

Toxina VCC de *Vibrio cholerae*: de la vacuolización a la muerte celular

Carlos Alberto Castañón-Sánchez*

RESUMEN

El cólera epidémico causado por *Vibrio cholerae* toxigénico perteneciente a los serogrupos O1 y O139 es un grave problema de salud pública en muchos países en desarrollo. La enfermedad se caracteriza por una diarrea aguda deshidratante causada principalmente por la toxina colérica, enterotoxina producida por estos microorganismos durante la patogénesis de la enfermedad. En su forma severa, los pacientes llegan a presentar choque hipovolémico, acidosis y muerte, si el tratamiento adecuado no es iniciado a tiempo. Dos características epidemiológicas distintivas del cólera son: la tendencia a aparecer en brotes explosivos, siempre y cuando inicien en focos distintos simultáneamente, y su propensión para causar verdaderas pandemias que afectan progresivamente muchos países en múltiples continentes en el transcurso de varios años. El género *Vibrio* incluye muchas especies diferentes, de las cuales pocas son patógenas. El ejemplo clásico de especies patógenas de este género es *V. cholerae*. Además de producir toxina colérica, algunas cepas son capaces de secretar una toxina formadora de poros que induce la formación de vacuolas. Esta revisión tiene como objetivo abordar algunos aspectos moleculares del proceso de daño celular inducido por la citolisina vacuolizante VCC de *V. cholerae*.

Palabras clave: *Vibrio cholerae*, toxina, hemolisina, vacuolización, apoptosis.

ABSTRACT

Epidemic cholera caused by toxigenic *Vibrio cholerae* belonging to serogroups O1 and O139 is a serious public health problem in many developing countries. The disease is characterized by an acute dehydrating diarrhea caused mainly by cholera toxin, enterotoxin produced by these microorganisms during the pathogenesis of the disease. In its severe form, patients even present hypovolemic shock, acidosis and death if treatment is not started in time. Two distinct epidemiological characteristics of cholera are: the tendency to occur in explosive outbreaks, provided simultaneous start in different spots, and a propensity to cause true pandemics, progressively affecting many countries on multiple continents over the course of several years. The genus *Vibrio* includes many different species of which only a few are pathogenic. The classic example of pathogenic genus is *V. cholerae*. Besides producing cholera toxin, some strains are capable of secreting a pore-forming toxin that induces vacuolization. This review aims to address some molecular aspects of the process of cell damage induced by the vacuolating cytotoxin VCC of *V. cholerae*.

Key words: *Vibrio cholerae*, toxin, hemolysin, vacuolization, apoptosis.

INTRODUCCIÓN

Entre las especies que integran el género *Vibrio*, *V. cholerae* es una especie bien definida con base en pruebas

bioquímicas y estudios de homología del ácido desoxirribonucleico (ADN); sin embargo, no es homogénea en muchos aspectos, por ejemplo, se han realizado distinciones importantes dentro de la especie respecto al serogrupo, producción de toxina colérica (CT) y potencial

* Subdirección de Enseñanza e Investigación. Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca.

Este artículo también puede ser consultado en versión completa en <http://www.medigraphic.com/emis>

para ocasionar brotes epidémicos.^{1,2} La serotipificación de *V. cholerae* está dada con base en el antígeno O estable que se encuentra en la superficie de la bacteria.³ A la fecha, se han identificado 206 serogrupos de *V. cholerae*.¹ Sólo las cepas de los dos serogrupos O1 y O139 que producen toxina colérica están asociadas con el cólera epidémico; sin embargo, hay cepas de estos serogrupos que carecen de los genes *ctxAB*, por lo tanto, no producen toxina colérica, no causan cólera y tampoco están involucradas en epidemias. No obstante, existen cepas que pertenecen a serogrupos diferentes al O1 y O139 que han producido brotes ocasionales de cólera, estas cepas no se han asociado con grandes epidemias o pandemias extensas.^{3,4}

