

**CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
DIRECCIÓN DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

RESUMEN

“Obtención y caracterización de cepas atenuadas de *Vibrio cholerae* O139 para identificar ingrediente farmacéutico activo de una vacuna contra el cólera”

**Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias Biológicas**

Autor: Lic. Talena Yamilé Ledón Pérez

Tutor: Dr. Rafael Fando Calzada

La Habana

2013

ABREVIATURAS

| | |
|------------------------|--|
| ADN | ácido desoxirribonucleico |
| Amp / Amp ^r | Ampicillina / Resistencia o resistente a ampicillina |
| APA | Agua peptona alcalina |
| CGM | Cepas genéticamente modificadas |
| CT | del inglés <i>cholera toxin</i> , toxina colérica |
| dNTP | del inglés <i>deoxynucleotide triphosphate</i> , trifosfato de desoxinucleótidos |
| DO _{xnm} | Absorbancia o densidad óptica a determinada (x) longitud de onda |
| EDTA | del inglés etilendiaminotetracetic acid, ácido etilendiamino tetraacético |
| GMT | Del inglés, g eometric m ean t iter, media geométrica del título |
| HA/P | Hemaglutinina proteasa |
| IFA | Ingrediente farmacéutico activo |
| Kan / Kan ^R | Kanamicina / Resistencia o resistente a kanamicina |
| MSHA | Hemaglutinina sensible a manosa |
| NCBI | del inglés <i>National Center for Biotechnology Information</i> , Centro Nacional para la Información Biotecnológica, |
| PBS | del inglés <i>phosphate buffered saline</i> , disolución salina tamponada con fosfato |
| PCR | del inglés <i>polimerase chain reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa |
| Pre-CTXΦ | Precusores de CTXΦ |
| RFLP | del inglés, <i>restriction fragment length polymorphism</i> , polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción |
| SDS-PAGE | Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS |
| SXT | Sulfametoxazol-trimetoprima o el transposón conjugativo que porta los genes que confieren resistencia a estos antibióticos |
| TAE | Tampón Tris-Acetato-EDTA |
| TCP | del inglés <i>toxin co-regulated pilus</i> , pelo co-regulado con la toxina |
| TSB | del inglés <i>triptone soy broth</i> , caldo triptona soya |
| UDO | unidades de densidad óptica |
| UFC | unidades formadoras de colonias |

