

## Efecto citotóxico de la proteína VCC de *Vibrio cholerae* en células HEK-293

Carlos Alberto Castañón-Sánchez,\* Fernando Enríquez-Rincón,† Paula Figueroa-Arredondo‡

### RESUMEN

*Vibrio cholerae* no-O1 es un amplio grupo de cepas no productoras de toxina colérica (CT<sup>-</sup>) que aún son capaces de causar diarrea en humanos. En el género *Vibrio cholerae*, la toxina que resulta un mejor candidato causal de diarrea no colérica es una toxina formadora de poros, la citolisina denominada «*V. cholerae* cytolysin», por sus siglas en inglés: VCC. Nuestro grupo previamente ha estudiado a la VCC como una toxina inductora de vacuolización en células eucariontes. Para continuar la caracterización del papel de la VCC como factor de virulencia en la patogenia de *V. cholerae*, consideramos necesario caracterizar la sensibilidad del modelo de las células HEK-293, dado que estas células se usan para expresar proteínas foráneas a partir de genes clonados en plásmidos. Para conseguir esto, las HEK-293 se sometieron al reto con sobrenadantes bacterianos estériles, ricos en VCC (1:20). Este estudio presenta evidencia de que la toxina VCC producida por las cepas de *V. cholerae* no-O1 de nuestra colección induce efecto citotóxico en HEK-293.

**Palabras clave:** *Vibrio cholerae*, citolisina, toxina formadora de poros, células HEK-293.

### ABSTRACT

The non-O1 *Vibrio cholerae* group is composed by many diverse strains that are non-cholera toxin producers (CT<sup>-</sup>) or non-toxigenic strains, but still they are diarrheagenic and cytotoxic. These characteristics are attributed to the presence of a pore-forming toxin: the *V. cholerae* cytolysin (also known as VCC), since it is the best candidate to cause diarrhea in the human host. Characterization of the VCC as a vacuolation-inducer toxin was previously conducted by our group in tumorigenic and immortalized cell lines. In order to continue the study of the cytotoxicity of the VCC, we have chosen the HEK-293 cell line as a model of study that would help to further determine the role of the VCC as a virulence factor in the non O1 *V. cholerae* pathogenesis, since these cells are used for foreign protein expression from plasmids with the cloned genes. In vitro challenges were performed applying sterile bacterial supernatants rich in VCC (1:20) to HEK-293 cells, and later on, a microscopic search for cytotoxicity was performed. Here we show that there is a cytotoxic effect on HEK-293 cells, directly related to VCC, the toxin hyper-produced by *V. cholerae* non-O1 strains from our strain collection.

**Key words:** *Vibrio cholerae*, cytolysin, pore-forming toxin, HEK-293 cells.

www.medigraphic.org.mx

**Recibido para publicación:** 05 noviembre 2014. **Aceptado para publicación:** 28 febrero 2015.

\* Laboratorio de Investigación, Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca.

† Laboratorios Nacionales de Servicios Especializados (LaNSE), Centro de Investigación y Estudios Avanzados, campus Zacatenco, Instituto Politécnico Nacional.

‡ Laboratorio de Bioquímica de la Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional.

#### Correspondencia:

Dra. Paula Figueroa Arredondo  
Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional.  
E-mail: paula\_figueroa@outlook.com

## INTRODUCCIÓN

El patógeno humano *Vibrio cholerae* es endémico en muchas regiones del mundo y responsable de entre tres y cinco millones de casos de cólera y 100,000 a 120,000 muertes por año.<sup>1</sup> Tanto las cepas toxigénicas (productoras de CT) como las no toxigénicas producen la citolisina de *V. cholerae* (VCC), que causa daño celular permeabilizando a las células intestinales humanas,<sup>2</sup> induciendo vacuolización,<sup>3</sup> y en un modelo murino, facilita significativamente la colonización intestinal.<sup>4</sup>