Los diferentes grupos O son referidos como serogrupos o serovares.² El serogrupo O1 se divide en tres formas antigénicas denominadas: Inaba, Ogawa e Hikojima, las cuales se mencionan como serotipos o subtipos. La siguiente clasificación de *V. cholerae* O1 ha permitido distinguir a dos biotipos, Clásico y El Tor. Entre 1817 y 1961 ocurrieron seis pandemias de cólera. El biotipo Clásico fue el responsable de la quinta y la sexta pandemia y se cree que está asociada con las primeras pandemias ocurridas; sin embargo, no existe evidencia de ello. El agente causal de la séptima y actual pandemia de cólera que inició en 1961, pertenece al biotipo El Tor.³

EPIDEMIOLOGÍA DEL CÓLERA

Se ha estimado que *V. cholerae* produce de tres a cinco millones de casos de diarreas y más de 100,000 muertes anualmente.^{5,6} Después de estar ausente en América Latina por alrededor de un siglo, en 1991 el cólera reemergió. En enero de ese año un brote se reportó en Perú, diseminándose rápidamente por todos los países de América Latina, excepto Uruguay, alcanzando a México en junio del mismo año.⁷ Millones de personas fueron afectadas; tan sólo en 1993 se reportaron 9,000 decesos. En México se observaron dos ciclos epidémicos: entre 1991-1994 y entre 1995-2001. El número máximo de casos reportados por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE) fue 15,526 en el año 1995.⁸ Hasta el 2010, más del 94% de los casos reportados a la Organización Mundial de la Salud se encontraban en África. En ese mismo año nuevamente se vivió una epidemia que alertó a los servicios de salud en varios países americanos: el cólera reemergió en Haití. Hasta agosto de 2011, más de 439,000 casos se habían reportado en ese país con 6,200 decesos.⁹

CICLO INFECCIOSO DE *V. CHOLERA*

La infección debida a *V. cholerae* inicia con la ingesta de agua o alimentos contaminados; después de superar la barrera ácida del estómago, la bacteria coloniza el epitelio del intestino delgado, principalmente por medio del pili corregulado por la toxina conocida como TCP, la adhesina más importante.¹⁰ La toxina colérica producida por los vibrios adheridos se secreta, a través de la membrana externa bacteriana, al ambiente extracelular y se introduce a la célula a través de la unión de la subunidad B pentamérica con el gangliósido receptor GM1. Una vez dentro de la célula, la subunidad A, compuesta por dos dominios estructurales denominados péptido A₁ y A₂, sufre un procesamiento proteolítico.¹¹ El péptido A₁ es la subunidad que posee una actividad enzimática específica, actúa intracelularmente, incrementando los niveles de AMPc (adenosín monofosfato cíclico), cambiando la tendencia de absorción del intestino delgado por secreción. La subsecuente pérdida de agua y electrolitos conduce a la diarrea severa característica del cólera.

Es claro que la producción de toxina colérica por *V. cholerae* es relevante, desde el punto de vista de que un serogrupo adquirió el potencial para causar epidemias. En *V. cholerae* toxigénico O1 y O139 se identificó una región de 4.5 kilobases que fue denominada cassette de virulencia,¹² pero no la presentan las cepas no toxigénicas. Se sabe que al menos seis genes son los elementos que integran esta región de virulencia. Estos genes incluyen *ctxAB* (que codifica para las subunidades A y B de toxina colérica); *zot* que codifica para la toxina que altera a nivel de la zonula occludens: ZOT;¹³ *cep*, el pili codificado por la región core;¹⁴ *ace*, la enterotoxina accesoria del core y *orfU*, cuyo producto es de función desconocida.¹²

Un factor cuyo gen reside fuera del elemento genético CTX y que probablemente contribuye en el proceso de la enfermedad es la proteína VCC (citolisina de *V. cholerae*), inicialmente descrita como hemolisina HlyA.¹⁵ En contraste con la secreción de líquidos producida por toxina colérica que no posee características hemorrágicas, la citolisina es capaz de causar acumulación de fluidos con presencia de sangre y moco en experimentos realizados en asa ligada de conejo. Es decir, ya se ha demostrado que la proteína VCC es una toxina secretora y hemorrágica.¹⁶

