPS También se analizó la especificidad de la acción de la TC. con el empleo del AcM 4E1G5 (100 ng mL⁻¹) para bloquear la actividad de esta toxina sobre los macrófagos o desnaturalizándola por calor antes de que fuera adicionada a los cultivos de la línea J774 A2 En todos los casos las concentraciones de NO y del TNF- α en los sobrenadantes fueron detectadas según lo descrito anteriormente (acápite 3.5.2)

Acción de la toxina del cólera sobre la respuesta de explosión respiratoria de los macrófagos.

La acción de la TC (100 ng mL⁻¹) sobre la RER se midió al añadir esta toxina conjuntamente o 4 horas antes que el FMA a las suspensiones de macrófagos y realizar las mismas determinaciones descritas con anterioridad (acápite 3.5.2). Además se evaluó la especificidad de la acción de la TC. empleando el AcM 4E1G5 (100 ng mL⁻¹) para bloquear la actividad de esta toxina sobre la línea celular J774 A2 o inactivándola por calor antes de añadirla a los macrófagos

3. 7 Ensayos controlados en voluntarios con cepas vacunales de *V. cholerae*. Selección de voluntarios.

Los voluntarios fueron hombres sanos de 18 a 40 años que no tenían historia reciente de episodios de diarrea ni antecedentes de vacunación contra el cólera además de no estar bajo ningún tratamiento medicamentoso en el momento del ingreso Antes de ser admitidos, los voluntarios fueron evaluados médica y psicológicamente y se les realizaron análisis de laboratorio que incluyeron muestras de heces orina y sangre Por otra parte, se sometieron a un examen escrito probatorio de que comprendían el estudio y sus riesgos potenciales Finalmente, los voluntarios firmaron un consentimiento informado antes de ser aceptados

Diseño del estudio.

Estos ensayos clínicos preliminares se realizaron para cada cepa vacunal en una sala de aislamiento clínico del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK. L a Habana Cuba) El protocolo de ensayo clínico fue revisado y aprobado por los Comités de Ética del Instituto Finlay y del IPK y fue autorizado por el Centro Esta-

tal para el Control de Medicamentos (CECMED) y el Centro Nacional de Seguridad Biológica (CNSB)

El estudio de cada cepa vacunal se realizó en ensayos independientes y nosotros escogimos para nuestros análisis los primeros que se realizaron después de 1998 con cada una de las cepas de interés. Los voluntarios de cada ensayo se emplearon de la siguiente forma

- En el ensayo de la cepa JBK70 8 vacunados y 4 placebos
- En el ensayo de la cepa 81 8 vacunados y 4 placebos
- En el ensayo de la cepa 638 9 vacunados y 9 placebos

Preparación de los inóculos.

Las diferentes cepas fueron cultivadas en agar cerebro-corazón (Oxoid UK) y re- suspendidas en solución de NaCl 0.9% estéril. Las densidades ópticas de las suspensiones celulares se ajustaron apropiadamente a una longitud de onda de 600 nanómetros en un fotocolorímetro Spectromc 401 y se determinó el conteo de viables de cada suspensión en placas de LBA por el método de gotas anteriormente descrito. Los voluntarios del grupo experimental recibieron 120 mL de bicarbonato de sodio al 2% seguido del inóculo resuspendido en 30 mL de la misma solución. Los del grupo de placebos recibieron bicarbonato de sodio solamente, con una apariencia indistinguible del preparado vacunal. Durante 90 minutos antes y después de ingerir el inóculo, los voluntarios no comieron ni bebieron ningún alimento. Para asegurar que la prueba transcurriera con carácter doble ciego, frascos idénticos que contenían el inóculo bacteriano o el placebo fueron codificados por un monitor externo. El investigador clínico asignó una letra a cada voluntario y los códigos y las letras se hicieron coincidir aleatoriamente. Los códigos fueron guardados por el monitor hasta el fin del ensayo. Los inóculos para todas las cepas vacunales fueron de 10⁷ UFC por voluntario.

Seguimiento clínico de las diarreas.

Luego de la inoculación de los voluntarios y durante los 5 días posteriores, se observó y registró la aparición de diarreas. Todas las deposiciones se colectaron, se pesaron y su consistencia se ubicó en una escala del I al Y grado I. heces sólidas y firmes grado II. heces blandas pero aun firmes grado III, heces pastosas.

a líquidas, grado IV, diarrea opaca completamente líquida, grado V, diarrea como "agua de arroz", típica del cólera. Se definió como diarrea reactogénica la presencia de 2 o más deposiciones grado III-V en 48 horas con al menos 200 gramos de peso, o una sola de estos grados con más de 300 gramos. Este criterio de diarrea es el más aceptado internacionalmente para estos ensayos (Levine y col . 1988a. Tacket y col , 1993 y Taylor y col , 1994).

Ensayo de aglutinación con látex para lactoferrina.

La presencia de lactoferrina en las heces de los voluntarios inmunizados con 10^2 UFC de las cepas vacunales JBK70. 81 y 638 de *V. cholerae* fue detectada por medio del ensayo de aglutinación con látex para lactoferrina. LEUKO-TEST de la casa comercial TECHLAB (Blacksburg. EUA). Se tomaron las heces de todos los voluntarios de los diferentes ensayos, vacunados o placebos, durante los 5 primeros días después de la inoculación de las cepas de *V. cholerae*. Se tomaron 50 μ L de las heces líquidas ó 0.125 g de las heces sólidas de cada paciente y se diluyeron en 2.5 mL del tampón de ensayo. Posteriormente se homogeneizaron y se evaluaron 50 μ L de cada una de ellas para la detección de lactoferrina siguiendo las recomendaciones del productor. Para todos los casos se empleó un látex sensibilizado con anticuerpos no específicos como control de especificidad del ensayo y la cantidad de esta proteína en las muestras de heces se evaluó cualitativamente en una escala de 0 a 4+ según la intensidad de la reacción de aglutinación comparada con la intensidad de reacción del control positivo del ensayo. El control positivo del ensayo fue una solución de lactoferrina humana purificada del mismo juego diagnóstico (LEUKO-TEST). Una muestra de heces de cada uno de los voluntarios antes de la administración de las cepas de *V. cholerae* fue empleada como control negativo.

3.8 Procesamiento estadístico

Para los datos mediados en escala de intervalos, se comprobó el ajuste a una distribución normal empleando la prueba de Kolmogorov-Smirnov y se determinó la homogeneidad de las varianzas por la prueba de Bartlett. Cuando fue necesario, los datos fueron transformados a su logaritmo natural para lograr la homogeneidad de las varianzas.

En los experimentos de adherencia y crecimiento bacteriano se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple para demostrar que no hubo diferencias en los inóculos. Además, se aplicó un diseño factorial con un procesamiento ANOVA de clasificación doble para el tipo de cepa y el tiempo. Para comparar las concentraciones de IL-8 se empleó un ANOVA de clasificación simple y la prueba de rangos múltiples de Duncan.

En los ensayos de detección de la TC se utilizó la prueba t de *student* para muestras independientes y en los de acción de esta toxina sobre la respuesta de mediadores inflamatorios de las células epiteliales y los macrófagos se aplicó un ANOVA de clasificación simple y la prueba de rangos múltiples de Duncan. Para evaluar las frecuencias de inducción de lactoferrina de cada cepa vacunal con respecto a los placebos, se realizaron pruebas de independencia (tablas de 2 x 2) y la probabilidad exacta de Fisher. Además para investigar la dependencia de la producción de lactoferrina en los voluntarios con el tipo de cepa se utilizó una tabla de contingencia R x C y el método de la probabilidad logarítmica (prueba G). Finalmente, para analizar las frecuencias de inducción de diarreas de cada cepa vacunal con respecto a la mayor o menor presencia de lactoferrina en las heces de los voluntarios se realizaron pruebas de independencia (tablas de 2 x 2) y la probabilidad exacta de Fisher.

El procesamiento de los datos se realizó con el paquete *Basic Statistica for Windows* de la casa comercial StatSoft Inc (OK EUA) y en todos los casos el nivel de significación estadístico utilizado fue ≤ 0.05 .

4- Resultados.

4.1 Inoculo, adherencia y vitalidad celular.

Al realizar los conteos de las UFC de las diferentes suspensiones de cepas de *V cholerae* inoculadas a los cultivos de la línea HT29-18N2. se observó que todas estaban en el orden de 10 UFC/ml y al comparar las UFC de los inóculos se demostró que no existían diferencias significativas entre ellos ($F = 0.8579$) (Tabla 2) Los conteos de las UFC de cada cepa adherida a la línea HT29-18N2 no mostraron diferencias significativas entre ellas en cada uno de los tiempos analizados ($F = 0.3977$) Sin embargo, existieron diferencias significativas ($F = 1397$) para la adherencia de las cepas en el tiempo (Tabla 2), no encontrándose efectos de interacción entre los factores cepa y tiempo ($F = 0.2426$). En ninguno de los experimentos se detectó *V. cholerae* O1 u otro microorganismo en los pozos controles sin inocular

TABLA 2 Adherencia de las diferentes cepas de *V cholerae* a la línea de epitelio de colon HT29-18N2

Cepas	Inoculo ¹	Media del Log UFC/Pozo \pm DS ^a			
		Adherencia a diferentes tiempos después del inoculo ^c			
		0.5 horas	2 horas	4 horas	8 horas
C7258	7.35 \pm 0.12	7.35 \pm 0.12	7.96 \pm 0.10	8.90 \pm 0.13	9.17 \pm 0.10
81	7.27 \pm 0.21	7.13 \pm 0.13	8.10 \pm 0.18	9.01 \pm 0.20	9.10 \pm 0.11
638	7.33 \pm 0.17	7.25 \pm 0.20	8.05 \pm 0.11	8.85 \pm 0.14	9.01 \pm 0.16
C6706	7.32 \pm 0.14	7.22 \pm 0.13	8.05 \pm 0.16	8.90 \pm 0.18	9.05 \pm 0.12
413	7.39 \pm 0.13	7.18 \pm 0.20	8.13 \pm 0.21	8.65 \pm 0.21	9.16 \pm 0.11
CVD103	7.17 \pm 0.16	7.07 \pm 0.16	8.13 \pm 0.13	8.85 \pm 0.14	9.04 \pm 0.19
JBK70	7.18 \pm 0.11	7.10 \pm 0.13	7.97 \pm 0.12	8.95 \pm 0.15	9.07 \pm 0.20

^a La media del Log UFC/Pozo \pm la DS de tres experimentos independientes.

^b Cantidad de vibriones en los inóculos de tres experimentos con la línea HT29-18N2. No existieron diferencias significativas. ANOVA de clasificación simple con $\mu = 0.05$.

Cantidad de vibriones adheridos en dos pozos de cada uno de tres experimentos independientes. ANOVA de clasificación doble para estudio de interacciones con $\mu = 0.05$ Primer factor: No existieron diferencias significativas de adherencia de las distintas cepas en cada tiempo. Segundo factor: Existieron diferencias significativas de la adherencia de las cepas en los tiempos de incubación.

Por otra parte la media de los conteos totales de células HT29-18N2 fue de 7.5×10^7 células/pozo Además, no se observaron diferencias en las cantidades de

células epiteliales vivas o muertas, en los tres experimentos independientes, al término de la incubación con las diferentes cepas de *V. cholerae* y la vitalidad de las células epiteliales se mantuvo superior al 95% durante todo el tiempo de enfrentamiento (8 horas) con las bacterias

4. 2 Experimentos de inducción de mediadores inflamatorios en las líneas celulares HT29-18N2 y J774.A2.

4. 2.1 Línea celular de epitelio intestinal humano HT29-18N2.

RT-PCR de los estudios de inducción de mediadores inflamatorios.

Empleando la PCR se amplificaron los ADNc obtenidos en las reacciones de transcripción reversa, a partir de los ARNm purificados de la línea HT29-18N2 estimulada con las cepas vacunales y la mezcla inductora, así como de los cultivos sin estimular. En la Figura 1 se muestran las bandas correspondientes al peso molecular esperado de las secuencias nucleotídicas amplificadas de los mediadores inflamatorios IL-8, TNF- α , MCP-1, iNOS y GM-CSF. La expresión de este amplio rango de mediadores inflamatorios por las células epiteliales frente a la mezcla inductora fue dependiente del tiempo de exposición al inductor y diferente entre ellos. Debe señalarse que las células epiteliales no expresaron ARNm de las citocinas IL-1 α y TGF- β 1 en respuesta a la mezcla inductora (Figura 1). Las electroforesis de los productos de las PCR mostraron la alta especificidad de la metodología empleada, al observarse una sola banda en las reacciones positivas (dato no mostrado).



Figura. 1. Experimento de inducción de ARNm de mediadores inflamatorios en el tiempo en las células HT29-18N2. Se muestran electroforesis en geles de agarosa representativas de tres experimentos independientes de TR-PCR amplificando los ARNm de β -actina, IL-1 α , IL-8, iNOS, TGF- β 1, MCP-1, TNF- α y GM-CSF, en diferentes tiempos, después de la estimulación con la mezcla inductora (TNF- α , 100 ng ml⁻¹; IL-1 α , 10 ng ml⁻¹ e IFN- γ , 100 U ml⁻¹). SE-8h: Cultivos de HT29-18N2 sin estimular en el último tiempo (8 horas).

Como se puede observar en las Figuras 2 y 3, las células de la línea HT29-18N2 sólo produjeron ARNm de tres citocinas (IL-8, TNF- α y GM-CSF) al enfrentarse a las cepas vivas candidatos vacunales de *V. cholerae*. Además, el patrón de bandas para la β -actina, una proteína constitutiva, se mantuvo inalterable en todas las PCR de todos los tiempos analizados, así como las células no estimuladas de esta línea epitelial no expresaron niveles detectables de transcritos de los mediadores inflamatorios analizados en ninguno de los experimentos realizados (Figuras 1, 2, 3, 4, 5).

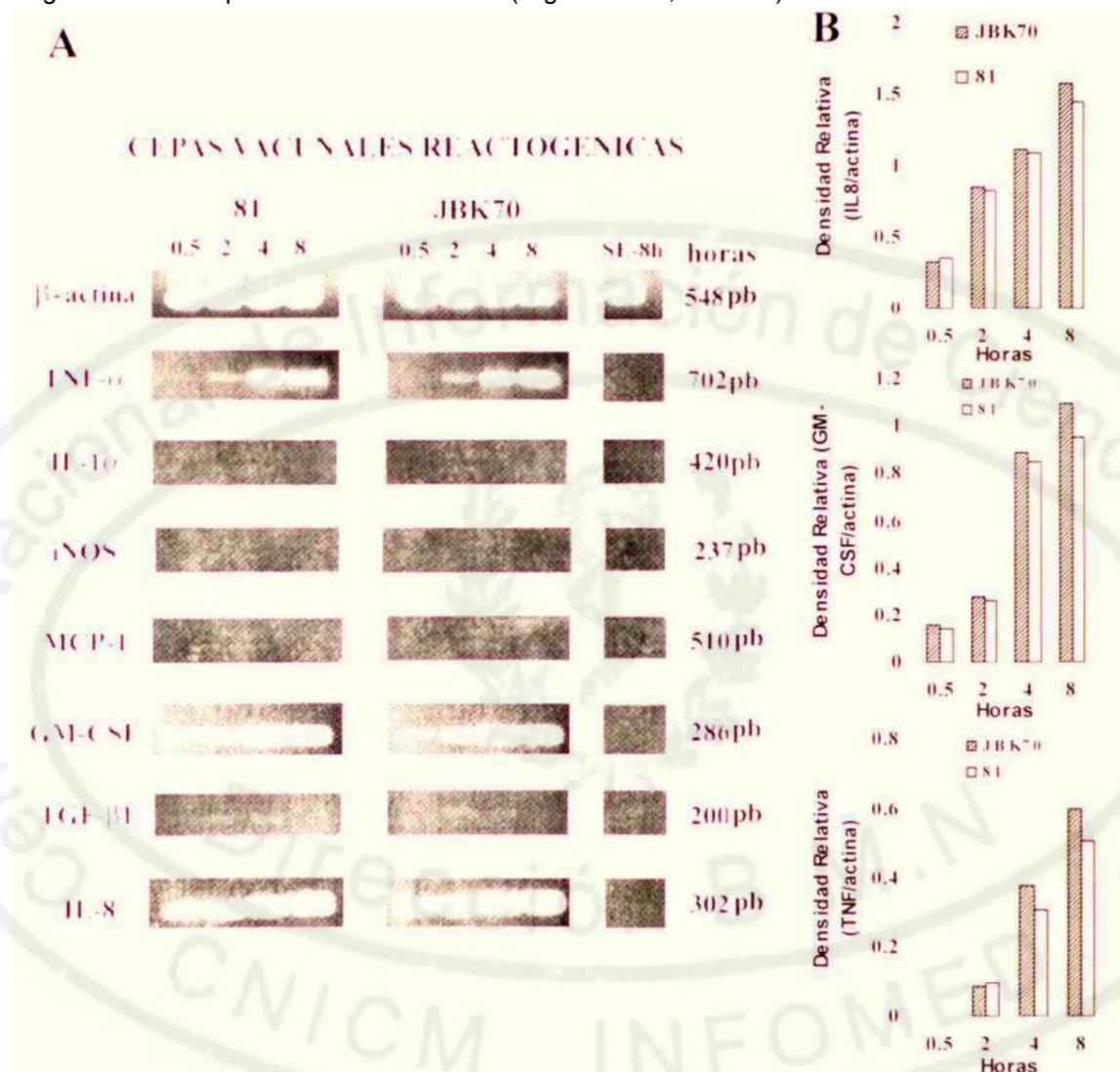


Figura 2 Experimentos de inducción de ARNm de mediadores inflamatorios en el tiempo en las células HT29-18N2 (A) Se muestran electroforesis en geles de agarosa representativas de tres experimentos independientes de RT-PCR amplificando los ARNm de β -actina, IL-1 α , IL-8, iNOS, TGF- β 1, MCP-1, TNF α y GM-CSF, en diferentes tiempos, después de la estimulación con dos cepas vacunales reactogénicas de cólera SE-81r. Cultivos de HT29-18N2 sin estimular en el último tiempo (8 horas) (B) Se grafican los valores del volumen total de cada banda, normalizados contra la banda de β actina correspondiente (Densidad Relativa), para lo cual se empleó el programa Scion Image. pb: tallas de las bandas en pares de bases.

En la Figura 2 se observan los resultados obtenidos con la inoculación de dos cepas vacunales reactogemcas (JBK70 y 81) Para las dos cepas ensayadas los ARNm para la IL-8 y el GM-CSF fueron detectados desde los 30 minutos y los ARNm para el TNF- α desde las 2 horas de exposición a los vibriones. En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos con las dos cepas vacunales no reactogemcas (CVD103-HgR y 638). Estas cepas indujeron la producción de transcritos de IL-8 y GM-CSF a las 2 horas, mientras que los del TNF- α sólo fueron evidentes a las 8 horas de incubación con las bacterias.