La toxina VCC se clasifica como una  $\beta$ -PFT (proteína formadora de poros tipo  $\beta$ ) que se expresa como una pre-prototoxina de 82 kDa (kiloDaltones),<sup>5</sup> que luego de un procesamiento proteolítico en el periplasma, se secreta como una prototoxina de 79 kDa.<sup>6,7</sup> La remoción proteolítica de 132 residuos de su extremo aminoterminal genera una proteína madura de 65 kDa. La toxina madura secretada presenta dos dominios de unión homólogos a ricina<sup>8</sup> y un dominio citolítico involucrado en su oligomerización y anclaje a la región hidrofóbica de la bicapa lipídica de las células eucariontes para generar un poro con estructura en el espacio en forma de un barril- $\beta$  heptamérico, que actúa como un canal transmembranal y funcional de 3.0 nm de diámetro, cuyo canal de difusión mide 1.5 nm.<sup>7</sup> Recientemente se describió que la mutación Ala425Val es crítica y compromete la interacción de la VCC con la membrana de manera dependiente de colesterol y, por ende, la formación del poro.<sup>9</sup>

Además de los estudios biofísicos y estructurales que han documentado diferentes características del modelo de ensamble de la toxina VCC empleando membranas lipídicas planares y liposomas, un papel patogénico de la enteritis inducida por VCC describió su capacidad de acumulación de fluidos en un modelo de asa ligada de conejo.<sup>10</sup> Este grupo de investigación previamente reportó que los sobrenadantes de cultivos de *V. cholerae* no-O1 inducen vacuolización sobre células inmortalizadas Vero de riñón de mono verde africano y células tumorigénicas HeLa derivadas de cáncer cervical humano.

Dado que la sensibilidad frente a la toxina VacA de *Helicobacter pylori* varía considerablemente entre diferentes tipos celulares,<sup>11</sup> es importante comprobar si la citotoxicidad inducida por la VCC es consistente en las células HEK-293.

El fenotipo de vacuolización de los *Vibrio* no-O1 se ha descrito previamente empleando sobrenadantes de cepas de *V. cholerae* aisladas de todo el mundo (Asia, USA,

Brasil, Argentina<sup>3,12,13</sup>) y presentaron intoxicación por VCC con diferentes sensibilidades.<sup>14</sup> El objetivo de este trabajo es ampliar el estudio de citotoxicidad inducida por la toxina VCC en células HEK-293 como un nuevo modelo de estudio celular, dado que estas células se usan para expresar proteínas foráneas a partir de genes clonados en plásmidos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### CEPAS BACTERIANAS

Las cepas de *V. cholerae* no-O1 69750 y 52201 son cepas de referencia que originalmente fueron aislados clínicos<sup>3</sup> seleccionados por ser hiperproductores de la toxina VCC, además de carecer de los genes *ctxA* y *ctxB* (evidenciado mediante PCR y *dot blot*).<sup>3</sup> La cepa de referencia del biotipo clásico *V. cholerae* O395 fue elegida como control negativo debido a que su gen estructural *hlyA* presenta delección de los primeros 723 pares de bases del marco de lectura abierta (*Universal Protein Resource Knowledgebase* [UniProtKB], número de acceso A5EYU3), lo cual la convierte en una mutante negativa natural del gen de la VCC.<sup>15</sup>

Por otra parte, la cepa de referencia *V. cholerae* C-6706 pertenece al biotipo El Tor, es hemolítica con baja eficiencia y es un control positivo no hiperproductor de VCC. Los pies de cepa se preservan a -70 °C en caldo Luria Bertani (LB) con glicerol al 30%.

### CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE LA TOXINA VCC

Las cepas de *V. cholerae* se crecieron de acuerdo con Honda y Finkelstein,<sup>16</sup> como se indica: se realizaron cultivos por 16 a 18 horas a 37 °C en 5 mL de medio LB en agitación constante a 150 rpm (revoluciones por minuto) hasta alcanzar el crecimiento en fase estacionaria. Las bacterias se concentraron por centrifugación a 5,000 rpm en una microcentrífuga refrigerada Eppendorf a 4 °C para obtener los sobrenadantes, mismos que se colectaron y esterilizaron por filtración empleando filtros MF (Millipore Corporation) con un diámetro de 45 mm, a través de poros de 0.22  $\mu$ m.

### ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS HEK-293

Células HEK-293 (CRL-1573) de la *American Type Culture Collection* (ATCC) se crecieron a confluencia a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en placas petri (Cor-

ning) de 100 mm que contenían medio esencial de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) (Life Technologies Corporation) suplementado con suero fetal bovino al 10% (Hyclone Laboratories, Inc.), mezcla de aminoácidos no esenciales al 1%, L-glutamina 5 mM, penicilina G 100 U/mL, y 100 µg/mL de sulfato de estreptomina (todos de Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO). Las células se cosecharon por tratamiento con tripsina-EDTA al 0.025% (Sigma-Aldrich) y se diluyeron con D-MEM hasta obtener  $5 \times 10^4$  células/100 µL. Se adicionaron alícuotas de 180 µL que contenían 50,000 células a los pozos de microplacas (96) hasta alcanzar una confluencia del 70-80%. Por otra parte, se emplearon filtrados estériles de los cultivos de *V. cholerae* (1:20), mismos que se aplicaron sobre las células HEK-293. Estos ensayos de reto citotóxico se incubaron durante 24 horas y se observaron en microscopio invertido. Para documentar los resultados de las pruebas, las células se lavaron dos veces con *buffer* de fosfatos (PBS), se fijaron en 1 mL de metanol absoluto y se tiñeron con colorante de Wright (Hyclon). Las preparaciones se secaron a temperatura ambiente y se examinaron al microscopio en un TS100/10F (Nikon Corporation) para su fotodocumentación.

#### INHIBICIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO

La prueba de inhibición específica del efecto citotóxico se realizó por competencia con un anticuerpo específico. Las células HEK-293 se sometieron a pretratamiento con diferentes concentraciones de anti-suero policlonal de conejo anti-VCC (1:500) (donado por el profesor Takeshi Honda, Kioto, Japón) en 3 mL de medio D-MEM fresco durante una hora a 37 °C, seguido de la adición de la toxina correspondiente en los sobrenadantes de cultivo ricos en la VCC. La mezcla se incubó con las células a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas para su posterior observación microscópica en vivo, y luego se prepararon para tinción de Wright, como se mencionó antes.

## RESULTADOS

Experimentos previos realizados por nuestro grupo de investigación y usando diferentes enfoques han demostrado que los sobrenadantes de cultivos de *V. cholerae* no-O1 aislados de diferentes áreas geográficas de México inducen vacuolización y lisis; es decir, la toxina VCC causa efecto citotóxico vacuolizante<sup>3</sup> en varias líneas celulares eucariotes como HeLa (derivadas de carcinoma de cérvix uterino humano) y Vero (derivadas de

riñón de mono verde africano). Estos hallazgos fueron corroborados en el trabajo de Moschioni y colaboradores,<sup>14</sup> que estableció las diferentes rutas de transcitosis usadas por la toxina desde su unión con la membrana plasmática.

Existe otra toxina vacuolizante que usamos como prototipo, la toxina VacA de *Helicobacter pylori*; dado que los diferentes tipos celulares<sup>11</sup> no presentan una sensibilidad uniforme frente a la toxina, consideramos necesario comprobar si la citotoxicidad inducida por la VCC es consistente en las células HEK-293 y así poder usar este linaje celular para experimentos de expresión en eucariotes del gen de la toxina.

Recientemente, un estudio mostró que la toxina VCC induce vacuolización en células Vero, HeLa y BHK después de 24 horas de incubación. Interesantemente, no se observó vacuolización ni disminución rápida de la TER (resistencia transepitelial eléctrica) en las líneas celulares T84 y MDCK-1.<sup>14</sup> Estos experimentos muestran que puede existir sensibilidad diferencial a la exposición con la toxina VCC, lo que puede afectar el tipo de efecto citotóxico observado.