CITOLISINA VCC DE *V. CHOLERA*

La citolisina VCC está codificada en la región *hly* del cromosoma II,^{17,18} la cual consta de los genes estruc-

turales *hlyA*, *hlyB* y *hlyC*.¹⁹ La proteína VCC se sintetiza a partir del gen *hlyA* como una pre-pro-toxina de 82 kDa (kilodaltones), la cual se procesa como una pro-toxina de 79 kDa después de haber perdido un péptido señal; esto sucede durante la secreción a través de la membrana interna bacteriana. La pro-toxina se procesa como una proteína madura activa de 65 kDa después de haber perdido un polipéptido de 15 kDa del extremo amino terminal; esto ocurre en el espacio periplásmico y en el medio extracelular.²⁰ Stoebner y colaboradores²¹ determinaron que la síntesis de la toxina VCC puede estar regulada coordinadamente con la síntesis de un sideróforo de *V. cholerae* denominado vibriobactina.

Datos experimentales sugieren que el procesamiento proteolítico de la pro-toxina es un paso esencial en la activación de la citolisina y que esta ruptura ocurre entre los aminoácidos alanina 157 y asparagina 158. Una hemaglutinina/proteasa secretada por *V. cholerae* es capaz de procesar a la citolisina y convertirla en su forma activa; sin embargo, se ha determinado que enzimas como la tripsina, α -quimotripsina, subtilisina, papaína y la metaloproteínasa ADAM-17 son capaces de realizar este procesamiento. Todas estas proteasas tienen sitios de corte diferentes entre los aminoácidos leucina 146 y asparagina 158.^{22,23}

VCC ES UNA TOXINA FORMADORA DE POROS

La citolisina VCC de *V. cholerae* es una proteína formadora de poros, cuyo proceso de formación del poro involucra la unión reversible de monómeros de 65 kDa a la membrana de la célula blanco.²⁴ Subsecuentemente, los monómeros se ensamblan formando un oligómero casi siempre heptamérico que se inserta en la membrana de la célula. Este mecanismo de daño a la membrana explica la actividad hemolítica de la proteína VCC. Se ha demostrado que la proteína VCC se une específicamente a glicoproteínas con motivos terminales β -1 galactosil, a través de su extremo carboxilo. Además, se ha establecido que la presencia de colesterol en la membrana de la célula blanco induce la oligomerización de la proteína VCC.²⁵⁻²⁷ Se ha descrito que la glicoforina B, una sialoglicoproteína presente en la membrana de los eritrocitos humanos, es un receptor de la citolisina; sin embargo, aún se desconoce la naturaleza del receptor para la proteína VCC en células nucleadas.²⁸

Mediante estudios realizados en eritrocitos, membranas lipídicas planares y liposomas, se ha fotografiado a la

hemolisina formando un poro heptamérico de 0.9-1.0 nm de diámetro.²⁹⁻³¹ Se ha demostrado que dicho poro, formado por la hemolisina es selectivamente permeable a iones K^+ , pero no a iones Ca^{2+} .³² Además, se ha determinado que la formación del poro tiene como consecuencia la permeabilización de la membrana, induciendo de esta manera la muerte de la célula.²⁷

EFFECTO VACUOLIZANTE Y MUERTE CELULAR

Un modelo para determinar la toxicidad de productos secretados por patógenos bacterianos es el estudio del efecto de sobrenadantes de cultivos sobre líneas de células eucariotas bajo condiciones controladas *in vitro*. En este contexto se ha analizado el efecto de sobrenadantes obtenidos de cepas de *V. cholerae* no-O1 aisladas a partir de muestras fecales de pacientes mexicanos con diarrea del brote de 1991, y se describió la actividad vacuolizante en células Vero, logrando demostrar que este efecto es causado por la citolisina VCC.^{33,34} La actividad vacuolizante se ha encontrado de manera independiente en cepas de *V. cholerae* no epidémicas de la India y Brasil, lo cual indica que este fenómeno es universal.^{35,36}