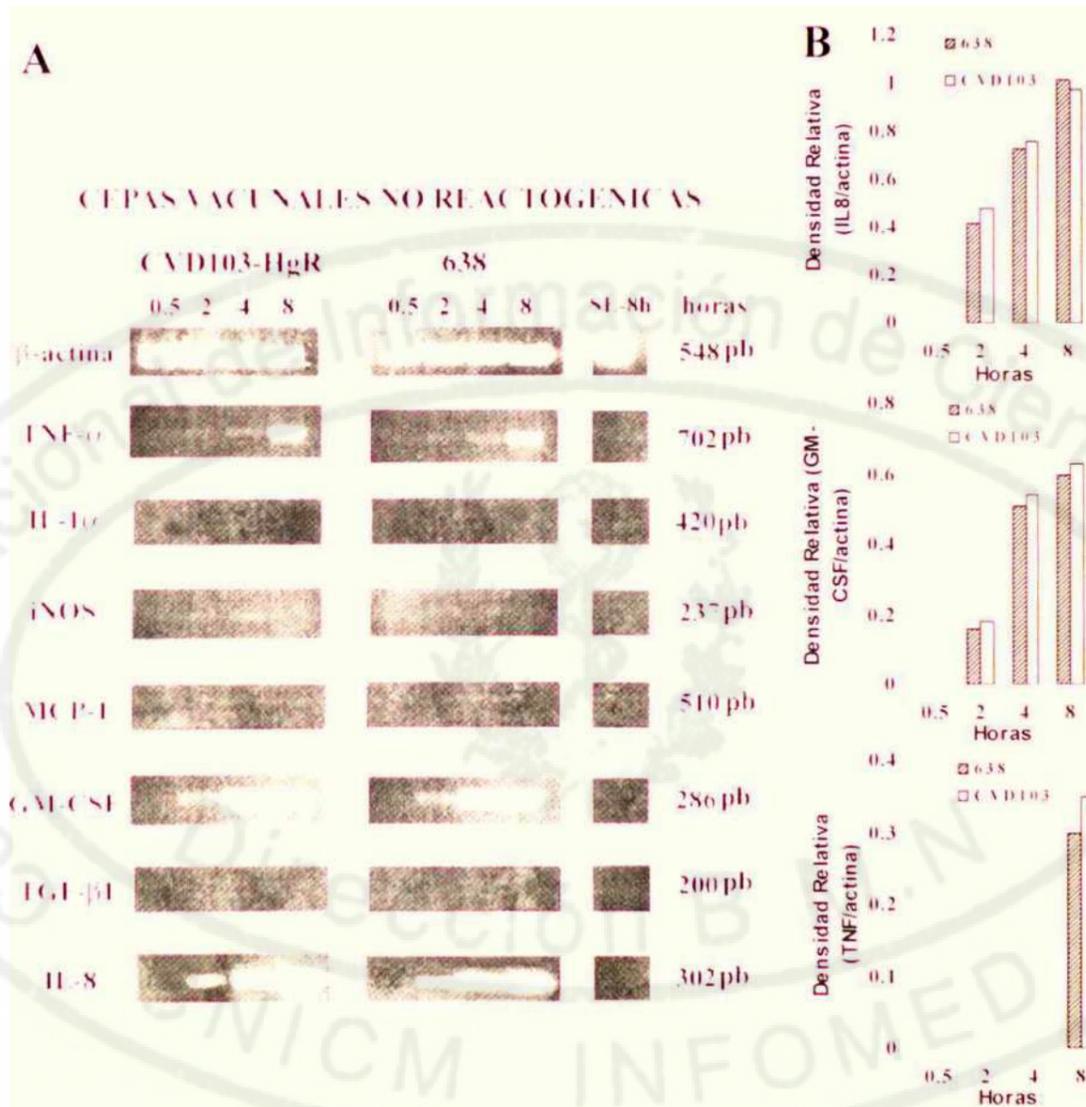


Figura 3 Experimentos de inducción de ARNm de mediadores inflamatorios en el tiempo en las células HT29-18N2 (A) Se muestran electroforesis en geles de agarosa representativas de tres experimentos independientes de RT-PCR amplificando los ARNm de β -actina, IL-1 α , IL-8, iNOS, TGF- β 1, MCP-1, TNF- α y GM-CSF, en diferentes tiempos, despues de la estimulación con dos cepas vacunales no reactogemcas de cólera SE-8h Cultivos de HT29-18N2 sin estimular en el ultimo tiempo (8 horas) (B) Se grafican los valores del volumen total de cada banda, normalizados contra la banda de β -actina correspondiente (Densidad Relativa), para lo cual se empleo el programa Scion Image. pb: tallas de las bandas en pares de bases

Si conjugamos los resultados mostrados en las Figuras 2 y 3, observaremos que las cepas reactogénicas JBK70 y 81 indujeron al menos 1 4 veces más cantidad de ARNm de la IL-8, el TNF-u y el GM-CSF en las células epiteliales, que las cepas no reactogénicas CVD103-HgR y 638 (Figuras 2B y 3B) Es de notar que las células epiteliales no expresaron transcritos de la IL-1 α , la MCP-1, la iNOS y el TGF- β 1 en respuesta a las cepas vacunales de cólera (Figuras 2 y 3) Adicionalmente, las cepas vacunales 81 y 638 muertas por calor indujeron la producción de transcritos de la IL-8 y el GM-CSF en las células HT29 18N2 (Figura 4) pero en niveles dos veces menores que los que la cepa reactogénica 81 indujo cuando fue usada viva (Figuras 2B y 4B) y al menos 1 2 veces inferiores a los producidos por la cepa no reactogénica 638 viva (Figuras 3B y 4B) Como se observa en la Figura 4, estas cepas vacunales muertas no estimularon la producción de ARNm para el TNF- α en las células epiteliales y el patrón de aparición de los transcritos de IL-8 y GM-CSF en las células HT29-18N2 indica que la respuesta es dependiente del tiempo de exposición a los vibriones inactivados

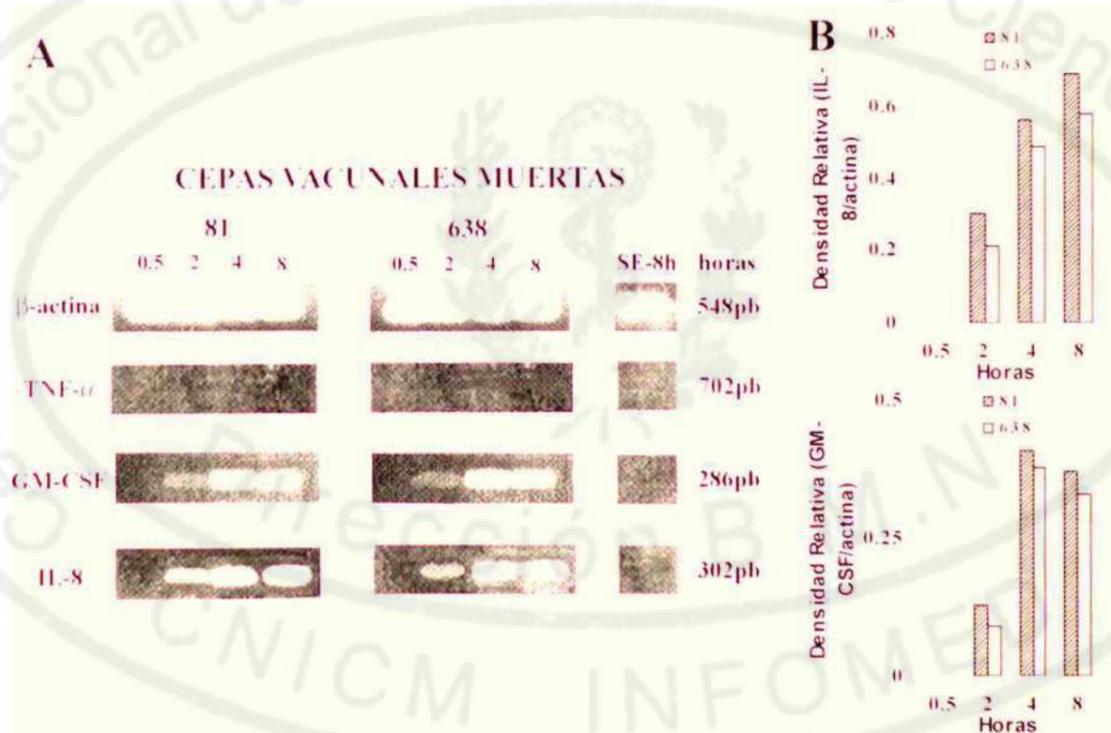


Figura 4 Experimentos de inducción de ARNm de mediadores inflamatorios en el tiempo en las células HT29-18N2 (A) Se muestran electroforesis en geles de agarosa representativas de tres experimentos independientes de RT-PCR amplificando los ARNm de β -actina, IL-8, TNF-u y GM-CSF, en diferentes tiempos, después de la estimulación con dos cepas vacunales muertas de cólera SE-8h: Cultivos de HT29-18N2 sin estimular en el último tiempo (8 horas) (B) Se grafican los valores del volumen total de cada banda, normalizados contra la banda de β -actina correspondiente (Densidad Relativa) para lo cual se empleó el programa Scion Image pb tallas de las bandas en pares de bases

Por otra parte, la expresión de los genes de la IL-8 el TNF- α y el GM-CSF por las células epiteliales no fue detectada en los experimentos con los aditamentos tipo Transwell donde no se permitió que ocurrieran las interacciones directas entre las cepas reactogemcas vivas de *V cholerae* (JBK70 y 81) y las células del epitelio intestinal (Figura 5). Adicionalmente, en esta figura se muestra que la mezcla inductora si estimulo la producción de transcritos de las tres atocinas, cuando fue añadida dentro de los aditamentos tipo Transwell e incubada durante 8 horas con las células de epitelio intestinal humano HT29-18N2 (MI-8h, Figura 5)



Figura 5 Experimentos de inducción de ARNm de mediadores inflamatorios en el tiempo en las células HT29-18N2 Se muestra una electroforesis en gel de agarosa representativa de tres experimentos independientes de RT-PCR amplificando los ARNm de β -actina, IL-8, TNF- α y GM-CSF en diferentes tiempos, después de la estimulación con dos cepas vacunales reactogénicas de colera crecidas en aditamentos tipo Transwell SE-8h. Cultivos de HT29-18N2 sin estimular en el ultimo tiempo (8 horas). MI-8h: Cultivos de HT29-18N2 estimulados con la mezcla inductora desde los Transwell. pb tallas de las bandas en pares de bases

ELISA de los estudios de inducción de mediadores inflamatorios.

En la Tabla 3 se presentan los resultados correspondientes a las concentraciones de la IL-8 y el TNF- α , determinadas por ELISA, en los sobrenadantes de cultivo de las células HT29-18N2 incubadas por 8 h con diferentes cepas vacunales de *V cholerae*. Las concentraciones de estas atocinas fueron determinadas a las 8 h dada la mayor expresión de ARNm de las atocinas en este tiempo (Figuras 2, 3 y 4). Las células epiteliales no estimuladas no produjeron valores detectables de la IL-8 o del TNF α , mientras que la mezcla inductora produjo una fuerte secreción de la IL-8 en las células epiteliales (Tabla 3). La cantidad del TNF- α producido por las células epiteliales frente a este mismo estímulo no fue determinada, dado que esta atocina fue añadida exógenamente con la mezcla inductora.

Las cepas no reactivas CVD103-HgR y 638 indujeron una producción de la IL-8, que fue al menos 14 veces menor que la obtenida con las cepas reactivas JBK70 y 81 (Tabla 3) Además, en esta tabla se muestra que sólo las cepas reactivas fueron capaces de inducir cantidades detectables del TNF- α en las células HT29-18N2 Al comparar las concentraciones de la IL-8 inducidas por las cepas vacunales vivas en las células epiteliales, se comprobó que las cepas reactivas indujeron una significativamente mayor producción de esta citocina que las cepas no reactivas (Tabla 3)

TABLA 3. Secreción de la IL-8 y el TNF- α por las células de la línea de epitelio de colon HT29-18N2 expuestas a cepas vacunales reactivas y no reactivas de *V. cholerae*.

Cepas o Tratamiento	Media de la Concentración de Citocinas (pg mL ⁻¹) \pm DS ¹	
	IL-8 (n = 6)	TNF- α (n = 6)
Reactivas:		
JBK70	16 440 \pm 1 800 ^a	142 \pm 18
81	9 870 \pm 1 200 ^b	107 \pm 11
No reactivas:		
638	5 190 \pm 710 ^c	< 4.4
CVD103-HgR	5 630 \pm 740 ^c	< 4.4
Muertas por calor:		
81	2 480 \pm 340 ^d	< 4.4
638	1 670 \pm 240 ^e	< 4.4
Aditamentos Transwell:		
81	< 10	< 4.4
JBK70	< 10	< 4.4
Mezcla inductora	43 700 \pm 3450	NR
SE	< 10	< 4.4

Medias de las concentraciones de IL 8 y TNF- α la DS determinadas a las 8 h después de las inoculaciones en 2 pozos en cada uno de 3 experimentos independientes.

NR No realizado ya que el TNF- α fue añadido exogenamente con la mezcla inductora.

SE Cultivos de HT29-18N2 sin estimular en 3 experimentos independientes

^{a,b,c,d,e} Anova de clasificación simple Letras diferentes indican diferencias significativas con .

α = 0 05 prueba de rangos múltiples de Duncan

Por otra parte, las cepas vacunales 81 y 638 muertas estimularon la producción de la IL-8 pero no de TNF- α en las células epiteliales. Estas cepas muertas indujeron una concentración de IL-8 que fue al menos 3 y 1.7 veces menor que la inducida por las cepas vacunales reactogénicas y no reactogénicas vivas, respectivamente (Tabla 3). La comparación de las concentraciones de la IL-8 inducidas por las cepas vacunales muertas y vivas de cólera evidenció que estas últimas indujeron una significativa mayor producción de esta citocina en las células HT29-18N2 (Tabla 3). Por el contrario, ni el TNF- α ni la IL-8 fueron detectados en los sobrenadantes de los experimentos donde se emplearon los aditamentos tipo Transwell para impedir las interacciones directas entre las cepas reactogénicas vivas y la línea de epitelio intestinal HT29-18N2 (Tabla 3).

Adicionalmente, los mismos sobrenadantes de los diferentes experimentos de co-incubación de los vibriones y las células epiteliales, fueron también ensayados por ELISA para detectar la presencia de la citocina GM-CSF. Esta citocina no fue secretada por las células epiteliales en respuesta a la estimulación con ninguna de las cepas de *V. cholerae* estudiadas (datos no mostrados), aun cuando se había demostrado por PCR que las células HT29-18N2 expresaban ARNm de esta citocina en respuesta a la co-incubación con las cepas vacunales de cólera (Figuras 2, 3 y 4). La secreción del GM-CSF sólo fue detectada en las células epiteliales estimuladas con la mezcla inductora y la media \pm la DS de la concentración calculada en los tres experimentos fue 1526 ± 154.2 pg/mL.

4. 2.2 Línea celular de macrófagos murinos J774.A2.

Inducción del NO, el TNF- α y la respuesta de explosión respiratoria en los macrófagos.

Como se muestra en la Figura 6 (panel A), el LPS purificado de *V. cholerae* 01 produjo una respuesta de NO en los macrófagos. Al comparar las concentraciones de NO inducidas por el LPS, se comprobó que la cantidad de este metabolito en los sobrenadantes de los macrófagos fue reducida significativamente (80%) por la adición de una solución de L-NMMA 500 μ M inhibidor específico de la iNOS (Figura 6 panel A). Por otra parte, el LPS bacteriano también produjo la inducción de la síntesis del TNF- α en los macrófagos (Figura 6, panel B), pero no fue capaz de inducir una RER en la línea J774.A2 como si lo hizo el FMA que es

un potente activador de esta respuesta en los macrófagos y otros tipos de células (Figura 6. panel C)

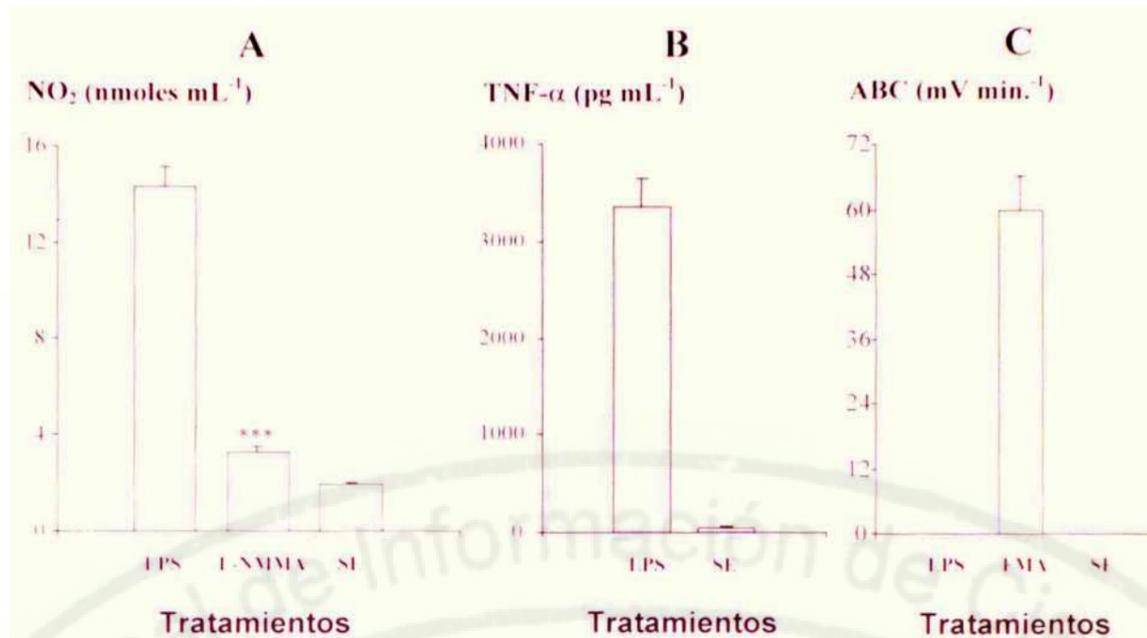


Figura 6 Inducción del NO (panel A), el TNF- α (panel B) y la respuesta de explosión respiratoria (panel C) en los macrófagos expuestos al LPS (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de *V. cholerae* 01. SE Niveles basales de las tres respuestas en los macrófagos sin estimular. L-NMMA: Inhibidor específico de la iNOS FMA Estimulador específico de la RER ABC: Área bajo la curva de respuesta (mV mm^{-1}). Los resultados se expresan como la media \pm la DS de 5 determinaciones en cada uno de 3 experimentos independientes Diferencias significativas con $\alpha = 0.05$. prueba t de Student para muestras independientes

4. 3 Acción de la toxina del cólera sobre la inducción de mediadores inflamatorios en las líneas celulares HT29-18N2 \ J774.A2.

4.3.1 Línea celular de epitelio intestinal humano HT29-18N2.

Acción de la TC sobre la respuesta de IL-8.