En este trabajo se utilizaron cultivos de la línea celular HEK-293 (ATCC: CRL-1573) con la finalidad de extender los estudios de sensibilidad a la vacuolización y daño celular por la toxina VCC de *V. cholerae*. La HEK-293 se ha usado como modelo de estudio de proteínas eucariotes del tipo de canales iónicos, lo que resulta muy adecuado, dado que la VCC, siendo formadora de poros tipo canal, se considera que mimetiza en la célula el efecto de un aumento de canales aniónicos.<sup>14</sup>

La capacidad vacuolizante del sobrenadante de la cepa 69750 reportada por Figueroa y colegas<sup>3</sup> se verificó preliminarmente con células Vero (no se muestra) y se determinó que la dilución 1:20 era la adecuada para inducir citotoxicidad vacuolizante en al menos el 50% de la monocapa celular, por lo que esta dilución se seleccionó para aplicar los tratamientos frente a monocapas similares de células HEK-293.

El reto de las HEK-293 con los filtrados estériles provenientes de la cepa hiperproductora de VCC 69750 causó citotoxicidad por redondeo y lisis celular, que finalmente condujo a la pérdida de la monocapa celular. Inicialmente, se advirtió que las células pierden los contactos intercelulares y su morfología característica se modifica, observándose células individuales redondeadas y acúmulos de células redondeadas acinadas (*Figura 1A*), que lucen dañadas en comparación con las células de los controles sin tratamiento (*Figura 1B*).

Después de 24 horas de incubación, la mayoría de las células intoxicadas flotaron muertas en el medio de cultivo de la prueba. De manera interesante, en este

modelo de estudio *in vitro*, las células no presentaron la vacuolización característica de las otras estirpes celulares estudiadas, como el caso de las células Vero o HeLa;<sup>3,12</sup> sin embargo, sí se notó daño celular grave, consistente en lisis celular, lo cual sugiere fuertemente que las HEK-293 son más sensibles ante los tratamientos con la VCC, ya que se produce lisis celular antes de inducir los mecanismos de supervivencia implicados en la vacuolización.