Inicialmente, esta vacuolización evoca a la causada por la citotoxina vacuolizante VacA de *Helicobacter pylori*.³⁷ Sin embargo, las vacuolas inducidas por VacA y VCC responden de manera diferente a tratamientos con desestabilizadores del sistema endosomal, como espermidina y NH_4Cl , los cuales estimulan la vacuolización causada por *H. pylori*, pero no la inducida por *V. cholerae*.³³ Contrario a la vacuolización causada por la proteína VacA, el efecto vacuolizante inducido por la citolisina se exagera por tratamientos con la concanamycin B, un inhibidor de la ATPasa vacuolar que bloquea el bombeo de protones hacia los compartimentos vacuolares. Además, las vacuolas inducidas por VacA captan el colorante rojo neutro de manera uniforme, indicando la naturaleza ácida de las mismas. Sin embargo, sólo algunas vacuolas inducidas por la citolisina VCC se tiñen con este colorante, indicando la presencia de vacuolas tanto ácidas como no ácidas dentro de una misma célula. Este hecho denota la diferencia en los microambientes vacuolares en la intoxicación con la proteína VCC y establece que existe un doble origen de estas vacuolas, endosomal y no endosomal.³³

También se ha demostrado que las vacuolas presentan marcadores de diferentes compartimentos intracelulares,

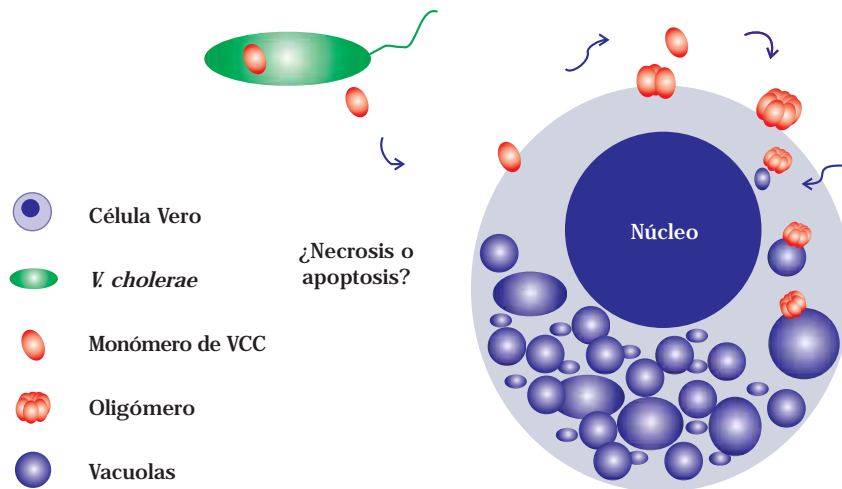


Figura 1. Mecanismo de acción de la toxina VCC de *V. cholerae*. Las cepas de *V. cholerae* productoras de VCC secretan a la toxina en forma de monómero, los cuales se unen a su célula blanco y, después de ser convertidos en su forma activa, se insertan en la membrana para formar un poro heptamérico con actividad de canal iónico. El oligómero es entonces internalizado y se asocia con compartimentos membranales con marcadores de diferente naturaleza que promueven la formación de vacuolas. El evento final de las células intoxicadas y vacuolizadas por la proteína VCC, es la muerte celular.

como son la proteína rab7, una GTPasa que regula etapas tardías de tráfico endosomal; LAMP-1, una glicoproteína asociada a lisosomas y elementos de compartimentos trans-Golgi. Sin embargo, no se lograron detectar vacuolas con marcadores de endosomas tempranos, como son los receptores de transferrina y calreticulina. Estas evidencias corroboran que las vacuolas inducidas por la toxina VCC se originan de más de un tipo de compartimiento de naturaleza ácida³⁸ (Figura 1).