Para estudiar la acción de la TC sobre la respuesta de IL-8 de la línea epitelial HT29-18N2 a cepas de *V cholerae*, se analizó en primer lugar si dicha toxina era producida por los vibriones toxigénicos al ser cultivados con las células epiteliales durante las 8 h de experimentación En la Tabla 4 se muestran las medias de las concentraciones de la TC. detectadas por GM-1 ELISA, producidas por las cepas toxigénicas El Tor C6706 y C7258. que son los parentales de nuestras cepas vacunales de primera generación 413 y 81 respectivamente Como puede observarse las dos cepas toxigénicas de *V cholerae* produjeron la TC en cantidades detectables al ser coincubadas con las células HT29-18N2 durante 8 h Es

de notar, que al comparar las concentraciones de la TC en los sobrenadantes de cultivo de las células epiteliales, éstas son significativamente inferiores a las producidas por las cepas toxigénicas en las condiciones de cultivo óptimas para la expresión de esta toxina (Tabla 4).

TABLA 4 Secreción de la toxina del cólera por cepas toxigénicas de *V cholerae* cultivadas con la línea de epitelio de colon HT29-18N2 y en las condiciones óptimas de expresión de esta toxina

Cepas	Concentración de TC en dos Condiciones de Cultivo	
	I (n = 4) ^b	II (n = 4) ^c
C7258	15.8 ± 1.5	162 ± 18***
C6706	14.3 ± 1.6	157 ± 16***

^a Media de la concentración de TC ± DS de 2 pozos en cada uno de 2 experimentos realizados

^b Cepas crecidas en cultivo estático conjuntamente con las células HT29-18N2 durante 8 h

^c Cepas crecidas con agitación en medio AKI toda la noche a 37 C (condición óptima)

*Diferencias significativas con $\alpha = 0.05$. prueba "t" de *Student* para muestras independientes

Seguidamente, evaluamos la inducción de la IL-8 en las células HT29-18N2 por la acción de las cepas virulentas C6706 y C7258 y analizamos la modulación que la TC ejerce sobre la respuesta de IL-8 de las células epiteliales frente a cepas vacunales de *V cholerae* de primera generación. En la Tabla 5 se muestran las concentraciones de la IL-8 inducidas por las cepas toxigénicas de *V. cholerae* y se compara con la producción de esta citocina en las células epiteliales incubadas con 2 cepas vacunales (que no tienen los genes que codifican para la TC) y con estas últimas en presencia de 100 ng mL⁻¹ de la TC.

Como se puede observar en la Tabla 5, la TC no indujo la secreción de la IL-8 en las células de la línea HT29-18N2, pero produjo una clara inhibición de la producción de esta citocina en las células epiteliales expuestas a las cepas vacunales vivas de *V cholerae*. La disminución en la concentración de la IL-8 inducida por las cepas vacunales vivas en ausencia y presencia de la TC fue: para la cepa reactogénica 81 de al menos 2.1 veces (53%), para la cepa no reactogénica 638 de al menos 2.7 veces (63%) y para la cepa 413 homóloga a la 81 pero de sero-tipo Inaba de al menos 2.2 veces (55%). Además, al comparar las concentraciones de la IL-8 inducidas por las cepas toxigénicas de *V cholerae* en

las células epiteliales con las producidas por estas células frente a las cepas vacunales. se comprobó que estas últimas indujeron una significativamente mayor producción de la IL-8 en las células de la línea HT29-18N2 (Tabla 5)

TABLA 5 Efecto de la toxina del cólera sobre la respuesta de IL-8 de las células de la línea de epitelio de colon HT29-18N2 frente a cepas vivas de *V. cholerae*

Cepas o Tratamientos	Media de la Concentración de IL-8 (pg mL ⁻¹ , n = 4) ± DS ¹
No toxigénicas:	
81	10 170 ± 1 190 ^a
638	5 370 ± 730 ^b
413	10 440 ± 1 240 ^a
Toxigénicas:	
C7258	2 620 ± 428 ^c
C6706	2 790 ± 440 ^c
No toxigénicas+TC:	
81	3 720 ± 510 ^c
638	1 500 ± 220 ^d
413	3 610 ± 530 ^c
Mezcla inductora	44 030 ± 3 300
SE	< 10
TC ²	< 10

Media de la concentración de IL-8 < la DS. determinada a las 8 h posteriores a las inoculaciones en 2 pozos en cada uno de 2 experimentos realizados

² Cultivos de HT29-18N2 estimulados solo con TC (100 ng mL⁻¹) en los 2 experimentos realizados.

SE Cultivos de HT29-18N2 sin estimular en los 2 experimentos realizados.

^{a,b,c,d} Anova de clasificación simple Letras diferentes indican diferencias significativas con $\alpha = 0.05$. prueba de rangos múltiples de Duncan.

4. 1.2 Línea celular de macrófagos murinos J774.A2.

Acción de la TC sobre la producción de NO de los macrófagos.

Como se muestra en la Figura 7A la toxina del cólera no indujo la liberación de NO en los macrófagos Además, cuando esta toxina fue añadida conjuntamente con el LPS bacteriano (LPS/TC). no se observó ningún efecto sobre la cantidad

de NO producido por esta línea celular en respuesta al LPS de *V. cholerae* 01 Sin embargo, cuando la TC fue añadida 0.5, 1, 2 y 4 horas antes que el LPS (TC/LPS) a los cultivos de macrófagos, se observó una inhibición de hasta 4 veces (75%) en la producción de NO (Figura 7A). Al comparar las concentraciones de NO- inducidas por el LPS bacteriano en presencia o ausencia de la TC (100 ng mL^{-1}), se comprobó que solo la preincubación con esta toxina inhibió significativamente la producción de NO en los macrófagos expuestos al LPS de los vibriones 01 (Figura 7A).

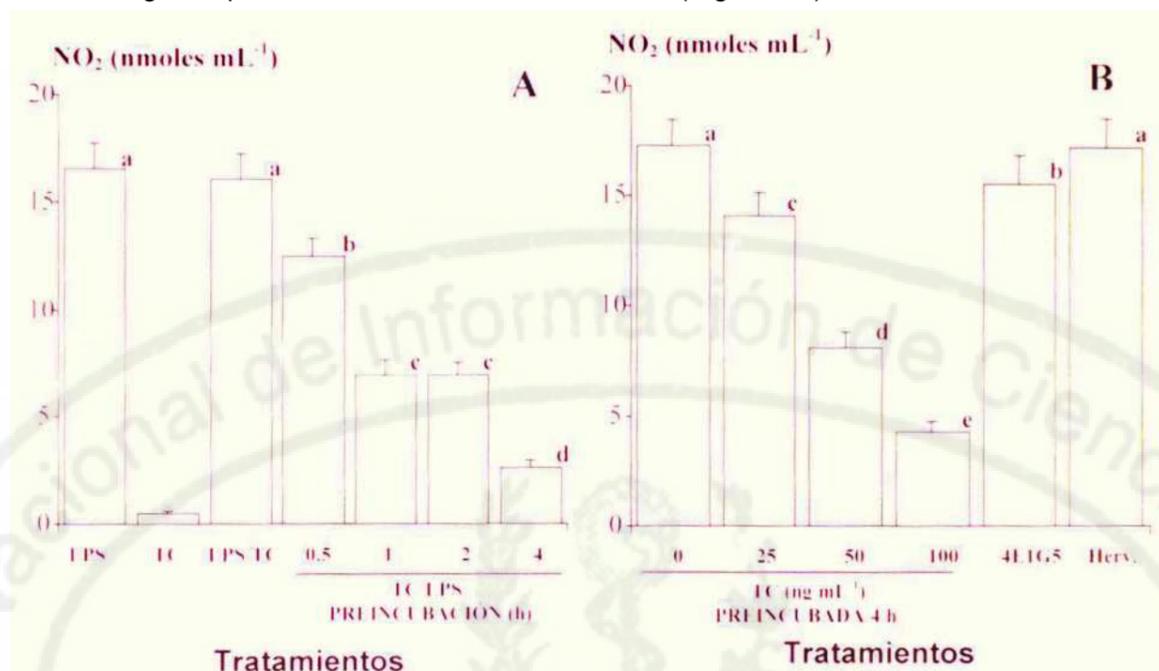


Figura 7 Efecto de la TC sobre la respuesta de NO de los macrófagos frente al LPS bacteriano (A): TC (100 ng mL^{-1}) añadida a los macrófagos sola, conjuntamente con LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$, LPS/TC) o entre 0.5-4 horas antes que el (TC/LPS). (B): Concentraciones crecientes de TC añadidas a los cultivos 4 h antes que el LPS Herv TC (100 ng mL^{-1}) hervida 5 minutos antes de añadirla a los cultivos 4E1G5: AcM (100 ng mL^{-1}) añadido a cultivos que contenían TC (100 ng mL^{-1}). Los resultados se expresan como la media \pm DS de 5 determinaciones en cada uno de 3 experimentos realizados. ^{a,b,c,d,e} ANOVA de clasificación simple. Letras diferentes indican diferencias significativas con $\alpha = 0.05$. prueba de rangos múltiples de Duncan.

Por otra parte, la liberación de NO de la línea J774 A2 inducida por el LPS bacteriano disminuyó hasta 3.2 veces (68%) cuando los macrófagos fueron preincubados (4 horas) con concentraciones crecientes de la TC. entre 25 y 100 ng mL^{-1} antes de añadir el LPS (Figura 7B) Al comparar las concentraciones de NO₂ inducidas por el LPS bacteriano en presencia de las diferentes concentraciones de la TC o en ausencia de ella se evidenció que todas las concentraciones de la TC disminuyeron significativamente la producción del NO en los macrófagos

expuestos al LPS del microorganismo Además, la inactivación por calor de la TC o la adición en los cultivos del AcM 4E1G5 (100 ng mL⁻¹) eliminó o disminuyó significativamente la inhibición ejercida por esta toxina sobre la producción de NO de los macrófagos frente al LPS bacteriano (Figura 7B) En estos experimentos las medias de las concentraciones de NO- se obtuvieron al sustraer los niveles basales de este metabolito producidos por los macrófagos sin estimular

Efecto de la TC sobre la producción del TNF- α de los macrófagos.

La estimulación de la línea J774.A2 con la TC (100 ng mL⁻¹) no indujo a los macrófagos a producir cantidades detectables del TNF- α (Figura 8A). En esta misma figura se muestra que la combinación del LPS bacteriano y la TC elevó la cantidad de esta citocina 2 veces (50%) en los cultivos de células J774 A2. con independencia de si la toxina era añadida conjuntamente (LPS/TC) o 4 horas antes (TC/LPS) que el LPS de *V cholerae* 01. Al comparar las concentraciones del TNF- α inducidas por el LPS bacteriano en presencia o ausencia de la TC (100 ng mL⁻¹) se comprobó que tanto la incubación simultánea como la preincubación con esta toxina incrementó significativamente la producción de esta citocina en los macrófagos expuestos al LPS de los vibriones 01 (Figura 8A).

Por otra parte, en la Figura 8B se muestra que la producción del TNF- α inducida por el LPS bacteriano en la línea J774 A2 aumento hasta 2.1 veces (53%) cuando los macrófagos fueron incubados conjuntamente con el LPS y la TC en concentraciones crecientes (25-100 ng mL⁻¹). Al comparar las concentraciones del TNF- α inducidas por el LPS bacteriano en presencia de las diferentes concentraciones de la TC o en ausencia de ella se evidencio que todas las concentraciones de la TC aumentaron significativamente la producción de esta citocina en los macrófagos expuestos al LPS del microorganismo Además, la inactivación por calor de la TC o la adición en los cultivos del AcM 4E1G5 (100 ng mL⁻¹) elimino o disminuyó significativamente el incremento ejercido por esta toxina sobre la producción del TNF α en los macrófagos expuestos al LPS bacteriano (Figura 8B). En estos experimentos las medias de las concentraciones del TNF- α se obtuvieron al sustraer los niveles basales de la citocina producida por los macrófagos sin estimular

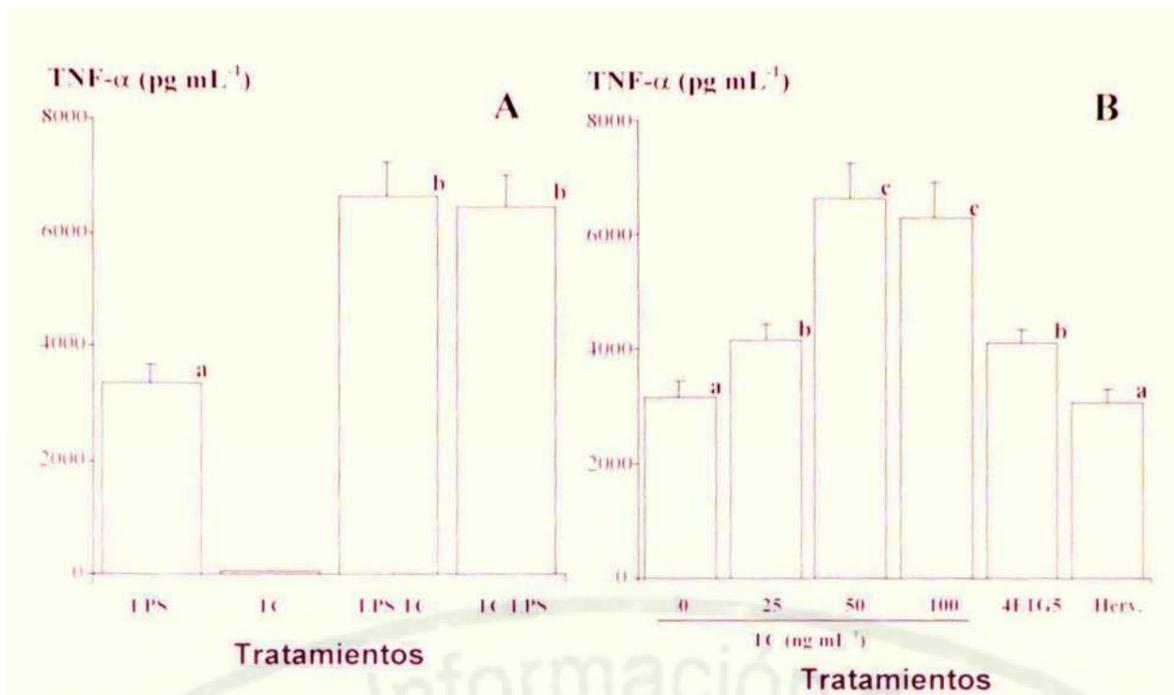


Figura 8 Efecto de la TC sobre la respuesta del TNF- α de los macrófagos frente al LPS bacteriano. (A) TC (100 ng mL⁻¹) añadida a los macrófagos sola, conjuntamente con LPS (1 pg mL⁻¹, LPS/TC) o 4 horas antes que el (TC/LPS). (B): Concentraciones crecientes de la TC añadidas a los cultivos conjuntamente con el LPS Herv: TC (100 ng mL⁻¹) hervida 5 minutos antes de añadirla a los cultivos 4E1G5: AcM (100 ng mL⁻¹) añadido a cultivos que contenían TC (100 ng mL⁻¹). Los resultados se expresan como la media \pm DS de 5 determinaciones en cada uno de 3 experimentos realizados ANOVA de clasificación simple. Letras diferentes indican diferencias significativas con $\alpha = 0.05$. prueba de rangos múltiples de Duncan.

Efecto de la TC sobre la respuesta de explosión respiratoria de los macrófagos.

La estimulación de la línea J774 A2 con la TC (100 ng mL⁻¹) no indujo la RER en los macrófagos (Figura 9). Sin embargo, en esta misma figura se muestra que la TC (100 ng mL⁻¹) disminuyó la RER de los macrófagos frente al FMA en un 22% y un 45% cuando fue añadida de conjunto con el FMA ó 4 horas antes que él. respectivamente Al comparar las áreas bajo las curvas (ABC mV min⁻¹) de la RER de los macrófagos frente al FMA en presencia o ausencia de la TC (100 ng mL⁻¹). se comprobó que tanto la incubación simultanea como la preincubación con esta toxina disminuyo significativamente la RER de los macrófagos expuestos al FMA (Figura 9) Además tanto la inactivación por calori de la TC como la adición en los cultivos del AcM 4E1G5 (100 ng mL⁻¹) eliminaron la acción ejercida por esta toxina sobre la RER de los macrófagos expuestos al FMA (Figura 9) En ningún caso se observó este tipo de respuesta en los macrófagos sin estimular

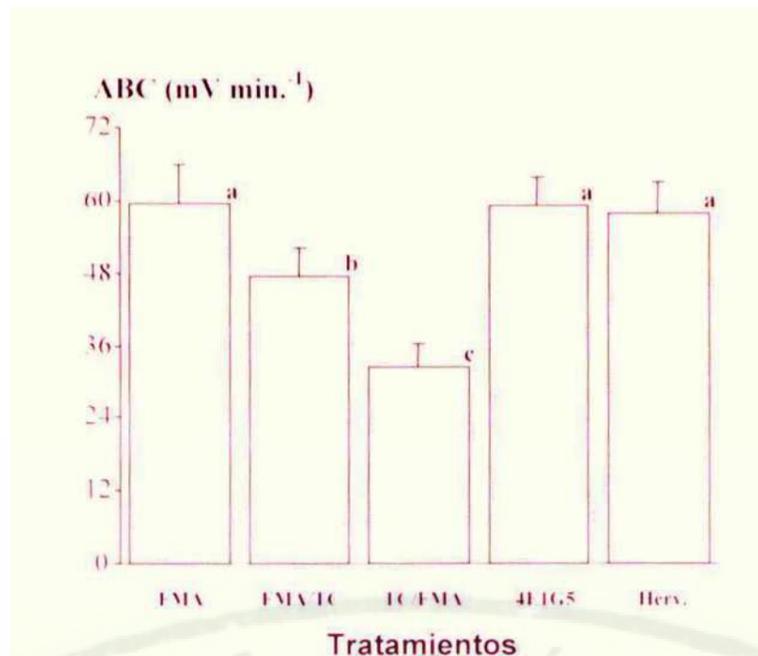


Figura. 9 Efecto de la TC sobre la RER de la línea celular J774.A2 inducida por FMA. TC (100 ng ml⁻¹) añadida a los macrófagos sola, conjuntamente con el FMA (FMA/TC) o 4 horas antes que él (TC/FMA). Las señales quimioluminiscentes fueron medidas por 5 min. a intervalos de 1 min. y se calculó el área bajo la curva de respuesta (ABC, mV min⁻¹). Herv: TC (100 ng mL⁻¹) hervida 5 minutos antes de añadirla a los macrófagos. 4E1G5 AcM (100 ng mL⁻¹) añadido a las suspensiones que contenían TC (100 ng mL⁻¹). Los resultados se expresan como la media ± DS de 5 determinaciones en cada uno de 3 experimentos realizados. ANOVA de clasificación simple. Letras diferentes indican diferencias significativas con $\alpha = 0.05$. prueba de rangos múltiples de Duncan.

4. 4 Ensayos controlados en voluntarios con cepas vacunales de *V. cholerae*.

Diarreas y títulos de lactoferrina en los voluntarios.