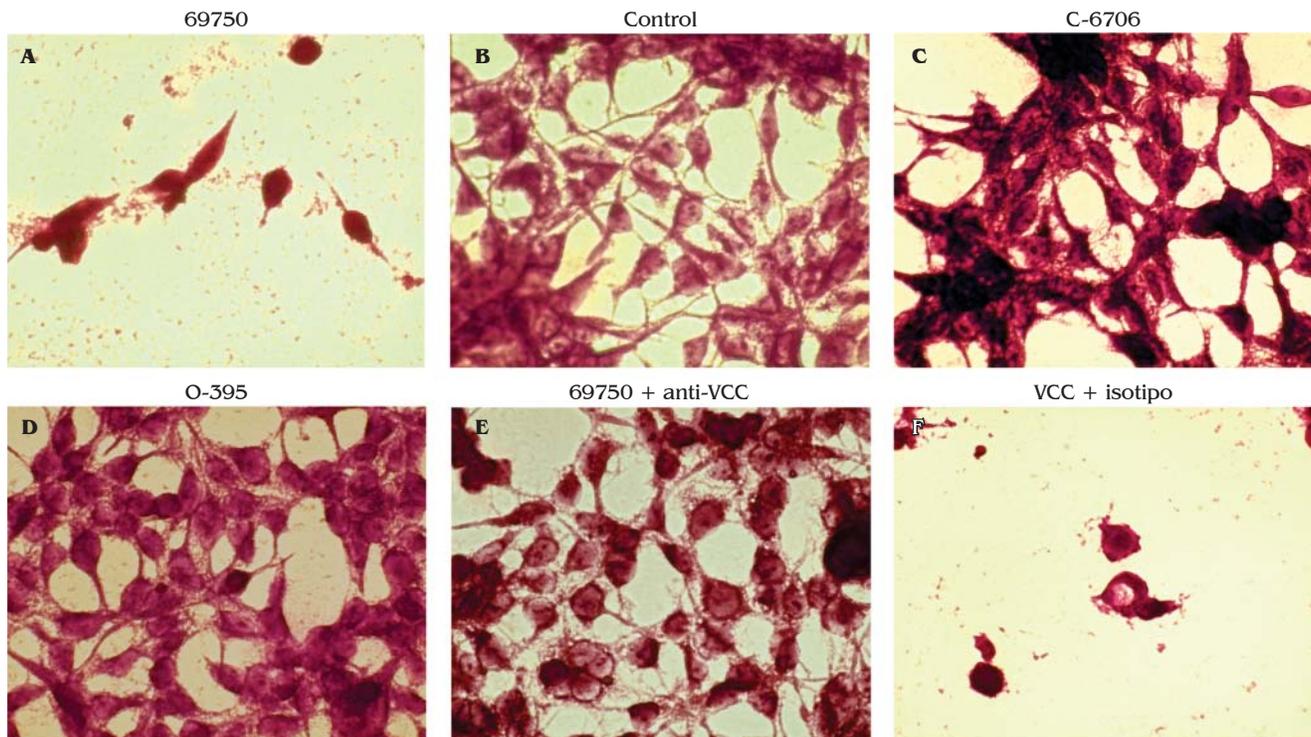
Cuando se trataron las células HEK-293 con sobrenadantes de las cepas de *V. cholerae* O1 del biotipo El Tor C-6706 (Figura 1C) y O-395 del biotipo clásico (Figura 1D) en las mismas condiciones (dil 1:20) no se observó efecto citotóxico de ningún tipo, conservando una morfología muy similar a la de las células de los pozos control sin tratamiento (Figura 1B).

A fin de establecer que el efecto citotóxico sobre la línea celular HEK-293 lo produce específicamente la toxina VCC, se realizaron experimentos de inhibición

del efecto citotóxico por antisuero policlonal específico contra la toxina VCC. Los resultados mostraron que el efecto citotóxico de sobrenadantes de cultivos ricos en VCC (Figura 1E, 69750) fue completamente abolido cuando se aplicó el antisuero anti-VCC (Figura 1E, 69750 + suero anti-VCC), lo cual sugiere fuertemente que otros componentes del sobrenadante bacteriano diluido no contribuyen en la citotoxicidad de estas pruebas. Como se esperaba, experimentos control usando anticuerpos isotipo (no relacionados) no tuvieron efecto ni fueron capaces de bloquear el daño celular producido por la VCC (Figura 1F, 69750 + anticuerpos isotipo).

## DISCUSIÓN

En este estudio se describe el efecto de los filtrados estériles de cultivos de *V. cholerae* no-O1 69750 ricos en



**Figura 1.** Efecto citotóxico de la toxina VCC en células HEK-293 y ensayo de inhibición específica. Los cultivos de células HEK-293 se trataron con una dilución 1:20 del sobrenadante de cada cepa, como sigue: (A) sobrenadante de la cepa hiperproductora de la toxina VCC *V. cholerae* 69750; (B) control sin tratamiento; (C) control de sobrenadante *V. cholerae* C-6706, una baja productora de la toxina VCC; (D) Control de sobrenadante de la mutante no productora de la toxina VCC, *V. cholerae* O395; (E) ensayo de inhibición específica usando la toxina de *V. cholerae* 69750 en presencia del antisuero específico anti-VCC; (F) control de especificidad del ensayo de inhibición usando toxina de *V. cholerae* 69750 en presencia de antisuero isotipo. Al término del ensayo, las células se tiñeron con colorante de Wright y se observaron en un microscopio óptico Nikon TS100 (20 X). El efecto citotóxico es específico y característico de la toxina VCC presente en sobrenadantes de la cepa 69750 de *V. cholerae* no-O1, como lo muestra la inhibición del mismo en presencia del antisuero específico contra la VCC.

toxina vacuolizante VCC sobre células HEK-293. Este trabajo muestra que las células HEK-293 tratadas ya sea con sobrenadantes ricos en toxina o con la proteína purificada VCC (ensayos que no se muestran) inducen citotoxicidad, consistente redondeo, pérdida de la morfología celular normal, pérdida de la adherencia y el contacto intercelular, formación de grupos de células aglutinados que se desprenden fácilmente de la superficie de la placa de cultivo y que son producto de la lisis celular evidenciada, además, mediante la prueba de exclusión del colorante azul de tripán.