Con base en datos preliminares que indican que la proteína VCC es capaz de formar un canal selectivo permeable a iones,^{39,40} se han utilizado inhibidores de canales aniónicos para determinar si el canal formado por la citolisina VCC participa en el efecto vacuolizante, empleando como modelo de vacuolización células Vero intoxicadas con toxina purificada.³⁸ Los resultados obtenidos mostraron una eficiente inhibición de la vacuolización de células Vero de manera dosis dependiente, además de prevenir la lisis celular después de 24 horas de incubación con la toxina; esto último fue detectado mediante la exclusión al azul tripano. Estos datos sugieren que el canal aniónico de la toxina VCC es la lesión molecular en la célula, que eventualmente resulta en la formación de vacuolas y también en la muerte por lisis.^{33,38}

CONCLUSIÓN

Las evidencias que demuestran que la toxina VCC de *V. cholerae* exhibe actividad vacuolizante en células nucleadas resultan muy interesantes por varias razones. Primero, sólo otras pocas toxinas bacterianas con efecto inductor de vacuolización han sido identifica-

das, como son la aerolisina, una toxina formadora de poros producida por *Aeromonas hydrophila*⁴¹ y la toxina VacA de *H. pylori*.⁴² Segundo, las hemolisinas en su carácter de toxinas formadoras de poros, son factores de patogenicidad preponderantes en otras bacterias como *V. parahemolyticus*, por ejemplo.⁴³ Los antecedentes que determinan que la proteína VCC induzca vacuolización dejan abierta la posibilidad que esta toxina pueda contribuir con los síntomas gastrointestinales asociados con infecciones provocadas por algunas cepas de *V. cholerae*, particularmente en las infecciones que involucran cepas no-O1 que no expresan enterotoxinas bien establecidas, como la toxina colérica. Finalmente, se ha determinado que la hemolisina en concentraciones altas (> 60 pM) es capaz de inducir lisis en células nucleadas;³⁸ sin embargo, se desconoce si la proteína, al vacuolizar a las células Vero, ejerce un mecanismo de muerte celular alternativo a la necrosis. Esto, sin lugar a dudas, abre la posibilidad de futuras investigaciones.

REFERENCIAS

1. Faruque SM, Nair GB. Molecular ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiol Immunol 2002; 2: 59-66.
2. Kaper JB, Morris JG, Levine MV. *Cholerae*. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 48-86.
3. Chatterjee SN, Chaudhuri K. Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae* I. Physical and chemical characterization. Biochim Biophys Acta 2003; 1639: 65-79.
4. Reidl J, Klose KE. *Vibrio cholera* and cholera: out of the water and into the host. FEMS Microbiol Revs 2002; 26: 125-139.
5. Weil AA, Ivers LC, Harris JB. Cholera: lessons from Haiti and beyond. Curr Infect Dis Rep 2012; 14: 1-8.
6. Dick MH, Guillemin M, Moussy F, Chaignat CL. Review of two decades of cholera diagnostics –how far have we really come? PLOS Negl Trop Dis 2012; 6: 1-8.