Varios ensayos controlados en humanos se han realizado en Cuba para evaluar la seguridad e inmunogenicidad de las cepas vivas candidatas vacunales de cólera. En la Tabla 6 se muestran las diarreas producidas por cada una de las cepas estudiadas, al ser inoculadas oralmente en voluntarios sanos. También se muestra la presencia de lactoferrina en las heces de los voluntarios que recibieron las cepas vacunales y el placebo. Como puede observarse, la cepa reactogénica JBK70 produce diarreas en el 50% de los voluntarios y la cepa 81 en el 37.5%. A su vez, solo uno de los placebos de estos dos ensayos tuvo 2 deposiciones reactogénicas. Por el contrario, la cepa 638 no produjo diarrea en ninguno de los 9 vacunados, ni los placebos de su ensayo tuvieron este síntoma (Tabla 6). Además las diarreas de los voluntarios inoculados con la cepa reactogénica JBK70 alcanzan un alto grado (IV), mientras que los inoculados con la cepa 81, aun-

que de no tan alto grado (III). presentaron diarreas con un promedio de 9 por voluntario

TABLA 6 Diarreas y presencia de lactoferrina en las heces de los voluntarios inoculados con cepas vacunales vivas de *V cholerae*

Diarreas y lactoferrina en las heces de los Voluntarios	Inoculo y Numero de Voluntarios					
	638 n = 9	Placebo' n = 9	81 n = 8	Placebo n = 4	JBK70 n = 8	Placebo" n = 4
Diarrea (%)	0(0)	0(0)	3 (37.5)	1 (25)	4 (50)	0(0)
Episodios Prom. (Rango)			9 (6-13)	2 (-)	2.6 (1-5)	
Grado			III	III	III y IV	
Lactoferrina (%)	4 (44) ^{ns}	0(0)	8 (100) ^{**}	0(0)	8 (100) ^{**}	0(0)

¹El inoculo de todas las cepas fue ajustado a 10⁷ UFC/voluntario.

^{2,3 y 4} Voluntarios que recibieron placebo en cada uno de los tres ensayos realizados

⁵Numero promedio de diarreas en un máximo de 72 horas

^{**}Diferencias significativas con los placebos de su ensayo para $\alpha = 0.05$. Prueba exacta de Fisher

^{ns} Diferencias no significativas con los placebos de su ensayo para $\alpha = 0.05$ Prueba exacta de Fisher.

Por otra parte, todos los voluntarios inoculados con la cepa vacunal reactogémica JBK70 y la 81 excretaron lactoferrina en sus heces, mientras que esta proteína sólo fue detectada en las heces del 44% de los voluntarios que recibieron la cepa 638 Ninguno de los voluntarios antes de ser inoculados o aquellos que recibieron placebo, excretaron niveles detectables de lactoferrina (Tabla 6). Al realizar el análisis estadístico de estos resultados, donde se comparó la presencia de lactoferrina en las heces de los voluntarios inoculados con cada una de las cepas con relación a los placebos de sus ensayos, pudimos constatar que solamente la cepa reactogémica JBK70 y la 81 muestran diferencias significativas con los placebos de sus respectivos estudios (Tabla 6)

Un analisis más detallado de la presencia y la cantidad de lactoferrina excretada por los voluntarios en los diferentes ensayos realizados se grafica en la Figura 10 En dicha figura se muestran los resultados del titulo máximo de aglutinación al-

canzado por cada voluntario en el ensayo de aglutinación con látex en los 5 días ensayados

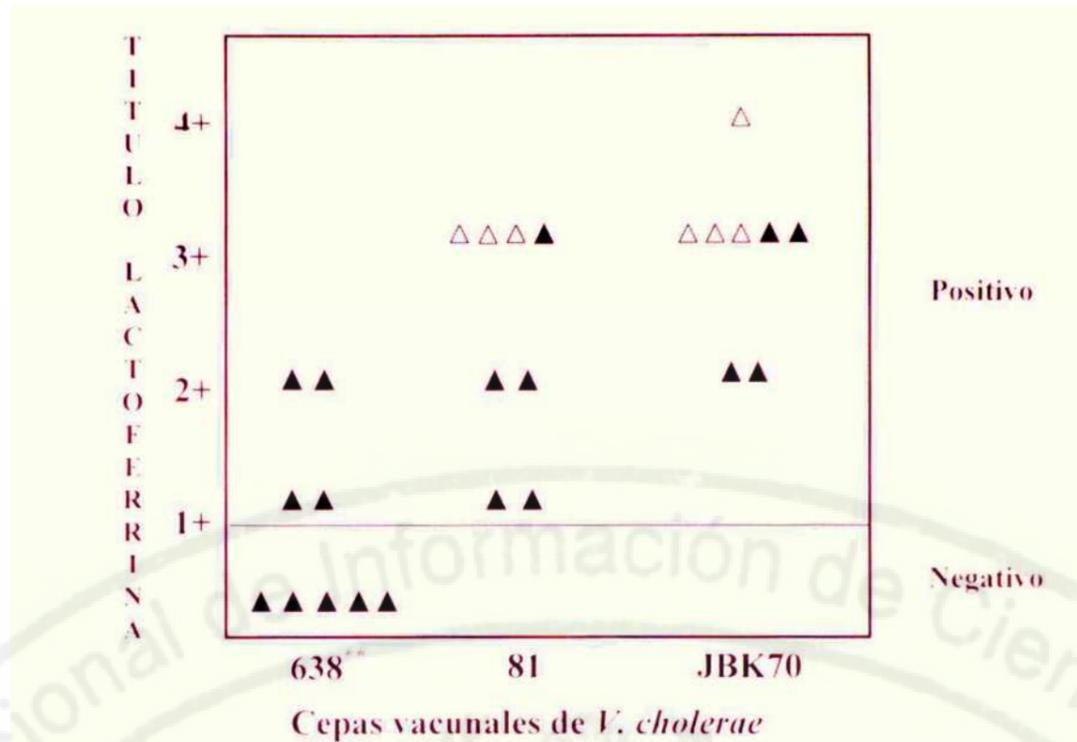


Figura 10 Título de lactoferrina en las heces de los voluntarios inmunizados con diferentes cepas vacunales de *V. cholerae*. Se representa el título máximo alcanzado en cada voluntario en los 5 días ensayados (▲). También se representa los voluntarios que tuvieron diarrea con cada cepa (▼). Diferencias significativas ($G = 22.8$). Tabla de contingencia R x C y prueba de probabilidad logarítmica

Como puede observarse, de los 8 voluntarios que recibieron la cepa reactogemca JBK70 dos de ellos tuvieron títulos de 2 + cinco de 3+ y uno alcanzó 4+ (máximo título) De igual forma, cuatro de los 8 vacunados con la cepa 81 dieron valores de aglutinación de 3+ y el resto se distribuyó entre 1+ y 2+. Por el contrario, de los 9 voluntarios inoculados con la cepa 638 sólo dos de ellos alcanzaron valores de aglutinación de 2+ y los otros dos positivos dieron 1+. Al estudiar la dependencia del tipo de cepa con la producción de lactoferrina en los voluntarios, se encontró una diferencia significativa entre las cepas JBK70 y 81 con respecto a la cepa 638 (Figura 10) Además al comparar la inducción de diarreas y la mayor o menor presencia de lactofemna en las heces de los voluntarios inoculados con cada cepa vacunal no se encontraron diferencias significativas aun cuando existió una tendencia hacia que los voluntarios con este sintonía alcanzaran los Títulos máximos de lactoferrina en cada grupo de estudio (Figura 10)

5- Discusión.

Las interacciones de los vibriones y sus principales factores de virulencia con las células del epitelio intestinal y de las placas de Peyer, juegan un papel fundamental en la patogénesis y la inmunidad del cólera. Estas interacciones inducen la producción de mediadores en las células epiteliales, que son los responsables del cólera clínico (Kaper y col. 1995) y estimulan una potente respuesta inmune que protege a los humanos contra la enfermedad (Glass y col. 1983. Jertborn y col. 1986, Qadri y col. 1997a y Qadri y col., 1997b). Sin embargo, muy poco se sabe de las interacciones de los vibriones y sus componentes con las células epiteliales y el sistema inmune mucosal, así como de los mediadores inducidos por estas interacciones. que puedan causar los efectos adversos observados en los voluntarios inoculados con las cepas vacunales de cólera En esta tesis se estudió la inducción de mediadores inflamatorios en células de la línea de epitelio intestinal HT29-18N2 por la acción de cepas vacunales vivas y muertas de *V cholerae* Solamente se han desarrollado dos modelos *in vitro* que emplean las líneas celulares de epitelio intestinal humano T84 y HT29-18N2 para estudiar las interacciones entre las cepas vivas de *V cholerae* y las células del epitelio intestinal (Benitez y col 1997 y Mel y col . 2000) No obstante en ninguno de ellos las células epiteliales se mantienen en contacto con los vibriones por más de 3 horas Como es sabido, los estudios de inducción de mediadores inflamatorios en las células de epitelio intestinal necesitan tiempos superiores a las 4 horas (Kagnoff y Eckmann. 1997 Witthoft y col .1998 y Steiner y col.. 2000). por lo que fue necesario evaluar mayores tiempos de incubación de las cepas de *V. cholerae* en el modelo de adherencia con células HT29-18N2 desarrollado con anterioridad (Benítez y col . 1997) En la presente tesis, las células de la línea epitelial mantuvieron una alta vitalidad al ser expuestas a las diferentes cepas de *V cholerae* Se debe señalar que esta alta sobrevivencia de las células HT29-18N2 se mantuvo durante las 8 horas de experimentación, lo que permitió adaptar el modelo de Benitez y colaboradores para analizar la inducción de mediadores inflamatorios

A diferencia de otras líneas de epitelio intestinal como son la Caco-2 y la T84. las células de la línea HT29-18N2 tienen la potencialidad de diferenciarse a células productoras de mucina en un medio de cultivo definido (Huet y col , 1987 y Phillips

y col., 1995), lo que propicia que esta línea epitelial asemeje mejor las condiciones intestinales. Es por ello que la escogimos para la experimentación, aún cuando en estos trabajos siempre se utilizó sin diferenciar, ya que el objetivo fundamental de este estudio era evaluar la inducción de mediadores inflamatorios en las células epiteliales por la interacción directa con las cepas vacunales de cólera. En experimentos futuros debemos evaluar cómo varía la respuesta de mediadores inflamatorios en las células HT29-18N2 diferenciadas a células productoras de mucina.

Todas las cepas de *V. cholerae* empleadas en este estudio se adhirieron a las células de la línea HT29-18N2 en igual magnitud en cada uno de los tiempos ensayados (Tabla 2). Lo anterior nos permite aseverar que la respuesta diferencial de mediadores inflamatorios inducida por estas cepas de cólera no se debe a cambios en la adherencia entre ellas. Sin embargo, se ha planteado que las cepas *hap* como es el caso de la 638 (Tabla 1), se adhirieron más que sus parentales *hap** a la línea HT29-18N2 diferenciada (Benítez y col., 1997). Las diferencias de adherencia entre las cepas *hap* positivas y negativas de este estudio con las del estudio de Benítez y colaboradores, pueden deberse a que el medio de cultivo empleado por nosotros inhibe la expresión de la HAP en cepas de *V. cholerae hap'* (datos no mostrados). Esta inhibición debe ocurrir por los altos niveles de glucosa del medio de cultivo (4.5 gr/L), ya que se ha informado que este azúcar inhibe fuertemente la expresión de la HAP en *V. cholerae* (Benítez y col., 1997). Por otra parte, en el trabajo de Benítez y col. (1997) se utilizó la línea HT29-18N2 en la condición que induce la producción de mucina, lo cual no se cumple en nuestro caso. Lo anterior puede también justificar las diferencias de adherencia entre los dos experimentos, si tenemos en cuenta que la influencia de la capa de mucus en la adherencia de este microorganismo a la línea HT29-18N2 no ha sido estudiada.

No hay antecedentes del empleo de células de epitelio intestinal en el estudio de la inducción de mediadores inflamatorios por la adherencia de cepas de *V. cholerae*. No obstante, se ha demostrado que todos los mediadores inflamatorios estudiados aquí son expresados por las células de la línea HT29 (de donde proviene la HT29-18N2) en respuesta a variados estímulos (Eckmann y col., 1993b).

Jung y col. 1995 y Li y col, 1998); dentro de éstos se encuentran microorganismos patógenos, TNF- α , IL-1 α , IFN- γ o combinaciones de estas tres citocinas. En esta tesis se demuestra que las células de la línea HT29-18N2 son capaces de expresar transcritos de un amplio grupo de mediadores inflamatorios, que incluyen la IL-8, el TNF- α , la MCP-1, la iNOS y el GM-CSF, pero no la IL-1 α y el TGF- β 1 (Figura 1). La expresión de ARNm de estas dos últimas citocinas en la línea epitelial HT29 ha sido contradictoria. Por una parte, se ha informado que ambas se expresan constitutivamente por las células de esta línea de epitelio intestinal (Eckmann y col 1993b y Lügering y col . 1998) y, por otra, existen informes que aseguran que estas citocinas no son expresadas por las células HT29 (Jung y col 1995 y Rasmussen y col.. 1997). Teniendo en cuenta que las células HT29- 18N2 provienen de la línea HT29 una posible explicación a la no expresión de estas citocinas si la línea parental las produjera, sería que en el proceso de selección se perdieron las células con capacidad de expresar IL-1 α y TGF- β 1. La inducción de los ARNm de tres citocinas inflamatorias (IL-8, TNF- α y GM-CSF) por las cepas vacunales de *V cholerae* en las células de la línea HT29-18N2 (Figuras 2, 3 y 4), concuerda con informes anteriores, donde se ha observado la inducción de estas citocinas en células de epitelio intestinal expuestas a otros microorganismos patógenos (Jung y col 1995 y Kagnoff y Eckmann 1997) y con un informe reciente, donde se detectó la inducción de la IL-8 en la línea T84 por la acción de cepas de *V cholerae* (Zhou y col , 2004). Sin embargo, las células HT29- 18N2 no expresaron ARNm de MCP-1 y de iNOS ni tampoco secretaron la citocina GM-CSF en respuesta a la infección con las cepas vacunales de cólera (Figuras 2 y 3). Una posible explicación a la no expresión de transcritos de MCP- 1 es que *V cholerae* es una bacteria no invasiva y esta citocina se ha visto aumentada fundamentalmente en células epiteliales expuestas a microorganismos invasivos tales como *Salmonella cJablin*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocoli- tica*, *Listeria monocytogenes* y *Echerichia coli* enteromvasiva (Jung y col , 1995, Yang y col 1997 y Warhurst y col 1998). Otra posibilidad es que el o los factores de virulencia que puedan inducir la producción de esta citocina no estén presentes o no sean expresados por las cepas vacunales en estas condiciones de cultivo.

La no expresión de ARNm de la iNOS en las células epiteliales expuestas a las cepas vacunales (Figuras 2 y 3) podría deberse a que estas últimas no producen la TC. ya que se ha demostrado que la inducción de esta enzima en las células de epitelio intestinal de conejo es producida fundamentalmente por la TC y no por el LPS de los vibriones (Janoff y col , 1997). Sin embargo, este aspecto necesitará otros estudios donde se evalúe la acción de la TC y otros componentes de la bacteria sobre la inducción de la iNOS en las células de la línea HT29-18N2 y en cultivos frescos de células de epitelio intestinal humano, para poder esclarecer el papel de estas células en la producción de NO observada en los pacientes con cólera clínico o experimental (Janoff y col., 1997 y Qadri y col.. 2002).

Un resultado inesperado obtenido en este modelo *in vitro* fue la no secreción de GM-CSF en los sobrenadantes de las células epiteliales a pesar de que estas sí expresaron transcritos de esta citocina en respuesta a la incubación con las cepas vacunales de colera (Figuras 2. 3 y 4). Este resultado sugiere que está ocurriendo algún tipo de regulación en la secreción del GM-CSF por las células HT29-18N2 Uno de los mecanismos de regulación de la secreción de atocinas en diferentes tipos de células es la expresión de los receptores de atocinas en la superficie de las células o en forma soluble En este caso podemos decir que las células de epitelio intestinal incluidas las de la línea HT29 expresan receptores de esta atocina en su superficie en niveles similares a los encontrados en los monocitos (Panja y col . 1998). en los cuales se demostró que la secreción del GM- CSF disminuyo cuando se incremento la expresión de los receptores específicos de membrana para esta atocina (Collms. 2000) Lo anterior pone de manifiesto que aun cuando una atocina se este produciendo, su concentración en el sobrenadante de cultivo pudiera disminuir, debido a que la misma puede ser atrapada por sus receptores específicos de membrana

La inducción diferencial de los transcritos de IL-8, TNF- α y GM-CSF por las diferentes cepas vacunales de colera (Figuras 2. 3 y 4) y la mayor producción de IL-8 y TNF- α inducida por las cepas vacunales reactogénicas (Tabla 3), está en concordancia con los niveles de reactogenicidad observados para cada una de ellas en los diferentes ensayos clínicos realizados Asi la cepa CVD103-HgR. que ha sido muy poco reactogénica en los voluntarios (Levme y col. 1988b y Tacket y col 1999), indujo menores niveles de transcritos de las tres atocinas inflamato-

rías (Figura 3) y menos secreción de IL-8 en las células epiteliales (Tabla 3), si se compara con la cepa JBK70 (Figura 2 y Tabla 3). Esta cepa fue muy reactogénica en voluntarios americanos (Levine y col., 1988a) y produjo la mayor cantidad de diarrea en los voluntarios que recibieron las diferentes cepas vacunales (Tabla 6) Por otra parte, la cepa 638 se comportó como la CVD103-PlgR en la inducción de citocinas en el modelo *in vitro* (Figura 3 y Tabla 3). consecuentemente, la cepa 638 no produjo diarreas en ninguno de los voluntarios de este estudio (Tabla 6). Adicionalmente, la cepa 81 se comportó como la JBK70 en la inducción de atocinas inflamatorias (Figura 2 y Tabla 3) y la inoculación oral de la cepa 81 produjo diarrea reactogémica en los voluntarios (Tabla 6) Otro aspecto que debemos resaltar de este estudio en el modelo *in vitro* de células epiteliales, es el hecho de que las cepas 638 y 81 muertas por tratamiento térmico indujeron los mas bajos niveles de ARNm de IL-8 y de producción de esta atocina en las células HT29- 18N2 expuestas a las cepas vacunales de colera (Figura 4 y Tabla 3) Estos niveles de IL-8 deben ser inducidos por componentes superficiales de los vibriones que son termoestables, como es el caso del LPS, que por sí solo puede inducir la expresión de esta atocina en diferentes líneas de epitelio intestinal (Schuere-Maly y col 1994 y Soriam y col . 2002). Sin embargo, estas cepas muertas no indujeron la producción de transcritos de TNF- α . (Figura 4), así como las cepas vivas no reactogémicas (CVD103-HgR y 638) indujeron niveles discretos de ARNm de este importante activador inflamatorio (Figura 3). Además, en las cepas vivas no reactogémicas y en las inactivadas por calor indujeron la producción de la atocina en los sobrenadantes de cultivo. Lo anterior sugiere que el TNF- α producido por las células del epitelio intestinal podría contribuir al establecimiento de una respuesta inflamatoria en los humanos, frente a las cepas vivas candidatas vacunales de cólera en dependencia de la capacidad inductora de la cepa. La menor inducción de mediadores inflamatorios en la línea de epitelio intestinal por las cepas muertas de *V cholerae* (Figura 4 y Tabla 3) está en concordancia con los resultados obtenidos en humanos con las vacunas muertas de cólera, las cuales no han producido efectos adversos en los voluntarios inmunizados (Trach y col . 1997 y 2002)