El efecto vacuolizante se describió previamente en células Vero, HeLa y A431, pero no en células MDCK y BHK20,<sup>3,12,14</sup> empleando títulos de dilución en experimentos con células Vero similares a los reportados con sobrenadantes de la cepa *V. cholerae* amazonia.<sup>17</sup>

Estos resultados extienden el análisis del efecto citotóxico de la VCC a la línea celular HEK-293; sin embargo, bajo las condiciones dichas no observamos el efecto vacuolizante previamente descrito en las líneas celulares HeLa y Vero, lo que sugiere que en las células HEK-293 probablemente no se llevan a cabo las señales de supervivencia que inician el proceso de autofagia, reportado en 2002 para la VCC.<sup>18</sup>

La sensibilidad a la toxina dependerá tanto de la susceptibilidad de las células tratadas como de las características moleculares de su proteína.

Haciendo un poco de historia, podemos decir que la toxina VCC inicialmente fue descrita como una hemolisina cuyo gen es *hlyA*, por lo que a la proteína se le denominó HlyA y se descubrió debido a su actividad lítica sobre células hemáticas. Los estudios con eritrocitos de diferentes especies revelaron un espectro de sensibilidad de las células frente a la VCC: la actividad hemolítica es alta en eritrocitos de conejo, cabra, ratón y oveja. La toxina presenta baja actividad hemolítica en eritrocitos de pollo, caballo y humano.<sup>16</sup>

La incrementada actividad hemolítica puede derivarse de la abundancia diferencial de N-glicanos con repetidos Gal-β1,4-GlcNac en las membranas citoplásmicas de los eritrocitos, cuya presencia incrementaría la actividad lítica de VCC, como recientemente se postuló.<sup>19</sup> La afinidad por las células blanco también podría estar en función de su dominio de lectina que se une con complejos N-glicano en la célula, lo que contribuye a la actividad de la toxina, cuya potencia es alta aun a concentraciones picomolares. Interesantemente, pequeñas variaciones en la secuencia de la proteína VCC pueden generar fenotipos con actividades diferenciales, como por ejemplo, la descripción realizada por nuestro grupo de la cepa El Tor C7986 (*hlyA*<sup>+</sup>), que es incapaz de inducir lisis

de eritrocitos, pero preserva su capacidad citotóxica y vacuolizante.<sup>20</sup>

Es necesario, sin embargo, realizar investigaciones más profundas para evidenciar si en las células HEK-293 se lleva a cabo lisis directamente, o bien, existe el proceso de autofagia a tiempos más cortos. Dado que la toxina VCC posee dominios diferentes, éstos podrían ser responsables de inducir diferentes tipos de efecto citotóxico; además, la naturaleza de su receptor específico en células nucleadas aún debe ser identificada.

## BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. Cholera. 2012. Available in: <http://www.who.int/mediacentre/factheets/fs107/en/>
2. Zitzer A, Wassenaar TM, Walev I, Bhakdi S. Potent membrane-permeabilizing cytotoxic action of *Vibrio cholerae* cytolysin on human intestinal cells. *Infect Immun*. 1997; 65: 1293-1298.
3. Figueroa-Arredondo P, Heuser JE, Akopyants NS, Morisaki JH, Giono-Cerezo S, Enríquez-Rincón F et al. Cell vacuolation caused by *Vibrio cholerae* hemolysin. *Infect Immun*. 2001; 69: 1613-1624.
4. Olivier V, Queen J, Satchell KJ. Successful small intestine colonization of adult mice by *Vibrio cholerae* requires ketamine anesthesia and accessory toxins. *PLoS One*. 2009; 4 (10): e7352.
5. De S, Olson R. Crystal structure of the *Vibrio cholerae* cytolysin heptamer reveals common features among disparate pore-forming toxins. *Proc Natl Acad Sci*. 2011; 108: 7385-7390.
6. Yamamoto K, Ichinose Y, Shinagawa H, Makino K, Nakata A, Iwanaga M et al. Two step processing for activation of the cytolysin/hemolysin of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor: nucleotide sequence of the structural gene (*hlyA*) and characterization of the processed products. *Infect Immun*. 1990; 58: 4106-4116.
7. Dutta S, Mazumdar B, Banerjee KK, Ghosh AN. Three-dimensional structure of different functional forms of the *Vibrio cholerae* hemolysin oligomer: a cryo-electron microscopic study. *J Bacteriol*. 2010; 192: 169-178.
8. Olson R, Gouaux E. Crystal structure of the *Vibrio cholerae* cytolysin (VCC) pro-toxin and its assembly into a heptameric transmembrane pore. *J Mol Biol*. 2005; 350: 997-1016.
9. Paul K, Chattopadhyay K. Single point mutation in *Vibrio cholerae* cytolysin compromises the membrane pore-formation mechanism of the toxin. *FEBS J*. 2012; 279: 4039-4051.
10. Zitzer AO, Nakisbekov NO, Li AV, Semiotrochev VL, Kiseliov YL, Muratkhodjaev JN et al. Entero-cytolysin (EC) from *Vibrio cholerae* non-O1 (some properties and pore-forming activity). *Zentralbl Bakteriol*. 1993; 279: 494-504.
11. De Bernard M, Burrioni D, Papini E, Rappuoli R, Telford J, Montecucco C. Identification of the *Helicobacter pylori* VacA toxin domain active in the cell cytosol. *Infect Immun*. 1998; 66 (12): 6014-6016.
12. Mitra R, Figueroa P, Mukhopadhyay AK, Shimada T, Takeda Y, Berg DE et al. Cell vacuolation, a manifestation of the El Tor hemolysin of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*. 2000; 68: 1928-1933.
13. Saka HA, Bidinost C, Sola C, Carranza P, Collino C, Ortiz S et al. *Vibrio cholerae* cytolysin is essential for high enterotoxicity and apoptosis induction produced by a cholerae toxin gene-negative *V. cholerae* non-O1, non-O139 strain. *Microb Pathog*. 2008; 44: 118-128.

14. Moschioni M, Tombola F, de Bernard M, Coelho A, Zitzer A, Zoratti M et al. The *Vibrio cholerae* haemolysin anion channel is required for cell vacuolation and death. *Cel Microbiol*. 2002; 4: 397-409.
15. Rader AE, Murphy JR. Nucleotide sequences and comparison of the hemolysin determinants of *Vibrio cholerae* El Tor RV79(Hly+) and RV79(Hly-) and classical 569B(Hly-). *Infect Immun*. 1988; 56: 1414-1419.
16. 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.
17. Coelho A, Andrade JR, Vicente ACP, DiRita VJ. Cytotoxic cell vacuolation activity from *Vibrio cholerae* hemolysin. *Infect Immun*. 2000; 68: 1700-1705.
18. Saka HA, Gutiérrez MG, Bocco JL, Colombo MI. The autophagic pathway: a cell survival strategy against the bacterial pore-forming toxin *Vibrio cholerae* cytolysin. *Autophagy*. 2007; 3 (4): 363-365.
19. Levan S, De S, Olson R. *Vibrio cholerae* cytolysin recognizes the heptasaccharide core of complex N-glycans with nanomolar affinity. *J Mol Biol*, 2013; 424: 944-957.
20. 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 Pública Mex*. 2009; 51: 39-47.