7. Lizárraga-Partida ML, Quilici ML. Molecular analyses of *Vibrio cholerae* O1 clinical strains, including new nontoxigenic variants isolated in Mexico during the cholera epidemic years between 1991 and 2000. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1364-1371.
8. Alam M, Nusrin S, Islam A, Bhuiyan A, Rahim N, Delgado G, Morales R, Mendez JL, Navarro A, Gil AI, Watanabe H, Morita M, Nair GB, Cravioto A. Cholera between 1991 and 1997 in Mexico was associated with infection by Classical, El Tor, and *El Tor variants* of *Vibrio cholerae*. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 3666-3674.
9. Alam M, Islam MT, Rashed SM, Johura F, Bhuiyan NA, Delgado G, Morales R, Mendez JL, Navarro A, Watanabe H, Hasan NA, Colwell RR, Cravioto A. *Vibrio cholerae* Classical biotype strains reveal distinct signatures in Mexico. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 212-216.
10. Taylor RK, Miller VL, Furlong DB, Mekalanos JJ. Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor co-ordinately regulated with cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 2833-2837.
11. Lencer WL. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions. *V. cholerae*: invasion of the intestinal epithelial barrier by a stably folded protein toxin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G781-G786.
12. Trucksis M, Galen JE, Michalski J, Fasano A, Kaper JB. Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a *V. cholerae* virulence cassette. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5267-5271.
13. Fasano A, Baudry B, Pumphlin BW, Wasserman SS, Tall BD, Ketley JM, Kaper JB. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88 (12): 5242-5246.
14. Pearson GD, Woods A, Chiang SL, Mekalanos JJ. CTX genetic element encodes a site specific recombination system and an intestinal colonization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3750-3754.
15. Honda T, Finkelstein RA. Purification and characterization of a hemolysin produced by *Vibrio cholerae* biotype El Tor: another toxic substance produced by cholera vibrios. *Infect Immun* 1979; 26: 1020-1027.
16. Ichinose Y, Yamamoto K, Nakasone N, Tanabe MJ, Takeda T, Miwatani T, Iwanaga M. Enterotoxicity of el Tor-like hemolysin of non-O1 *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 1987; 55: 1090-1093.
17. Goldberg SL, Murphy JR. Cloning and characterization of the hemolysin determinants from *Vibrio cholerae* RV79(HlyA+), RV79(HlyA-), and 569B. *J Bacteriol* 1985; 162: 35-41.
18. Ogierman MA, Fallarino A, Riess T, Williams SG, Attridge SR, Manning PA. Characterization of the *Vibrio cholerae* El Tor lipase operon lipAB and a protease gene downstream of the hly region. *J Bacteriol* 1997; 179: 7072-7080.
19. Manning PA, Brown MH, Heuzenroeder MW. Cloning of the structural gene (hly) for the haemolysin of *Vibrio cholerae* Tor strain O17. *Gene* 1984; 3: 225-231.
20. Yamamoto K, Ichinose Y, Shinagawa H, Makino K, Nakata A, Iwanaga M, Honda T, Miwatani T. Two step processing for activation of the cytotoxin/hemolysin of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor: nucleotide sequence of the structural gene (hlyA) and characterization of the processed products. *Infect Immun* 1990; 58: 4106-4116.
21. Stoeber JA, Payne SM. Iron-regulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 1988; 56: 2891-2895.
22. Nagamune K, Yamamoto K, Naka A, Matsuyama J, Miwatani T, Honda T. *In vitro* proteolytic processing and activation of the recombinant precursor of El Tor cytotoxin/hemolysin (pro-HlyA) of *Vibrio cholerae* by soluble hemagglutinin/protease of *V. cholerae*, trypsin, and others proteases. *Infect Immun* 1996; 64(11): 4655-4658.
23. Valeva A, Walev I, Weis S, Boukhalouk F, Wassenaar TM, Endres K, Fahrenholz F, Bhakdi S, Zitzer A. A cellular metalloproteinase activates *Vibrio cholerae* pro-cytolysin. *J Biol Chem* 2004; 279: 25143-25148.
24. Saha N, Banerjee KK. Carbohydrate-mediated regulation of interaction of *Vibrio cholerae* hemolysin with erythrocyte and phospholipid vesicle. *J Biol Chem* 1997; 272: 162-167.
25. Zitzer A, Bittman R, Verbicky CA, Erukulla RK, Bhakdi S, Weis S, Valeva A, Palmer M. Coupling of cholesterol and cono-shaped lipids in bilayers augments membrane permeabilization by the cholesterol-specific toxin streptolysin O and *Vibrio cholerae* cytotoxin. *J Biol Chem* 2001; 276: 14628-14633.
26. Chattopadhyay K, Banerjee KK. Unfolding of *Vibrio cholerae* hemolysin induces oligomerization of the toxin monomer. *J Biol Chem* 2003; 278: 38470-38475.
27. Harris JR, Bhakdi S, Meissner U, Scheffler D, Bittman R, Li G, Zitzer A, Palmer M. Interaction of the *Vibrio cholerae* cytotoxin (VCC) with cholesterol, some cholesterol esters, and cholesterol derivatives: a TEM study. *J Struct Biol* 2002; 139: 122-135.
28. Zhang D, Takahashi J, Seno T, Tani Y, Honda T. Analysis of receptor for *Vibrio cholerae* El Tor hemolysin with a monoclonal antibody that recognizes glycophorin B of human erythrocyte membrane. *Infect Immun* 1999; 67: 5332-5337.
29. Krasilnikov O, Yudasheva LN. Transmembrane cholesterol migration in planar lipid membranes measured with *Vibrio cholerae* cytotoxin as molecular tool. *Biochimie* 2009; 91: 620-623.
30. Mazumdar B, Ganguly S, Ghosh AN, Banerjee KK. The role of C-terminus carbohydrate-binding domain of *Vibrio cholerae* haemolysin/cytotoxin in the conversion of the pre-pore β -barrel oligomer to a functional diffusion channel. *Indian J Med Res* 2011; 133: 131-137.
31. De S, Olson R. Crystal structure of the *Vibrio cholerae* cytotoxin heptamer reveals common features among disparate pore-forming toxins. *Proc Natl Acad Sci* 2011; 108: 7385-7390.
32. Kloft N, Busch T, Neukirch C, Weis S, Boukhalouk F, Bobkiewicz W, Cibis I, Bhakdi S, Husemann M. Pore-forming toxins activate MAPK p38 by causing loss of cellular potassium. *Biochem Biophys Res Comm* 2009; 385: 503-506.
33. Figueroa-Arredondo P, Heuser JE, Akopyants NS, Morisaki JH, Giono S, Enriquez F, Berg DE. Cell vacuolation caused by *Vibrio cholerae* hemolysin. *Infect Immun* 2001; 69: 1613-1624.
34. Vidal EJ, Enríquez-Rincón F, Giono-Cerezo S, Ribas-Aparicio RM, Figueroa-Arredondo P. Culture supernatants from *V. cholerae* O1 El Tor strains isolated from different geographic areas induce cell vacuolation and cytotoxicity. *Salud Publica Mex* 2009; 51: 39-47.
35. Mitra R, Figueroa P, Mukhopadhyay AK, Shimada T, Takeda Y, Berg DE, Nair GB. Cell vacuolation, a manifestation of the El Tor hemolysin of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 2000; 68: 1928-1933.
36. Coelho A, Andrade JR, Vicente ACP, Di Rita VJ. Cytotoxic cell vacuolation activity from *Vibrio cholerae* hemolysin. *Infect Immun* 2000; 68: 1700-1705.
37. Cover TL, Krishna US, Israel DA, Peek RM. Induction of gastric epithelial cells apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Res* 2003; 63: 951-957.