Los experimentos con aditamentos tipo Transwell en la presente tesis demostraron que para que ocurra una respuesta de atocinas en las células epiteliales por

la acción de cepas vacunales de cólera, son imprescindibles las interacciones directas entre los vibriones y las células (Figura 5 y Tabla 3). Un hecho que apoya lo anterior, es que cepas vacunales no móviles de *V. cholerae* que tienen una menor capacidad de interactuar directamente con las células enterocíticas han mostrado menor reactividad que sus parentales móviles en ensayos con voluntarios (Mekalanos y col . 1995). Estos experimentos sugieren que algún factor (es) asociado (s) al microorganismo, por si solo, o en combinación con un factor (es) soluble (s) producido (s) por estas cepas vacunales durante sus interacciones con las células HT29-18N2, son los responsables de la mayor inducción de atocinas inflamatorias de las cepas vacunales reactivas de *V. cholerae*. Las toxinas accesorias ZOT, ACE, HylA, RTX y la proteína HAP han sido presentadas como posibles factores reactivos por sus actividades específicas sobre las células epiteliales (Mel y col., 2000. Fulner y col. 2001 y Fullner 2003) Todos los genes que codifican para estas proteínas están presentes en la cepa JBK70. mientras que la cepa 81 solo tiene intactos los genes de HylA, RTX y HAP, la cepa 638 los de HylA y RTX y la CVD103-HgR el de HAP. Entonces podemos establecer una relación entre la mayor presencia de estos genes en las cepas vacunales y la mayor inducción de mediadores inflamatorios en las células HT29- 18N2 (JBK70 > 81 y ambas > 638 y CVD103-HgR. Tabla 3) Lo anterior también coincide con los niveles de reactividad producidos por estas cepas en los estudios en voluntarios, ya que la cepa JBK70 fue reactiva en voluntarios cubanos (Tabla 6) y norteamericanos (Levine y col . 1988a). la cepa 81 fue considerada reactiva en este estudio (Tabla 6), la 638 no fue reactiva en voluntarios cubanos (Tabla 6) y la CVD103-HgR produjo muy bajos niveles de reactividad en voluntarios americanos (Levine y col. 1988b) Sin embargo, con las cepas vacunales estudiadas, resulta muy difícil establecer una relación directa entre cada uno de los posibles factores reactivos del microorganismo y la inducción de mediadores inflamatorios en las células epiteliales, ya que estas cepas provienen de diferentes parentales toxigénicos con un fondo genético diferente. Para lograr este objetivo, se deberán realizar experimentos que incluyan los posibles factores reactivos purificados y/o cepas imitantes isogénicas de *V. cholerae* con mutaciones específicas en cada uno de ellos, para luego reincorpo-

rar estos genes en las mismas cepas y evaluar la respuesta de mediadores inflamatorios de las células epiteliales

Una vez que los vibriones llegan a las células epiteliales del intestino delgado e interactúan con ellas, estas bacterias y sus principales componentes son transportados por las células M hacia la zona subepitelial donde tienen su primer encuentro con los macrófagos y las células dendríticas lo que induce una variada gama de respuestas que pueden conducir al establecimiento de un proceso inflamatorio (Siebers y Finlay, 1996, Mowat y Viney, 1997 y Sanz, 2001)

En esta tesis se demostró que el LPS de *V cholerae* principal componente de la superficie de las bacterias Gram negativas, induce una respuesta de NO y del TNF- α en la línea de macrófagos murinos J774 A2, pero no la RER (Figura 6). El aumento de la expresión de un mediador con actividad anti-bacteriana y la producción de una citocina inflamatoria en los macrófagos estimulados con el LPS de este microorganismo, concuerdan con lo observado en varios estudios donde los macrófagos produjeron un grupo de citocinas inflamatorias en respuesta al LPS bacteriano (Medzhitov, 2001 y Takayama y col . 2002)

Analizando de conjunto los resultados de los dos modelos *in vitro*, podemos decir que la acción del LPS bacteriano sobre los macrófagos podría ejercer una función potenciadora de la respuesta inflamatoria iniciada por las interacciones directas entre las cepas vacunales de colera y las células del epitelio intestinal. Además, los mediadores inflamatorios producidos por las células epiteliales y los macrófagos en estos experimentos, tienen la potencialidad de inducir el comienzo y la amplificación de una respuesta inflamatoria en la mucosa intestinal, con la participación fundamental de leucocitos polimorfonucleares. Lo anterior coincide con el hecho, de que los voluntarios que recibieron la cepa vacunal reactogénica CVD110 tenían la más alta presencia de neutrófilos en el TGI (Silva y col . 1996). Por otra parte se sabe que estas células inflamatorias pueden inducir una fuerte secreción de CI en las células epiteliales (Madara y col. 1993), lo que podría explicar en parte las diarreas observadas en los voluntarios que son inoculados oralmente con las cepas vacunales reactogénicas.

Entonces una diferencia importante surge de todos estos análisis las cepas vacunales reactogénicas de *V cholerae* inducen la más alta producción de mediadores inflamatorios en las células epiteliales (Tabla 3) y provocan diarreas

en los voluntarios de éste (Tabla 6) y otros estudios (Levine y col , 1988a, Tacket y col, 1993 y Taylor y col, 1994) Estas diarreas tienen un mayor componente inflamatorio que las diarreas de los voluntarios que fueron inoculados con cepas toxigénicas de *V. cholerae* (Silva y col., 1996) Lo anterior sugiere que las diarreas del cólera clínico y experimental tienen una naturaleza menos inflamatoria que las producidas por las cepas vacunales reactogénicas de cólera De hecho, se ha sugerido que algún factor presente en las cepas toxigénicas y que a su vez hubiera sido eliminado de las cepas vacunales de *V. cholerae*. como es el caso de la TC podría regular la inflamación en los humanos infectados con *V. cholerae* (Silva y col 1996) Además, se ha informado que algunas cepas de *V. cholerae* 01 y de la mayoría de los aislados de los serogrupos no-01 que no tienen los genes de la TC producen una patología diferente al cólera en los individuos infectados (Singh y col 2001) Por ejemplo, una cepa no toxigénica de *V. cholerae* 01 ha producido brotes de gastroenteritis en Arabia Saudita (Bubshait y col., 2000) con síntomas muy parecidos a los que provocó la cepa vacunal reactogénica JBK70. que tiene deletados los genes de la TC. en los voluntarios inoculados (Levine y col 1988a)

Se sabe que la TC induce un patrón de citoquinas en las células epiteliales que podría crear un ambiente anti-inflamatorio en la mucosa intestinal (McGee y col 1993 y Soriam y col 2002) Sin embargo, la modulación que la TC puede ejercer sobre la inducción de citoquinas inflamatorias en células epiteliales expuestas a diferentes microorganismos no ha sido suficientemente explorada.

En esta tesis se demuestra que las cepas toxigénicas de *V. cholerae* inducen menos IL-8 que las cepas vacunales en el modelo *in vitro* con células epiteliales (Tabla 5). aún cuando los niveles de la TC producidos por las cepas toxigénicas en los cultivos de HT29-18N2 fueron inferiores a los que ellas producen en las condiciones óptimas de expresión de esta toxina *in vitro* (Tabla 4) Las bajas concentraciones de la TC obtenidas en estos experimentos coinciden con un estudio realizado en células de la línea de colon T84 donde las cepas toxigénicas de cólera produjeron concentraciones similares de la TC a las encontradas por nosotros Estas concentraciones de toxina fueron capaces de inducir cambios en las propiedades eléctricas de las monocapas de células de epitelio intestinal T84 (Fullner y col 2001) Adicionalmente. la TC inhibió la producción de IL-8 de las

células HT29-18N2 estimuladas con las cepas vacunales de cólera (Tabla 5) La inhibición producida por la TC pudiera ocurrir por la inducción de AMPc y PGE₂ en las células epiteliales, ya que diferentes trabajos sustentan la producción de estos dos metabolitos en varios tipos de células estimuladas con la TC (Peterson y col 1989 y 1994) Sin embargo, la regulación que el AMPc y la PGE₂ ejercen sobre la expresión de la IL-8 en líneas epiteliales ha sido contradictoria, por una parte se ha planteado que estos metabolitos aumentan la expresión de la IL-8 en la línea de epitelio intestinal humano T84 (Yu y col.. 1998) y por otra, se ha visto que un análogo de la PGE₂ inhibe la inducción de esta citocina en tres líneas de colon humano, incluida la T84. estimuladas con LPS e IL-1 (Toshina y col.. 2000). Además, se ha demostrado que un análogo del AMPc inhibe la producción de la IL-8 en células estimuladas de una línea epitelial de vía aérea humana (Burvall y col.. 2003) Teniendo en cuenta lo anterior, se deberá estudiar que mecanismos y mediadores están involucrados en la inhibición que la TC ejerce sobre la producción de la IL-8 en esta línea celular.

Otro resultado interesante fue que la TC sola no indujo la producción de ninguno de los mediadores inflamatorios analizados en los dos modelos estudiados (Tabla Figuras 7A y 8A). Sin embargo, la TC reguló negativamente la producción de mediadores con actividad anti-bacteriana en los macrófagos (Figuras 7 y 9) y aumentó la producción del TNF- α inducida por LPS en las células de la línea J774 A2 (Figura 8)

La inhibición de la producción de NO por la TC (Figura 7) es posible que ocurra a través de la inducción de AMPc cíclico y PGE₂ ya que se ha informado que la PGE₂ y el AMPc reprimen la síntesis de la iNOS en la línea J774.A2 (Pang y Hoult. 1997) y se sabe que la TC aumenta los niveles intracelulares de estos dos compuestos en varios tipos de células (Peterson y col 1989 y 1994) Sin embargo los pacientes de cólera tienen altos niveles de NO₂/NO₃. en la sangre y en la orina (Janoff y col . 1997 y Qadri y col , 2002). lo cual sugiere que la producción de NO debe ser uno de los componentes de la defensa innata de los humanos contra el cólera No obstante, los mecanismos y las células responsables de la producción de NO no se conocen, pero se ha postulado que este compuesto podría provenir fundamentalmente de las células del epitelio intestinal inducido por la acción de la TC y no de las células de la zona subepitelial (Janoff y col . 1997).

Por otra parte, los niveles aumentados de AMPc también reducen la RER por la activación de proteínas cinasas dependientes de AMPc (Bengis-Garber y Gruener, 1996), lo que explicaría la acción de la TC sobre la respuesta de los macrófagos frente al FMA (Figura 9). No obstante, se piensa que el estrés oxidativo puede jugar un papel en la respuesta inmune innata contra el cólera, ya que se ha observado que los pacientes que contraen la enfermedad tienen niveles elevados de superóxido dismutasa en el suero y de mieloperoxidasa en la mucosa intestinal y las heces (Qadri y col., 2002). Además, se ha demostrado que cepas de *V. cholerae* con un fenotipo de hipersensibilidad a los iones peróxidos no colonizan el intestino de los conejos (Kumar y col., 1994 y Baumler y Heffron, 1995). Estos efectos sugieren que la TC tiene también una acción anti-inflamatoria en los macrófagos. Sin embargo, la TC aumentó la producción de TNF- α inducida por el LPS (Figura 8), aún cuando se sabe que el aumento de AMPc y PGE₂, que produce esta toxina, son potentes reguladores negativos de la expresión del TNF- α (Manogue y col., 1991). En favor de esta discrepancia podemos decir que la modulación de esta citocina inflamatoria por la TC ha sido contradictoria y dependiente del tipo de célula empleada (Leal y col., 1996 y Altavilla y col., 1996). Pero en la mayoría de los informes más recientes donde se han empleado macrófagos o monocitos humanos, esta toxina ha inhibido la producción del TNF- α inducida por el LPS de las bacterias. Para sólo poner un ejemplo, la TC inhibió fuertemente la producción del TNF- α en monocitos humanos estimulados con concentraciones saturantes del LPS de *Escherichia coli* (Bagley y col., 2002). Por lo anterior, creemos se deben realizar nuevos experimentos con macrófagos o monocitos humanos para esclarecer la acción de la TC sobre esta respuesta en el caso del cólera.

La regulación ejercida por la TC sobre la producción de mediadores inflamatorios en las dos líneas celulares empleadas, sugiere que esta toxina pudiera ser el principal factor anti-inflamatorio (postulado por Silva y col., 1996) que marque las diferencias entre las diarreas mayormente secretorias que producen las cepas toxigénicas y las diarreas con mayor componente inflamatorio, producidas por las cepas vacuales de *V. cholerae*. Es decir, la TC podría reprimir la respuesta inmune innata de los humanos contra una infección con *V. cholerae* 01 u 0139 y, por ello, el componente inflamatorio de las diarreas producidas por las cepas toxi-

genicas de este microorganismo, que serian entonces fundamentalmente secretorias (Silva y col , 1996 y Qadri y col., 2002) Por el contrario, cuando la TC no está presente, como es el caso de las cepas vacunales vivas de *V cholerae*. se puede exacerbar la respuesta inmune innata y entonces producir una respuesta inflamatoria de la mucosa intestinal que conduzca a la producción de diarreas, que en este caso tendrían un fuerte componente inflamatorio (Silva y col., 1996) Nuevos experimentos deberán ser realizados en este modelo *in vitro* de células de epitelio intestinal y en lineas monocíticas humanas para estudiar la acción independiente y la función anti-inflamatoria de la TC sobre estas células, los cuales deberán ser acompañados de estudios *in vivo* en los modelos animales de cólera

El cólera ha sido considerado tradicionalmente una enfermedad diarreica aguda secretoria y no inflamatoria No obstante, en los últimos años se han presentando evidencias que apuntan a la participación de un proceso inflamatorio en la respuesta de los humanos a la infección con *V cholerae* 01 y 0139 Se ha demostrado que los pacientes en la fase aguda de la enfermedad tienen mas leucocitos polimorfonucleares y macrófagos en la mucosa intestinal que los voluntarios sanos (Mathan y col., 1995). Además, estos pacientes tienen una mayor presencia de mediadores inflamatorios (lactoferrina, NO, prostaglandina E₂, proteína C reactiva y superóxido dismutasa) en el suero, la mucosa y las heces que los sujetos sanos y que los mismos pacientes en la fase de convalecencia (Qadri y col., 2002). No obstante, en esta ultima investigación se reconoció que la presencia de las células y los mediadores inflamatorios fue de bajo grado y que posiblemente solo sirviera para disminuir la cantidad de vibriones en el intestino y ayudar al establecimiento de la respuesta inmune adaptativa contra este microorganismo (Qadri y col . 2002)

Por el contrario, las cepas vacunales reactogénicas de colera parecen producir en los voluntarios una diarrea fundamentalmente inflamatoria ya que se ha demostrado que las muestras de heces de los voluntarios inmunizados por vía oral con la cepa reactogénica CVD110. contenían altos niveles de lactoferrina y valores incrementados de IL 8 mientras que la cepa no reactogénica CVD103-HgR no indujo grandes cantidades de lactoferrina ni de IL-8 en las heces de los voluntarios (Silva y col 1996) La interleucina-8 es un potente quimioatrayente de neutrófilos y linfocitos T (Oppenheim y col 1991 y Eckmann y col . 1993a). los

primeros acumulan gran cantidad de lactoferrina en sus granulos secundarios (Sánchez y col . 1992). por lo que dicha proteina ha sido considerada un marcador de la presencia de neutrófilos en las heces (Guerrant y col 1992)

En esta tesis quedó confirmada la reactividad de la cepa JBK70 (Levine y col . 1988a), ya que la misma produjo diarreas reactivas en el 50% de los voluntarios cubanos (Tabla 6) Por su parte, la cepa 81 produjo diarrea reactiva en el 37.5% de los voluntarios (Tabla 6). lo que hace que esta cepa fuera considerada reactiva Por el contrario, la cepa 638 fue considerada como no reactiva ya que no produjo diarrea en ninguno de los 9 voluntarios inoculados con ella (Tabla 6). Además, en este estudio se confirma lo encontrado por Silva y colaboradores en 1996. ya que con el empleo de cepas diferentes, demostramos que las cepas reactivas JBK70 y 81 inducen mayores niveles de lactoferrina en las heces de los voluntarios que la cepa no reactiva 638 (Tabla 6 y Figura 10) Además, aun cuando no se alcanzaron diferencias significativas, si se observo una tendencia hacia que los voluntarios que tuvieron diarreas presentaran los mas altos niveles de lactoferrina en sus heces. Todo lo anterior reafirma la presencia de un componente inflamatorio en las diarreas de los voluntarios que reciben las cepas vacunales de cólera el cual es mayor en las cepas vacunales que resultan reactivas Para confirmar la mayor inducción de un proceso inflamatorio intestinal por la acción de cepas vacunales reactivas de cólera se deberán realizar ensayos en voluntarios con cepas toxigenas y vacunales de *V cholerae* y estudiar la presencia de células inflamatorias y la expresión de mediadores inflamatorios en la sangre y las heces de los voluntarios Si analizamos de conjunto todo lo discutido hasta aquí, veremos que en estos trabajos se aportan evidencias del componente inflamatorio de la reactividad y se ofrecen nuevos conocimientos que pueden ayudar a la mejor comprensión de los mecanismos que median los efectos adversos producidos por las cepas vivas candidatas vacunales de cólera al ser inoculadas en los humanos Además, demostramos que el modelo de células HT29-18N2 es útil para estudiar la reactividad de los candidatos vacunales de colera antes de que pasen a los estudios en humanos, así como brindamos evidencias de que dicho modelo puede servir para estudiar los factores del microorganismo que inducen la respuesta diferencial de atocinas en la línea celular HT29-18N2

6- Conclusiones.

- 1- Las cepas vacunales de *V. cholerae* y su principal componente superficial el LPS bacteriano, inducen una secreción de mediadores inflamatorios en modelos de células de epitelio intestinal y de macrófagos que guarda relación directa con la capacidad de las cepas vacunales de producir reactividad en los humanos
- 2- La interacción directa entre las cepas vacunales de cólera y las células de la línea HT29-18N2 son imprescindibles para que éstas produzca una respuesta de citocinas inflamatorias
- 3- La toxina de cólera modula la respuesta de mediadores inflamatorios de las líneas celulares HT29-18N2 y J774 A2 expuestas a las cepas vivas de *V. cholerae* y al LPS bacteriano, respectivamente, lo que apunta hacia un papel regulador de la inflamación de esta toxina en el cólera
- 4- Las cepas vacunales de *V. cholerae* que producen reactividad. inducen una mayor presencia de neutrófilos en el TGI de los individuos inoculados que las cepas no reactivas, lo cual representa una evidencia del componente inflamatorio de la reactividad

7- Recomendaciones.

- 1- Realizar experimentos en macrófagos ó monocitos humanos de inducción de mediadores inflamatorios por la acción del LPS de *V cholerae* y evaluar la modulación que la TC produce sobre dicha respuesta
- 2- Evaluar la acción de posibles factores reactogénicos purificados, así como de cepas de *V cholerae* con mutaciones específicas en cada uno de ellos sobre la respuesta de mediadores inflamatorios de la línea de epitelio intestinal HT29- 18N2
- 3- Diseñar nuevos experimentos en el modelo *in vitro* de células de epitelio intestinal. diferenciadas o no. para estudiar la función reguladora de la TC sobre la respuesta de mediadores inflamatorios en estas células. Estos experimentos deberán ser acompañados de estudios *in vivo* en los modelos animales de cólera
- 4- Estudiar la presencia de células y mediadores inflamatorios en el suero y las heces de voluntarios inoculados oralmente con cepas toxigénicas y vacunales de *V cholerae*. para confirmar que las cepas vacunales reactogénicas inducen una mayor respuesta inflamatoria que las cepas no reactogénicas o toxigénicas de *V. cholerae*

8- Bibliografía.

- Abul. K., A. Abbas, H. Lichtman and S. Pober. 1995.** Citocinas In Me Graw Hill (ed). Inmunología celular y molecular Elsevier, New York 412-425
- Aggarwal, B. B., B. Moffat and R. N. Harkins. 1984.** Human lymphotoxin Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization J Biol Chem 259 686-691
- Albert, M. J. 1994.** Mireview *Vibrio cholerae* 0139 Synonym Bengal J Clin. Microbiol 32 2345-2349
- Albu, D. I., A. Jones-Trower, A. M. Woron, K. Stellrecht, C. C. Broder and D. W. Metzger. 2003.** Intranasal vaccination using interleukin-12 and cholera toxin subunit B as adjuvants to enhance mucosal and systemic immunity to human immunodeficiency virus type 1 glycoproteins J Virol 77: 5589-5597
- Altavilla, D., F. Squadrito, P. Canale, M. Loculano, G. M. Campo, G. Squadri- to. A. Sandela and A. P. Caputi. 1996.** Endotoxin tolerance impairs a pertussis- toxin sensitive G protein regulating TNF- α release by macrophages from tumour-bearing rats Pharmacol Res 33 203-209
- Arnold. R. R., M. Brewer and J. J. Gauthier. 1980.** Bactericidal activity of human lactoferrin sensitivity of a variety of microorganisms Infect Immun 28 893-898
- Attridge, S. R., P. A. Manning. J. Holmgren and G. Jonson. 1996.** Relative significance of mannose-sensitive hemagglutinin and toxin-coregulated pili in colonization of infant mice by *Vibrio cholerae* El Tor Infect Immun. 64 3369- 3373
- Bagley. K. C., S. F. Abdelwahab, R. G. Tuskan, T. R. Fouts and G. K. Lewis. 2002.** Cholera toxin and heat-labile enterotoxin activated human monocyte-derived dendritic cells and dominantly inhibit cytokine production through a cyclic AMP-dependent pathway Infect Immun 70 5533-5539
- Barrett, T. J. and P. A. Blake. 1981.** Epidemiological usefulness of changes in hemolytic activity of *Vibrio cholerae* biotype El Tor during the seventh pandemic J Clin Microbiol 13 126-129
- Barton. B. E. 1997.** IL 6 insights into novel biological activities Clin Immunol.Immunopathol 85 16-20
- Baudry, B. A. Fasano, J. Ketley and J. B. Kaper. 1992.** Cloning of a gene (zot) encoding a new toxin produced by *Vibrio cholerae* Infect Immun 60 428-434

Bäumler, A.J. and F. Heffron. 1995. Microbial resistance to macrophage effector functions: strategies for evading microbicial mechanisms and scavenging nutrients within mononuclear phagocytes In *Virulence mechanisms of bacterial pathogens* Roth, J A C A Bolín. K A Brogden, F. H Mimon and M J Wannemuehler. Eds, ASM Press. Washington. DC. 115-129

Bearcroft, C. P., D. Perrett and M. J. G. Farthing. 1996. 5-Hydroxytryptamine release into human jejunum by cholera toxin *Gut* 39 528-531 **Bengis-Garber, C. and N. Gruener. 1996.** Protein Kinase A down regulated phosphorylation of p47phox. A possible pathway for inhibition of the respiratory burst *Cell Signal* 8 291-296

Benitez, J. A., A. J. Silva and R. A. Finkelstein. 2001. Environmental signals controlling production of hemagglutinin/protease in *Vibrio cholerae* *Infect Immun.* 69 6549-6553

Benitez, J. A., A. Silva. B. L. Rodríguez, R. Fando, J. Campo, A. Robert. H. García, L. García. J. L. Perez, R. Oliva, C. A. Torres and T. Ledon. 1996. Genetic manipulation of *V cholerae* for vaccine development Construction of live attenuated El Tor candidate vaccine strains *Arch Med Res* 27 275-283

Benitez, J. A., R. G. Spelbrink, A. Silva, T. E. Phillips, C. M. Stanley, M. Boesman-Finkelstein and R. A. Finkelstein. 1997. Adherence of *Vibrio cholerae* to culture differentiated human intestinal cells an in vitro colonization model. *Infect Immun* 65 3474-3477

Beubler, E., G. Kollar, A. Saria, K. Bukhave and J. Rask-Madsen. 1989. Involvement of 5-hydroxytryptamine, prostaglandin E₂ and cyclic adenosine monophosphate in cholera toxin-induced fluid secretion in the small intestine of the rat in vivo. *Gastroenterology* 96 368-376.

Bougoudogo. F., F. Vely, F. Nato. A. Boutonnier, P. Gounon, J. C. Mazié and J. M. Fournier. 1995. Protective activities of serum immunoglobulin G on the mucosal surface to *Vibrio cholerae* 01 *Bull Inst Pasteur* 93 273-283.

Braun, M. C., J. He, C. Y. Wu and B. L. Kelsall. 1999. Cholera toxin suppresses interleukin (IL)-12 production and IL-12 receptor beta 1 and beta2 chain expression *J Exp Med* 189 541-552

Brown, M. H. and P. A. Manning. 1985. Haemolysin genes of *Vibrio cholerae* presence of homologous DNA in non-haemolytic 01 and haemolytic non-01 strains. FEMS Microbiol Lett 30 197-201

Bubshait, S. A., K. Al-Turki, M. H. Qadri, R. E. Fontaine and D. Cameron. 2000. Seasonal, nontoxicogenic *Vibrio cholerae* 01 Ogawa infections in the Eastern Region of Saudi Arabia Int J Infect Dis. 4 198-202

Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons. 1974. In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th Ed The Williams and Wilkins Co. Baltimore. 342-346

Burvall, K., L. Palmberg and K. Larsson. 2003. Effects by 8-bromo-cyclicAMP on basal and òigame dust-induced release of interleukin-6 and interleukin-8 in A549 human airway epithelial cells Respir. Med. 97 46-50.

Calderwood, S. B. and E. T. Ryan. 2000. Cholera Vaccines Clin Infect Dis 31 561-565

Calia, E. K., M. Murtagh, M. J. Ferraro, and S. B. Calderwood. 1994. Comparison of *Vibrio cholerae* 0139 with *Vibrio cholerae* 01 Classical and El Tor Biotypes Infect Immun 62: 1504-1506

Campos, J., E. Martínez, E. Suzarte, B. L. Rodríguez, K. Marrero, Y. Silva, T. Ledón, R. del Sol and R. Fando. 2003a. VGJφ novel filamentous phage of *Vibrio cholerae*. integrates into the same chromosomal site than CTXo J Bacteriol. 185 5685-5696

Campos, J., E. Martínez, E. Suzarte, B. L. Rodríguez, K. Marrero, Y. Silva, T. Ledón and R. Fando. 2003b. Novel type of specialized transduction for CTXo or its satellite phage RS1 mediated by filamentous phage VGJφ in *Vibrio cholerae* J Bacteriol 185 7231-7240

CDC/NCID. OPS. 1994. Métodos de Laboratorio para el diagnóstico de *V. cholerae* En Programa especial de publicaciones Ed Washington. DC 120-125

Cedré, B., L. Garcia, H. García, M. Fariñas, A. Talavera and J. F. Infante. 1998.

Intestinal Colonization of the Infant Mouse Model by Attenuated and Virulent *Vibrio cholerae* Strains Arch Med Res 29 231-234

Clemens, J. D., D. A. Sack and J. R. Harris. 1986. Field trial of oral cholerae vaccines in Bangladesh Lancet 2 124-127

Clemens, J. D., D. A. Sack and J. R. Harris. 1990. Field trial of oral cholerae vaccines in Bangladesh results from a three-year follow-up Lancet 335 270-273

Colgan, S. P., V. M. Morales, J. L. Madara, J. E. Polischuk, S. P. Balk and R.S. Blumberg. 1996. IFN- γ modulates CD1d surface expression on intestinal epithelia Am J. Physiol. (Cell Physiol. 40). 271 C276-C283

Colwell, R. R. and A. Huq. 1994. Vibrios in the Environment Viable but Nonculturable *V cholerae* In Wachsmuth, I K , P A Blake and O Olsvik (ed). "*V cholerae* and Cholera. Molecular to Global Perspectives American Society for Microbiology. Washington. DC. 103-116

Collins, P. D. 2000. Cytokine and cytokine receptor expression as a biological indicator of immune activation important considerations in the development of in vitro model systems J Immun Methods. 243: 125-145

Comstock, L. E., D. Maneval Jr., P. Panigrahi, A. Joseph, M. M. Levine, J. B. Kaper, J. G. Jr. Morris, and J. Johnson. 1995. The capsule and O antigen in *Vibrio cholerae* 0139 Bengal are associated with a genetic region not present in *Vibrio cholerae* 01 Infect Immun 63:317-323

Cooke, H. J. 1991. Hormones and neurotransmitters regulating intestinal transport In Field. M (ed). Diarrheal Diseases Elsevier, New York 23-48

Coster T. S., J. Sadoff, J. J. Mekalanos, and D. N. Taylor. 1995. Safety immunogenicity and efficacy of a live attenuated *Vibrio cholerae* 0139 vaccine prototype Bengal-15 Lancet 345 949-952

Charles, A., P. Janeway Jr., P. Travers, M. Walport and M. J. Shlomchik. 2001. Innate Immunity In Immunobiology 5 Eds D. Schanck, P Austin , E Lawrence S Gibbs and M Ditzel (ed) Elsevier. New York. 71-78

Chen. D., G. R. Smith, M. C. Dipaolo, I. McGowan and D. P. Jewell. 1996. Cytokine gene transcription of human colonic intraepithelial lymphocytes costimulated with epithelial cells bearing HLA-DR and its inhibition by 5-aminosalicylic acid J Clin Immunol. 16 237-241

Chiavelli, D. A., J. W. Marsh and R. K. Taylor. 2001. The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton Appl. Environ. Microbiol 67 3220-3225

Chitnis, D. S., K. D. Sharma and R. S. Kamat. 1982. Role of somatic antigen of *Vibrio cholerae* in adhesion to intestinal mucosa J Med Microbiol 5 53-61

- Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162 156-159
- Davis, B. M. and M. K. Waldor. 2003.** Filamentous phages linked to virulence of *Vibrio cholerae* *Curr. Opin Microbiol.* 6: 35-42
- De Jong, E. C., P. L. Vieira, P. Kalinski, J. H. N. Schuitemaker, Y. Tanaka, E. A. Wierenga, M. Yazdanhakhis and M. L. Kapsenberg. 2002.** Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse Th cell-polarizing signals *J Immunol* 168 1704-1709
- Di Pierro, M., R. Lu, S. Uzzau, W. Wang, K. Margaretten, C. Pazzani, F. Maimone and A. Fasano. 2001.** Zonula occludens toxin structure-function analysis Identification of the fragment biologically active on tight junctions and of the zonulin receptor binding domain. *J Biol Chem.* 276: 19160-19165
- Dubois, M., K. A. Gilies. J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith. 1956.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances *Anal Chem* 3 350-356
- Eckmann, L., H. C. Jung, C. Schürer-Maly, A. Panja. E. M. Wroblewska and M. F. Kagnoff. 1993b.** Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines Regulated expression of IL-8 *Gastroenterology* 105: 1689-1697
- Eckmann, L., M. F. Kagnoff and J. Firier. 1993a.** Epithelial cells secrete the chemokine IL-8 in response to bacteria entry *Infect. Immun.* 61 4569-4574
- Eckmann, L., S. L. Reed, J. R. Smith and M. F. Kagnoff. 1995.** *Entamoeba histolytica* trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1 alpha *J Clin Invest* 96 1269-1279
- Faast, R., M. A. Ogierman, U. H. Stroehrer and P. A. Manning. 1989.** Nucleotide sequence of the structural gene *tcpA*, for major pilin subunit of *V. cholerae* *Gen* 85 227-231
- Faruque, S. M., J. Zhu, A. M. Kamruzzaman and J. J. Mekalanos. 2003.** Examination of diverse toxin coregulated pilus-positive *Vibrio cholerae* strains fails to demonstrate evidence for *Vibrio* pathogenicity island phage *Infect. Immun* 71 2993-2999

- Faruque, S. M., M. J. Albert and J. J. Mekalanos. 1998.** Epidemiology Genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiol Mol Biol. 62 1301-1305.
- Fasano, A., B. Baudray, D. W. Pumphin, S. S. Wasserman, B. D. Tall, J. M. Ketley and J. B. Kaper. 1991.** *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin which affects intestinal tight junctions. Proc. Natl Acad Sci USA 88 5242-5246
- Figueroa-Arredondo, P., J. E. Heuser, N. S. Akopyants, J. H. Morisaki, S. Giono-Cerezo, F. Enríquez-Rincón and D. E. Berg. 2001.** Cell vacuolation caused by *Vibrio cholerae* Hemolysin. Infect Immun. 69: 1613-1624
- Finkelstein, R. A., M. Boesman-Finkelstein, Y. Chan and C. C. Hase. 1992.** *Vibrio cholerae* hemagglutinin/ protease colonial, virulence and detachment Infect Immun. 60 472-478
- Francis, M. L., J. Ryan, M. G. Jobling, R. K. Holmes, J. Moss and J. J. Mond. 1992.** Cyclic AMP-dependent effects of cholera toxin on B cell activation II Binding of ganglioside GM1 induces B cell activation. J. Immunol. 148: 1999-2005
- 1993. Franzon. V. L., A. Barker and P. A. Manning. 1993.** Nucleotide sequence encoding the mannose-fucose resistant haemagglutinin of *Vibrio cholerae* 01 and construction of a mutant Infect Immun 61: 3032-3037.
- Fullner, K. J. 2003.** Microbial pathogenesis and the intestinal epithelial cell In: Hecht. G (ed). ASM Press. Washington. DC 481-502
- Fullner, K. J., W. I. Lencer and J. J. Mekalanos. 2001.** *Vibrio cholerae*-mouse cellular responses of polarized T84 intestinal epithelial cells are dependent on production of cholera toxin and the RTX toxin. Infect Immun 69 6310-6317
- Gagliardi, M. C., F. Sallusto, M. Marinaro, A. Langenkamp, A. Lanzavecchia and M. T. De Magistris. 2000.** Cholera toxin induces maturation of human dendritic cells and licenses them for Th2 priming Eur J Immunol 30. 2394-2403.
- García, L., R. Oliva, B. Cedré, T. Valmaseda, H. Garcia, A. Talavera, J. L. Pérez and G. Sierra. 1998.** Intraduodenal inoculation of adult rabbits for evaluating the immunogenicity of genetically attenuated *Vibrio cholerae* strains Lab Anim Sci 48 538-541
- Ghosh, C., R. K. Nandy, S. K. Dasgupta, G. B. Nair, R. H. Hall, and A. C. Ghose. 1997.** A search for cholera toxin (CT) toxin coregulated pilus (TCP), the regulatory element ToxR and their virulence factors in non-01/non-0139 *V. cholerae* Microb Patho 22 199-208

- Gilí, D. M. 1976.** The arrangement of subunits in cholera toxin Biochemistry 15 1242-1248
- Glass, R. I., A-M. Svennerholm, B. J. Stoll, M. R. Khan, K. M. Hossain, M. I. Huq, and J. Holmgren. 1983.** Protection against cholera in breast-fed children by antibodies in breast milk New Engl J Med 308 1389-1392.
- Goldberg, M. B., V. J. DiRita, and S. B. Calderwood. 1990.** Identification of an iron-regulated virulence determinant in *Vibrio cholerae*, using *TnphoA* mutagenesis Infect Immun 58 55-60
- Guerrant, R. L., E. Soares Araujo, K. Kotloff, A. A. M. Lima. W. H. Cooper and A. G. Lee. 1992.** Measurement of fecal lactoferrin as a marker of fecal leukocytes J Clin Microbiol 30: 1238-1242.
- Gupta, R. K., D. N. Taylor, D. A. Bryla, J. B. Robbins and S. C. Szu. 1998.** Phase 1 evaluation of *Vibrio cholerae* O1. serotype Inaba . polysaccharide-cholera toxin conjugates in adult volunteers Infect. Immun. 66: 3095-3099
- Hase. C. C. and R. A. Finkelstein. 1991.** Cloning and nucleotide sequence of the *vibrio cholerae* hemagglutinin/ protease(HA/protease) gene and construction of an HA/protease-negative strain. J. Bacteriol. 173: 3311-3317.
- Herrington, D. A., R. H. Hall. G. Losonsky, J.J. Mekalanos, R. K. Taylor. and M. M. Levine. 1988.** Toxin. toxin-coregulated pili and the ToxR regulon are essential for *V. cholerae* pathogenesis in humans. J Exp Med. 168 1487-1492.
- Holmgren, J. 1992.** Pathogenesis In: Barua. D and Greenough W III (ed). Cholera Plenum Medical Book Co., New York. 199-208.
- Holmgren, J., N. Lycke and C. Czerkinsky. 1993.** Cholera toxin and cholera toxin B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen vector systems Vaccine 11 1179-1184
- Huet, C., L. Sahuquillo-Merino, E. Condrier, and S. Louvard. 1987.** Absorptive and mucus secreting subclones isolated from a multipotent intestinal cell line (HT29) provide new models for cell polarity and terminal differentiation J Cell Biol 105 345-358
- Iwanaga, M. and K. Yamamoto. 1985.** New medium for the production of cholera toxin of *V. cholerae* O1 biotype El Tor. J Clin Microbiol 22 405-408

Janoff, E. N., H. Hayakawa, D. N. Taylor, C. E. Fasching, J. E. Kenner, E. Jaimes and L. Rajj. 1997. Nitric Oxide production during *Vibrio cholerae* infection Am J Physiol 273 (Gastrointest. Liver Physiol. 36): G1160-G1167

Jelonek. M. T., S. J. Chang, C. Y. Chiu, M. K. Park, M. H. Nahm and J. I. Ward. 1993. Comparison of naturally acquired and vaccine-induced antibodies to *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide Infect Immun 61 5345-5350

Jertborn, M, A-M Svennerholm and J. Holmgren. 1996. Intestinal and systemic immune response in humans after oral immunization with a bivalent B subunit 01/0139 whole cell cholera vaccine Vaccine 14 1459-65.