38. Moschioni M, Tombola F, de Bernard M, Coelho A, Zitzer A, Zoratti M, Montecucco C. The *Vibrio cholerae* haemolysin anion channel is required for cell vacuolation and death. *Cel Microbiol* 2002; 4: 397-409.
39. Krasilnikov OV, Muratkhodjaev JN, Zitzer AO. The mode of action of *Vibrio cholerae* cytolysin. The influences on both erythrocytes and planar lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1111: 7-16.
40. Menzl K, Maier E, Chakraborty T, Benz R. HlyA hemolysin of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. Identification of the hemolytic complex and evidence for the formation of anion-selective ion-permeable channels. *Eur J Biochem* 1996; 240: 646-654.
41. Abrami L, Fivaz M, Glauser PE, Parton RG, van der Goot FG. A pore-forming toxin interacts a GPI-anchored protein and causes vacuolation of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 1998; 140: 525-540.
42. Cover TL, Blaser MJ. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1992; 267: 10570-10575.
43. Huntley JS, Hall AC, Sathyamoorthy V, Hall RH. Cation flux studies of the lesion induced in human erythrocytes membranes by the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahemolyticus*. *Infect Immun* 1993; 61: 10; 4326-4332.

Correspondencia:

[Carlos Alberto Castañón-Sánchez](#)

Subdirección de Enseñanza e Investigación
Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca
Domicilio conocido s/n,
San Bartolo Coyotepec, 71256, Oaxaca.
E-mail: carlos.ctn@gmail.com