Jertborn, M., A-M. Svennerholm and J. Holmgren. 1986. Saliva breast milk and serum antibody responses as indirect measures of intestinal immunity after oral cholera vaccination or natural disease J Clin Microbiol. 24 203-209

Johnson, J. A., C. A. Salles, P. Panigrahi, M. J. Albert, A. C. Wrigth, R. J. Johnson, and J. G. Jr. Morris. 1994. *Vibrio cholerae* 0139 Synonym Bengal is Closely Related to *Vibrio cholerae* El Tor but has Important Differences Infect Immun 62 2108-2110

Johnson, J. A., P. Panigrahi, and J. G. Morris Jr. 1992. Non-01 *Vibrio cholerae* NRTS36S Produces a Polysaccharide Capsule that Determines Colony Morphology. Serum Resistance and Virulence in Mice Infect. Immun. 60: 864-869

Jonson, G., M. Lebens and J. Holmgren. 1994. Cloning and sequencing of *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin pilin gene: Localization of *mshA* within a cluster of type IV pilin genes. Mol Microbiol. 13:109-118

Jouravleva, E. A., G. A. MacDonald, C. F. Garon, M. Boesman-Finkelstein and R. A. Finkelstein. 1998a. Characterization and possible functions of a new filamentous bacteriophage from *Vibrio cholerae* 0139. Microbiology 144 315-324

Jouravleva, E. A., G. A. MacDonald, J. W. Marsh, R. K. Taylor, M. Boesman-Finkelstein and R. A. Finkelstein. 1998b. The *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin is the receptor for a filamentous bacteriophage from *V. cholerae* 0139 66 2535 2539

Jung, H. C., L. Eckmann, S. K. Yang, A. Panja, J. Fierer, E. Morzycka-Wroblewska, and M. F. Kagnoff. 1995. A distinct array of proinflammatory cyto-

kines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion J Clin Invest 95 55-65

Kagnoff, M. F. and L. Eckmann. 1997. Perspectives series host/pathogen interactions J Clin Invest 100 6-10

Kaper, J. B. and M. M. Levine. 1990. Recombinant attenuated *V. cholerae* strain used as live oral vaccine. Res Microbiol 141 901-906

Kaper, J. B., J. G. Morris Jr. and M. M. Levine. 1995. Cholera Clin Microbiol Rev 8 48-86

Kaper, J. B., J. Michalski, J. M. Ketley and M. M. Levine. 1994. Potential for re-acquisition of cholera enterotoxin genes by attenuated *Vibrio cholerae* vaccine strain CVD103 HgR Infect Immun 4 1480-1483

Karaolis, D. K. R., S. Somara, D. R. Maneval Jr., J. A. Johnson and J. B. Kaper. 1999. Bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria Nature 399: 375-379.

Kay, B. A., C. A. Bopp and J. G. Wells. 1994. Isolation and Identification of *Vibrio cholerae* O1 from Fecal Specimens. In: Wachsmuth, I. K., P. A. Blake and O. Olsvik (ed). "*Vibrio cholerae* and Cholera. Molecular to Global Perspectives American Society for Microbiology. Washington, DC 3-20

Kenner, J., T. Coster, A. Trofa, D. Taylor, M. Barrera-Oro, T. Hyman, J. Adams, D. Beattie, K. Killeen, J. J. Mekalanos and J. C. Sadoff. 1995. Peru-15 a live attenuated oral vaccine candidate for *Vibrio cholerae* O1 El Tor J Infect Dis 44 524-528

Kimberg, D. K., M. Field, J. Johnson, E. Henderson and E. Gershon. 1971. Stimulation of intestinal mucosa adenylyl cyclase by cholera enterotoxin and prostaglandins J Clin Invest 50 1218-1230

Kimsey, H. H. and M. K. Waldor. 1998. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease inactivates CTX₁ Infect Immun 66: 4025-4029

King, C. A. and W. E. van Heyningen. 1973. Deactivation of cholera toxin by a sialidase resistant monosialosylganglioside J Infect Dis 127 639-647.

Koch, R. 1884. An address on cholera and its bacillus Br Med J 403-407

Koyama, S. Y. and D. K. Podolsky. 1989. Differential expression of transforming growth factor α and β in rat intestinal epithelial cells J Clin Invest 83: 1768-1773

- Kumar, K. K., R. Srivastava, V. B. Sinha, J. Michalski, J. B. Kaper and E. S. Srivastava. 1994.** *recA* mutations reduce adherence and colonization by classical and El Tor strains of *V cholerae* Microbiology. 140 1217-1223
- Leal, B. L., D. P. Snider, L. C. Barajas and J. S. Marshall. 1996.** Cholera toxin increases IL-6 synthesis and decreases TNF- α production by rat peritoneal mast cells J Immunol 156 316-321.
- Ledon, T., E. Valle, T Valmaseda, B. Cedré, J. Campos, B. L. Rodríguez, K. Marrero, H. García, L. García and R. Fando. 2003.** Construction and characterization of 0139 cholera vaccine candidates. Vaccine, 21 1282-1291
- Levine, M. M. and C. O. Tacket. 1994.** Recombinant live cholera vaccines. In Wachsmuth, I K . P A Blake and O Olsvik. (ed) "*Vibrio cholerae* and cholera Molecular to global perspectives" Washington, DC American Society for Microbiology 395-414
- Levine, M. M. and J. B. Kaper. 1993.** Live oral vaccines against cholera an update Vaccine 11 107-212
- Levine, M. M. and N. F. Pierce. 1992.** Immunity and vaccine development In: Bartra, D and W B Greenough 3 Eds. Cholera New York. 285-327
- Levine, M. M., J. B. Kaper, D. Herrington, G. Losonsky, J. G. Morris, M. I. Clements, R. E. Black, B. Tall and R. Hall. 1988a.** Volunteer studies of deletion mutants of *Vibrio cholerae* 01 prepared by recombinant techniques Infect Immun 56 161-167.
- Levine, M. M., J. B. Kaper, D. Herrington, J. Ketley, G. Losonsky, C. O. Tacket, B. Tall, and S. Cryz. 1988b.** Safety, immunogenicity and efficacy of recombinant live oral cholera vaccine. CVD103 and CVD103HgR Lancet 2 467-470
- Li, C. K. F., R. Seth, T. Gray, R. Bayston, Y. R. Mahida and D. Wakelin. 1998.** Production of proinflammatory cytokines and inflammatory mediators in human intestinal epithelial cells after invasion by *Trichinella spiralis* Infect Immun 66,2200-2206
- Lin, W., K. J. Fullner, R. Clayton, J. A. Sexton, M. B. Rogers, K. E. Calia, S. B. Calderwood, C. Fraser and J. J. Mekalanos. 1999.** Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage Proc Natl Acad Sci USA 96 1071-1076

Losonsky, G. A., J. Yunyongying and V. Lim. 1996. Factors influencing secondary vibriocidal immune responses: relevance for understanding immunity to cholera
Infect Immun 64 10-15

Lügering, N., T. Kucharzik, H. Gockel, C. Sorg, R. Stoll and W. Domschke. 1998. Human intestinal epithelial cells down-regulate IL-8 expression in human intestinal microvascular endothelial cells; role of transforming growth factor-beta 1 (TGF- β)
Clin Exp Immunol 114 377-384

Lycke, N. and J. Holmgren. 1986. Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune response to orally presented antigens
Immunology. 59 301 - 308

Lycke, N., T. Tsuji and J. Holmgren. 1992. The adjuvant effect of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins is linked to their ADP-ribosyltransferase activity.
Eur J Immunol 22 2277-2281

Madara, J. L., T. W. Patapoff, B. Gillece-Castro, S. P. Colgan, C. A. Parkos, C. Delp, and R. J. Mrsny. 1993. 5' adenosine monophosphate is the neutrophil-derived paracrine factor that elicits chloride secretion from T-84 intestinal epithelial cell monolayers
J. Clin Invest 91: 2320-2325

Manning, P. A., M. W. Heuzenroeder, J. Yeadon, D. I. Leavesley, P. R. Reeves and D. Rowley. 1986. Molecular cloning and expression in *E coli* K-12 of the O- antigens of the inaba and ogawa serotypes of the *V cholerae* 01 lipopolysaccharides and their potential for vaccine development.
Infect Immun. 53 272-277
Manogue, K. R., S. J. H. van Deventer and A. Cerami. 1991. Tumor necrosis factor alpha or cachectin. In The cytokine handbook Thomson. A ed Academic Press London 241-256

Marinaro, M., A. Di Tommaso, S. Uzzau, A. Fasano and M. T. De Magistris. 1999. Zonula occludens is a powerful mucosal adjuvant for intranasally delivered antigens
Infect Immun 67 1287-1291

Marinaro, M., A. Fasano and M. T. De Magistris. 2003. Zonula occludens toxin acts as an adjuvant through different mucosal routes and induces protective immune responses
Infect Immun 71 1897-902

Marinaro, M., H. F. Staats, T. Hiroi, R. J. Jackson, M. Coste, P. N. Boyaka, N. Okahashi, M. Yamamoto, H. Kiyono and H. Bluethmann. 1995. Mucosal adju-

vant effect of cholera toxin in mice results from induction of T helper 2 (Th2) cells and IL-4 J Immunol 155 4621-4629

Martin, M., D. J. Metzger, S. M. Michalek, T. D. Connell and M. W. Russell.

2001. Distinct cytokine regulation by cholera toxin and type II heat-labile toxins involves differential regulation of CD40 ligand on CD4⁺ T cells Infect Immun 69 4486-4492

Mathan, M. M., G. Chandy and V. I. Mathan. 1995. Ultrastructural changes in the upper small intestinal mucosa in patients with cholera Gastroenterology 109 422-430

Matsushima, K., K. Morishita and J. J. Oppenheim. 1988. Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by Interleukin-1 and tumor necrosis factor. J Exp Med 167 1883-1893.

McGee, D. W., C. O. Elson and J. R. McGhee. 1993. Enhancing effect of cholera toxin on interleukin-6 secretion by IEC-6 intestinal epithelial cells mode of action and augmenting effect of inflammatory cytokines Infect Immun 61: 4637-4644

Medzhitov, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. Nat Rev Immunol 1;135-145

Mekalanos, J. J., M. K. Waldor, C. L. Gardel, T. S. Coster, J. Kenner, K. P. Killeen, D. T. Beattie, A. Trofa, D. N. Taylor and J. D. Sadoff. 1995. Live cholera vaccines perspective on their construction and safety. Bull. Inst. Pasteur 93: 255-262

Mel. S. F., K. J. Fullner, S. Wimer-Mackin, W. I. Lencer and. J. J. Mekalanos. 2000. Association of Protease Activity in *Vibrio cholerae* Vaccine Strains with Decrease in Transcellular Epithelial Resistance of Polarized T84 Intestinal Epithelial Cells Infect Immun. 68 6487-6492

Mourad, F. H., L. J. D. O'Donnell, J. A. Dias, E. Ogutu, E. A. Andre, J. L. Turvill and M. J. G. Farthing. 1995. Role of 5-hydroxytryptamine type 3 receptors in rat intestinal fluid and electrolyte secretion induced by cholera and *Escherichia coli* enterotoxins Gut 37 340-345.

Mowat, A. M. and J. L. Viney. 1997. The anatomical basis of intestinal immunity. Immun Rev 156 145-166.

Muñoz, E., A. M. Zubiaga, M. Merrow, N. P. Sauter and B. T Huber. 1990.

Cholera toxin discriminates between T helper 1 and T helper 2 cells in T cell receptor mediated activation: role of cAMP in T cell proliferation J Exp Med 172 95-103

Nagamune, K., K. Yamamoto, A. Naka, J. Matsuyama, T. Miwatani and T. Honda.

1996. In vitro proteolytic processing and activation of the recombinant precursor of El Tor cytolysin/hemolysin (pro-HlyA) of by soluble hemagglutinin/protease of *Vibrio cholerae* trypsin and other proteases Infect Immun. 64 4655-4658

Nandi, B., R. K. Nandy, A. C. P. Vicent, and A. C. Ghose. 2000. Molecular characterization of a new variant of toxin-coregulated pilus protein (TcpA) in a toxigenic non-01/non-0139 strain of *V. cholerae*. Infect. Immun. 68: 948-952

Nesper, J., S. Schild, C. M. Lauriano, A. Kraiss, K. E. Klose and J. Reidl.

2002. Role of *Vibrio cholerae* 0139 surface polysaccharides in intestinal colonization Infect Immun 70 5990-5996

Ogierman, M. A., S. Zabihi, L. Mourtziou and P. A. Manning. 1993. Genetic organization and sequence of the promoter-distal region of the tcp gene cluster of *Vibrio cholerae* Gene 126 51-56

Ong, K-W., A. D. Wilson, T. R. Hirst and A. J. Morgan. 2003. The B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin enhances CD8⁺ cytotoxic-T-lymphocyte killing of Epstein-Barr virus-infected cell lines J Virol. 77 4298-4305.

Oppenheim, J. J., C. O. C. Zachariae, N. Mukaida and K. Matsushima. 1991.

Properties of a novel proinflammatory supergene intercrine cytokine family. Annu Rev Immunol 9 617-648

Osek, J., A-M. Svennerholm and J. Holmgren. 1992. Protection against *Vibrio cholerae* El Tor infection by specific antibodies against mannose-binding hemagglutinin pili Infect. Immun 60: 4961-4965

Pang, L. and J. R. Hout. 1997. Repression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by prostaglandin E₂ and other cyclic AMP stimulants in J774 macrophages Biochem Pharmacol 53 493-500

Panja, A., S. Goldberg, L. Eckmann, P. Krishen and L. Mayer. 1998. The regulation and functional consequence of proinflammatory cytokine binding on human intestinal epithelial cells Immunology 161 3675-3684

- Pearson, G. D., A. Woods, S. L. Chiang and J. J. Mekalanos. 1993.** CTX genetic element encodes a site-specific recombination system and an intestinal colonization factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 3750-3754
- Peterson, J. W. and L. G. Ochoa. 1989.** Role of prostaglandins and cAMP in the secretory effects of cholera toxin. *Science* 245: 857-859
- Peterson, J. W., Y. Lu, S. Duncan, J. Cantu and A. K. Chopra. 1994.** Interactions of intestinal mediators in the mode of action of cholera toxin. *J Med Microbiol.* 41 3-9
- Phillips, T. E., R. Ramos, and S. L. Duncan. 1995.** Differentiation of the HT29-18N2 human adenocarcinoma cell line in a protein-free medium: effect of insulin and transferrin. *In vitro Cell Dev. Biol.* 31 421-423.
- Prigent-Delecourt. L., L. Coffin. B. Colombel, J. F. Dehennin, J. P. Vaerman and J. C. Rambaud. 1995.** Secretion of immunoglobulins and plasma proteins from the colonic mucosa an *in vivo* study in man *Clin. Exp Immunol* 99 221 - 225
- Qadri, F., C. Wenneras, M. J. Albert, J. Hossain, K. Mannoor, Y. A. Begum, G. MoMohi, M. A. Salam, R. B. Sack and A-M. Svennerholm. 1997b.** Comparison of immune responses in patients infected with *Vibrio cholerae* 0139 and 01 *Infect Immun* 65 3571-3576
- Qadri, F., F. Ahmed, M. M. Karim, C. Wenneras, Y. A. Begum, M. A. Salam. M. J. Albert, and J. R. Mcghee. 1999.** Lipopolysaccharide and cholera toxin-specific immunoglobulin subclass distribution of B-cell responses in cholera *Clin Diagn Lab Immunol* 6 812-818.
- Qadri, F., G. Jonson, Y. A. Begum, C. Wenneras, M. J. Albert, M. A. Salam and A-M. Svennerholm. 1997a.** Immune response to the mannose-sensitive hemagglutinin in patients with cholera due to *Vibrio cholerae* 01 and 0139. *Clin. Diagn Lab Immunol* 4 429-434
- Qadri, F., G. Mohi, J. Hossain, T. Azim, A. M. Khan, M. A. Salam, R. B. Sack, M. J. Albert and A-M. Svennerholm. 1995.** Comparison of the vibriocidal antibody response in cholera due to *Vibrio cholerae* 0139 bengal with the response in cholera due to *Vibrio cholerae* 01 *Clin Diagn Lab Immunol* 2 685-688
- Qadri, F., M. S. Alam, M. Nishibuchi, T. Rahman, N. H. Alam, J. Chisti, S. Kondo, J. Sugiyama, N. A. Bhuiyan, M. M. Mathan, D. N. Sack and G. B. Nair.**

2003. Adaptive and inflammatory immune responses in patients infected with strains of *Vibrio parahaemolyticus* J Infect Dis. 187 1085-1096

Qadri, F., R. Raqib, F. Ahmed, T. Rahman, C. Wenneras, S. K. Das, N. H. Alam. M. M. Mathan and A. M. Svennerholm. 2002. Increased levels of inflammatory mediators in children and adults infected with *Vibrio cholerae* 01 and 0139 Clin Diagn Lab Immunol. 9: 221-229.

Qadri, F., T. R. Bhuiyan, K. K. Dutta, R. Raqib, M. S. Alam, N. H. Alam, A. M. Svennerholm and M. M. Mathan. 2004. Acute dehydrating disease caused by *Vibrio cholerae* serogroups 01 and 0139 induce increases in innate cells and inflammatory mediators at the mucosal surface of the gut. Gut. 53: 62-69.

Raqib, R., S. M. Mia, F. Qadri, T. I. Alam, N. H. Alam, A. K. Chowdhury, M. M. Mathan and J. Andersson. 2000. Innate immune responses in children and adults with Shigellosis Infect Immun. 68: 3620-3629.

Rasmussen, S. J., L. Eckmann, A. J. Quayle, L. Shen, Y. X. Zhang, D. J. Anderson. J. Fierer, R. S. Stephens and M. F. Kagnoff. 1997. Secretion of pro-inflammatory cytokines by epithelial cells in response to *Chlamydia* infection suggests a central role for epithelial cells in Chlamydial pathogenesis J Clin Invest 99 77-87

Reinecker, H. C., E. Y. Loh. D. J. Ringler, A. Mehta, J. L. Rombeau and R. P. MacDermott. 1995. Monocyte-chemoattractant protein 1 gene expression in intestinal epithelial cells and inflammatory bowel disease mucosa Gastroenterology 108 40-50.

Rhine, J. A. and R. K. Taylor. 1994. TcpA pilin sequences and colonization requirements for 01 and 0139 *V. cholerae*. Mol Microbiol 13. 1013-1020.

Richie, E. E., N. H. Punjabi, Y. Y. Sidharta, K. K. Peetosutan, M. M. Sukandar, S. S. Wasserman, M. M. Lesmana, F. F. Wangsasaputra, S. S. Pandam, M. M Levine, P.P. O'Hanley, S. J. Cryz and C. H. Simanjuntak. 2000. Efficacy trial of single -dose live oral cholera vaccines CVD103-HgR in norton Jakarta. Indonesia, a cholera -endemic area Vaccine 18 2389-2410

Robbinson. J. B., R. Schneerson and S. C. Szu. 1995. Perspective: hypothesis: Serum IgG antibody is sufficient to confer protection against infection diseases by inactivating the inoculum J Infect Dis 171 1387-13-98

- Robert, A., A. Silva, J. A. Benitez, B. L. Rodríguez, R. Fando, J. Campos, D. K. Sengupta, M. B. Finkelstein and R. A. Finkelstein. 1996.** Tagging a *V. cholerae* El Tor candidate vaccine strain by disruption of its haemagglutinin/protease gene using a novel reporter enzyme *Clostridium thermocellum* endoglucanase A Vaccine 14 1517-1522
- Ryan, E. T., T. I. Crean and S. K. Kochi. 2000.** Development of a *glnA* balanced lethal plasmid system for expression of heterologous antigens by attenuated vaccine vector strains of *Vibrio cholerae* Infect Immun 68 221-26
- Ryan, E. T., T. I. Crean, M. John, J. R. Butters, J. D. Clements and S. B. Calderwood. 1999.** In vivo expression and immunoadjuvancy of a mutant of heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* in vaccine and vector strains of *Vibrio cholerae* Infect Immun 67 1694-701.
- Sack, D. A., R. B. Sack, G. B. Nair and A. K. Siddique. 2004.** Cholera Lancet 363 223-233
- Said, B., H. R. Smith, S. M. Scotland, and B. Rowe. 1995.** Detection and differentiation of the gene for toxin-coregulated pili (*tcpA*) in *V. cholerae* non-01 using the polymerase chain reaction FEMS. Microbiol. Letters 125: 205-210.
- Sánchez, L., M. Calvo and J. H. Brock. 1992.** Biological role of lactoferrin Arch Dis Child 67 657-661
- Sanfilippo, L., C. K. F. Li, R. Seth, T. J. Balwin, M. G. Menozzi and R. Mahida. 2000.** *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces the expression of IL-8 and transforming growth factor-beta (TGF- β) by human colonic epithelial cells Clin Exp Immunol 119 456-463
- Sanz, M. L. 2001.** Inmunidad y prevención de la alergia a alimentos Alergol. Immunol clin 16 58-75
- Savkovic, S. D., A. Koutsouris and G. Hecht. 1996.** Attachment of a non-motile enteric pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli* to cultured human intestinal epithelial monolayers induces transmigration of neutrophils Infect Immun 64 4480-4487
- Schuerer-Maly, C. C., L. Eckmann, M. F. Kagnoff, M. T. Falco and F. E. Maly. 1994.** Colonic epithelial cell lines as a source of interleukin-8 stimulation by inflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide Immunology 81: 85-91

- Sengupta, D. K., T. K. Sengupta, and A. C. Ghose. 1992.** Major outer membrane proteins of *Vibrio cholerae* and their role in induction of protective immunity through inhibition of intestinal colonization. *Infect. Immun.* 60: 4848-4855.
- Shaw, C. E. and R. K. Taylor. 1990.** *Vibrio cholerae* 0395 *tcpA* pilin gene sequence and comparison of predicted protein structural features to those of type 4 pilins. *Infect. Immun.* 58: 3040-3049.
- Shimada, T., G. B. Nair, B. C. Deb, M. J. Albert, R. B. Sack and T. Takeda. 1993.** Outbreak of *Vibrio cholerae* non-01 in Indian and Bangladesh. *Lancet* 341: 134.
- Shreedhar, V. K., B. L. Kelsall and M. R. Neutra. 2003.** Cholera toxin induces migration of dendritic cells from the subepithelial dome region to T- and B-cell areas of Peyer's patches. *Infect. Immun.* 71: 504-509.
- Siebers, A. and B. B. Finlay. 1996.** M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infection. *Trends Microbiol.* 4: 22-29.
- Silva, M. T., M. A. Schlepner, C. O. Takeda, T. S. Steiner, J. B. Kaper, R. Edelman and R. Guerrant. 1996.** New evidences for inflammatory component in diarrhea caused by selected new live attenuated cholera vaccines and by El Tor and 0139 *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 64: 2362-2364.
- Singh, D. V., M. H. Matte, G. R. Matte, S. Jiang, F. Sabeena, B. N. Shukla, S. C. Ananyal, A. Huq and R. R. Colwell. 2001.** Molecular analysis of *Vibrio cholerae* 01, 0139, non-01, and non-0139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 910-921.
- Soriani, M., L. Bailey and T. R. Hirst. 2002.** Contribution of the ADP-ribosylating and receptor-binding proper of cholera-like enterotoxins in modulating cytokine secretion by human intestinal epithelial cells. *Microbiology.* 148: 667-676.
- Spangler, B. D. 1992.** Structure and function of cholera toxin and related *E. coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol. Rev.* 56: 622-647.
- Speelman, P., G. H. Rabbani, K. Bukhave and J. Rask-Madsen. 1985.** Increased jejunal prostaglandin E concentrations in patients with acute cholera. *Gut* 26: 188-193.
- Sperandio, V., J. A. Girón, W. D. Silveira and J. B. Kaper. 1995.** The OmpU outer membrane protein, a potential adherence factor of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 63: 4433-4438.

- Steiner, T. S., J. P. Nataro, C. E. Smith-Poteet, J. A. Smith and R. L. Guerrant. 2000.** Enteroaggregative *Escherichia coli* Expresses a Novel Flagellin that Causes IL-8 Release from Intestinal Epithelial Cells J Clin Invest 105 1769-1777
- 2001. Street. N. E. and T. R. Mosmann. 1991.** Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. FASEB J 5 171-177
- 2002. Suemori, S., C. Ciacci and D. K. Podolsky. 1991.** Regulation of transforming growth factor expression in rat intestinal epithelial cell lines J Clin Invest 87: 2216-2221
- Svennerholm, A-M., G. Jonson and J. Holmgren. 1994.** Immunity to *Vibrio cholerae* infection In Wachsmuth. I K P A Blake and O Olsvik (ed). "*Vibrio cholerae* and Cholera Molecular to Global Perspectives American Society for Microbiology. Washington. DC 145-168.
- Svennerholm, A-M. and J. Holmgren. 1989.** Mucosal Immunity in the gastrointestinal tract in relation to ETEC vaccine development In: Talwar. G P (ed). Progress in Vaccinology Springer Verlag. New York 18-23.
- Szu, S. C., R. Gupta and J. B. Robbins. 1994.** Induction of serum vibriocidal antibodies by O-specific polysaccharide-protein conjugated vaccines for prevention of cholera In '*Vibrio cholerae* and cholera. Molecular to global perspective Wachsmuth. I. K. P A. Blake and O Olsvik (ed) American Society for Microbiology Washington. DC 381-394
- Tacket, C. O., G. Losonski and J. P. Nataro. 1993.** Safety and Immunogenicity of live oral cholera vaccine candidate CVD 110. a *ctxA* Azof lactose derivative of El Tor Ogawa *Vibrio cholerae*. J Infect Dis 168 1536-1540
- Tacket, C. O., G. Losonsky, J. P Nataro, L. Comstock, J. Michalski, R. Edel- man, J. B. Kaper and M. M. Levine. 1995.** Initial clinical studies of CVD 112 *Vibrio cholerae* 0139 live oral vaccine safety and efficacy against experimental challenge J Infect Dis 172 883-886
- Tacket, C.O., M. B. Cohén and S. S. Wasserman. 1999.** Randomized double - blind placebo -controlled multicentered trial of the efficacy of a single dose live oral cholera vaccine CVD103 HgR in preventing cholera following challenge with *Vibrio cholerae* 01 El Tor inaba three months after vaccination Infect Immun 67;6341 6345

Tacket, C.O., R. K. Taylor, G. Losonsky, Y. Lim, J. P. Nataro, J. B. Kaper and M. M. Levine. 1998. Investigaron of the roles of toxin-coregulated pili and mannose-sensitive hemagglutinin pili in the pathogenesis of *Vibrio cholerae* 0139 infection *Infect Immun* 66 692-697

Takayama, K., G. Garcia-Cardena, G. K. Sukhova, J. Comander, M. A. Gimbrone Jr and P. Libby. 2002. Prostaglandin E2 suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor. *J Biol Chem* 277 44147-54

Taylor. D. N., J. L. Sánchez and J. M. Castro. 1999. Expanded safety and immunogenicity of a bivalent oral, attenuated cholera vaccine, CVD 103-HgR plus CVD 111. in United States military personnel stationed in Panama *Infect Immun*. 67 2030-2034

Taylor, D. N., K. P. Killeen, D. C. Hack, J. R. Kenner, T. S. Coster, D. T. Beat-tie, J. Ezzell, T. Hyman, A. Trofa, M. J. Sjogren, A. Friedlander, J. J. Mekalanos and J. C. Sadoff. 1994. Development of live, oral, attenuated vaccine against El Tor cholera *J Infect Dis* 170: 1518-1523

Taylor, R. K., V. L. Miller, D. B. Furlong and J. J. Mekalanos. 1987. Use of *phoA* gene fusion to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin *Proc Natl Acad Sci USA* 84 2833-2837.

Thelin, K. H. and R. K. Taylor. 1996. Toxin-coregulated pilus, but not mannose-sensitive hemagglutinin is required for colonization by *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype and 0139 strains *Infect Immun*. 64 2853-2856.

Toshina, K., I. Hirata, K. Maemura, S. Sasaki, M. Murano, M. Nitta, H. Yamachi, T. Nishikawa, N. Hamamoto and K. Katsu. 2000. Enprostil, a prostaglandin-E(2) analogue, inhibits interleukin-8 production of human colonic epithelial cell lines *Scand. J Immunol* 52 570-575

Trach, D. D., J. D. Clemens, N. T. Ke, H. T. Thuy, N. D. Son, D. G. Canh, P. V. D. Hang and M. R. Rao. 1997. Field trial of a locally produced oral cholera vaccine in Viet Nam *Lancet* 349 231-235

Trach, D. D., P. D. Cam, N. T. Ke, M. R. Rao, D. Dinh, P. V. Hang, N. V. Hung, D. G. Canh, V. D. Thiem, A. Naficy, B. Ivanoff, A. M. Svennerholm, J. Holmgren and J. D. Clemens. 2002. Investigation into the safety and immunogenicity of killed oral cholera vaccine developed in Viet Nam *Bull W H O* 80;2-8

Trucksis, M., J. E. Galen, J. Michalski, A. Fasano and J. B. Kaper. 1993. Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a *Vibrio cholerae* virulence cassette
Proc Natl Acad Sci. USA 90 5267-5271

Trucksis, M., T. L. Conn, A. Fasano and J. B. Kaper. 1997. Production of *Vibrio cholerae* accessory cholera enterotoxin (Ace) in the yeast *Pichia pastoris*.
Infect. Immun. 65 4984-4988

Uzzau S., P. Cappuccinelli and A. Fasano. 1999. Expression of *Vibrio cholerae* zonula occludens toxin and analysis of its subcellular localization. Microb. Pathog.
27: 377-385

Waldor, M. K. and J. J. Mekalanos. 1996. Lysogenic conversion by a filamentous bacteriophage encoding cholera toxin. Science. 272 1910-1914

Wang, B., N. Ruiz, A. Pentland and M. Caparon. 1997. Keratinocyte proinflammatory responses to adherent and nonadherent group A Streptococci. Infect. Immun
65 21 19-2126

Warhurst, A. C., S. J. Hopkins and G. Warhurst. 1998. Interferon induces differential upregulation of </ and [> chemokine secretion in colonic epithelial cell lines
Gut 42 208-213

Wasserman. S. S., G. A. Losonsky, F. Noriega, C. O. Tacket, E. Castañeda and M. M. Levine. 1994. Kinetics of the vibriocidal antibody response to live cholera vaccines Vaccine 12 1000-1003

Watnick, P. I. and R. Kolter. 1999. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm Mol Microbiol 34 586-595

Watnick, P. I., R. Kolter and K. J. Fullner. 1999. A role for mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. J Bacteriol 181 3606-3609

Weintraub, A., G. Widmalm, P. E. Jansson, M. Jansson, K. Hultenby and M. J. Albert. 1994. *Vibrio cholerae* 0139 Synonym Bengal possesses a capsular polysaccharide which may confer increased virulence Microbiol Pathog 16 235-241.

Westphal, O. and K. Jann. 1965. Bacterial lipopolysaccharides Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. Methods Carbohydrate Chem 5 83 91

Witthóft, T., L. Eckmann and M. F. Kagnoff. 1998. Enteroinvasive bacteria directly activate expression of iNOS and NO production in human colon epithelial cells Gastrointest. Liver Physiol 38 G564-G571

Wold, A. E., J. Mestecky, M. Tomana, A. Kobata, H. Ohbayashi, T. Endo and C. S. Edén. 1990. Secretory immunoglobulin A carries oligosaccharide receptors for *Echinichia coli* type 1 fimbrial lectin. Infect. Immun. 58: 3073-3077.

Wood, K. S., G. M. Buga, R. E. Byrns and L. J. Ignarro. 1990. Vascular smooth muscle-derived relaxing factor (MDRF) and its close similarity to nitric oxide Bio-chem Biophys. Res. Commun. 170: 80-86

Xu-Amano, J., R. J. Jackson, K. Fujihashi, H. Kiyono, H. F. Staats and J. R. McGhee. 1994. Helper Th1 and Th2 cell responses following mucosal or systemic immunization with cholera toxin. Vaccine 12: 903-911

Yang, S. K., L. Eckmann, A. Panja and M. F. Kagnoff. 1997. Differential and regulated expression of C-X-C, C-C, and C-chemokines by human colon epithelial cells Gastroenterology 113:1214-1223

Yu, Y. and Chadee K. 1998. Prostaglandin E₂ Stimulates IL-8 Gene Expression in Human Colonic Epithelial Cells by a Posttranscriptional Mechanism J Immunol 161 3746-3752.

Zhang, D., Z. Xu, W. Sun and D. K. R. Karalolis. 2003. The *Vibrio* pathogenicity island-encoded Mop protein modulates the pathogenesis and reactivity of epidemic *Vibrio cholerae* Infect Immun 71 510-515

Zhou, X., Q. Gao da. J. Michalski, J. A. Benitez and J. B. Kaper. 2004. Induction of interleukin-8 in T84 cells by *Vibrio cholerae* Infect. Immun 72: 389-397.

Zitzer, A., T. M. Wassenaar, I. Walev and S. Bhakdi. 1997. Potent membrane-permeabilizing and cytotoxic action of *Vibrio cholerae* cytolysin on human intestinal cells Infect Immun. 65 1293-1298

9- Autobiografía.

Artículos:

Rodríguez, B. L. A Rojas and J A Benítez **1998** Cholera toxin differentially regulates matrix metalloproteinase-9 production and respiratory burst in murine macrophages *FEMS Immun Med Microbiol* 22 193-198

Benítez, J A., L García, A. Silva, H García, R Fando, B Cedré A Pérez J Campos **B. L. Rodríguez** J L Pérez, T Valmaseda, O Pérez, A Pérez, M Ramírez, T Ledón, M Díaz Jidy, M Lastre, L Bravo and G Sierra **1999** Preliminary assessment of the safety and immunogenicity of a new CTX⁻-negative, hemagglutinin/protease-defective El Tor candidate cholera vaccine strain *Infect Immun* 67 539-545

Rodríguez, B.L A Rojas, J Campos, T Ledón, E Valle, W. Toledo and R Fando **2001** Differential Interleukin-8 Response of Intestinal Epithelial Cell Line to Reactogenic and Non-Reactogenic Candidate Vaccine Strains of *Vibrio cholerae* *Infect Immun* 69 613-616

Rodríguez B. L A Rojas, J Campos, T Ledón E. Valle, K Marrero Y Silva, E Suzarte, A Moreno and R Fando Reactogenic and nonreactogenic Vaccine Strains of *Vibrio cholerae* Induce a Differential Array of Proinflammatory Cytokines in Intestinal Epithelial Cell Line. **Se esta rescribiendo para enviarla nuevamente a Infection and Immunity.**

EVENTOS:

6^{TO} Congreso Latinoamericano de Inmunología y 3^{er} Cubano de Inmunología La Habana 2002 **Rodríguez, B. L.** A Rojas, J. Campos, T Ledon, E Valle, A Moreno, K Marrero, S Yusuan, E Susarte and R Fando. Candidate vaccine strains of *Vibrio cholerae* induce a differential and specific array of three proinflammatory cytokines in intestinal epithelial cell line

Second European Mucosal Immunity Group Meeting Gothenburg, Sweden **2000**

Rodríguez, B. L. A Rojas J Campos, T Ledón, E Valle, W Toledo and R Fando Differential proinflammatory cytokine response of an intestinal epithelial cell line to reactogenic and non-reactogenic candidate vaccine strains of *Vibrio cholerae*

Second European Mucosal Immunity Group Meeting Gothenburg, Sweden **2000**
García, L , A Talavera, J A Benitez, H García. R Fando, B Cedré, A Pérez J Campos.
B. L. Rodríguez, J L Pérez. T Valmaseda. A Silva, O Pérez. A Pérez Sierra. M
Ramírez. L Bravo. T Ledón. M Diaz Jidy. M Lastre, and G Sierra *Vibrio cholerae* 638
strain Reactogenicity and immunogenicity in volunteers.

35ⁿ US-Japan cholera and other bacterial enteric infections Jomt Panel Meeting
Baltimore, USA **1999** **Rodríguez, B. L.**, R Fando, J Campos. T Ledón E Valle and A
Rojas. Differential IL-8 response of intestinal epithelial cell line to reactogenic and
non-reactogemc candidate vaccine strains of *Vibrio cholerae*.

35' US-Japan cholera and other bacterial enteric infections Jomt Panel Meeting
Baltimore. USA **1999** Fando. R., J. Campos. T. Ledón. E. Valle. K Marrero. **B. L.**
Rodríguez Late breaker; "Effect of hap on the reactogenicity and immunogenicity of
cholera vaccine candidates"

Tesis de diploma:

Respuesta diferencial de interleucina-8 de la línea celular de epitelio intestinal HT29-
18N2 a cepas vacunales reactogénicas y no reactogénicas de *Vibrio cholerae* **2000**
CNIC. Instituto Finlay. Tesis de Lic. en Microbiología

Estudio *in vitro* e *in vivo* de la inducción de mediadores inflamatorios por la acción de
cepas vivas candidatos vacunales de *Vibrio cholerae*. **2002**. CNIC Tesis de Lie en
Bioquímica

Premios nacionales:

Vibrio cholerae 638. primera cepa atenuada cubana, candidato vacunal anti-cólera en
completar su fase de caracterización y evaluación investigativa **1999** García. L R
Fando. A Pérez, G Sierra. H García, B. Cedré, T Valmaseda, A Talabera, G Año. **B. L.**
Rodríguez, J Pérez, J Campos, M Ramírez, L Bravo. O Pérez. A Pérez Sierra. T
Ledón J Menéndez, M. D. Jidy, I. González, T. Serrano y A Moreno Resultado
Relevante de la Academia de Ciencias de Cuba