SÍNTESIS

El cólera causado por *Vibrio cholerae* de serogrupo O139 coexiste en Asia con el causado por vibriones de serogrupo O1. Aunque existen dos vacunas comerciales 60% eficaces contra el serogrupo O1, no existe ninguna con eficacia probada contra el cólera causado por vibriones del serogrupo O139. Se acepta que *Vibrio cholerae* de serogrupo O139 constituya el agente causal de la octava pandemia de cólera; por esta razón en este trabajo se seleccionó el aislado clínico CRC266 como progenitor para la construcción de cepas atenuadas genéticamente, las que pudieran constituir el ingrediente activo de una vacuna viva contra el cólera causado por vibriones del serogrupo O139. Al caracterizar la organización genética de los profagos CTX ϕ en CRC266, se identificó que en el locus *dif* del cromosoma 1 de esta cepa coexisten copias de CTX ϕ intactas con copias carentes de los genes de la toxina colérica, conocidas como precursores de CTX ϕ (pre-CTX ϕ). Como novedad se describe una diversidad alélica en pre-CTX ϕ que permite replantear el modelo explicativo de la relación evolutiva entre estas formas atoxigénicas y las variantes conocidas de CTX ϕ (Clásico, El Tor y Calcuta), asumiendo que diferentes variantes precursoras han adquirido independientemente los genes de la toxina del cólera, para dar lugar a las variantes toxigénicas actuales. Luego la cepa CRC266 se modificó genéticamente mediante la supresión de los profagos CTX ϕ y pre-CTX ϕ del genoma y se obtuvieron las cepas TLP3, TLP11 y TLP13. Mediante remplazo alélico el gen *hapA* de TLP13, codificante de la proteasa soluble principal de *Vibrio cholerae* (hemaglutinina/proteasa), se sustituyó por un alelo interrumpido por el gen *celA* de *Clostridium thermocellum* que codifica la endoglucanasa A. En consecuencia, las cepas obtenidas TLP131, TLP132 y TLP134 se distinguen de otros vibriones mediante un ensayo bioquímico sencillo y rápido. Finalmente, a TLP132 se le suprimió el gen *mshA* y se obtuvo TLP01, TLP03 y TLP05 que no expresan la fimbria conocida como hemaglutinina sensible a manosa (MSHA). Estas cepas colonizan el intestino del ratón Balb/c lactante sin provocar efecto letal y no se infectan con el fago VGJ ϕ debido a la ausencia del receptor MSHA, por lo cual no readquieren los genes que codifican la toxina colérica mediante la infección y lisogenización con un fago híbrido de CTX ϕ y VGJ ϕ . Las cepas TLP01 y TLP05, no forman biopelículas sobre superficies abióticas en cultivo de laboratorio, característica que limitaría la supervivencia en el entorno natural y actuaría como elemento de contención del agente biológico que constituya el ingrediente activo del candidato vacunal. Estas cepas resultaron inductoras de títulos de anticuerpos con actividad bactericida en el conejo y la rata adultos, por lo que se concluye que las cepas TLP01 y TLP05 reúnen las características necesarias para transitar hacia la fase de desarrollo farmacéutico para posterior evaluación preclínica y clínica de seguridad e inmunogenicidad.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| ABREVIATURAS | i |
| SÍNTESIS | ii |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. MATERIALES Y MÉTODOS | 7 |
| 1.1 Microorganismos, medios de cultivo, procedimientos de microbiología y biología molecular | 7 |
| 1.2 Procedimientos para la caracterización de cepas toxigénicas de <i>V. cholerae</i> O139..... | 8 |
| 1.3 Procedimientos para caracterizar el ordenamiento genético del profago CTX ϕ en la cepa seleccionada..... | 9 |
| 1.4 Procedimientos de obtención de CGM de primera generación desprovistas de los genes de CTX ϕ | 10 |
| 1.5 Procedimientos para la obtención de CGM de segunda generación portadoras del gen de la endoglucanasa A..... | 10 |
| 1.6 Procedimientos para la obtención de las CGM de tercera generación por supresión del gen <i>mshA</i> | 11 |
| 1.7 Procedimientos para verificar el fenotipo de las CGM de <i>V. cholerae</i> O139..... | 11 |
| Ensayo para evaluar la producción de la toxina colérica. | 11 |
| Ensayos para evaluar la actividad endoglucanasa A de las colonias. | 11 |
| Procedimientos de microscopía electrónica para detección de la presencia de flagelo y cápsula. | 11 |
| Procedimientos para evaluar la capacidad de producción de biopelículas..... | 11 |
| 1.8 Evaluación de la capacidad de virulencia y colonización..... | 12 |
| 1.9 Procedimientos para evaluar la susceptibilidad de las CGM de tercera generación a la infección por los fagos VGJ ϕ y CTX ϕ | 12 |
| 1.10 Procedimientos para evaluar la respuesta inmunológica inducida en los modelos de conejo y rata adultos | 13 |
| 1.11 Análisis estadísticos | 13 |
| 2. RESULTADOS y DISCUSIÓN..... | 14 |
| 2.1. Características de cepas toxigénicas de <i>V. cholerae</i> O139 y selección de una cepa precursora para modificación genética con fines vacunales..... | 14 |
| 2.2 Estructura genética del profago CTX ϕ en CRC266 | 15 |
| 2.3 Obtención de cepas genéticamente modificadas de <i>V. cholerae</i> de primera generación | 19 |
| 2.4 Obtención de cepas genéticamente modificadas de <i>V. cholerae</i> de segunda generación..... | 19 |
| 2.5 Obtención de cepas genéticamente modificadas de <i>V. cholerae</i> de tercera generación | 20 |
| 2.6 Virulencia y colonización intestinal en ratones Balb/c de las cepas genéticamente modificadas..... | 21 |
| 2.6 Fenotipo de cepas genéticamente modificadas de <i>V. cholerae</i> O139..... | 22 |
| 2.7 Susceptibilidad a la infección por los bacteriófagos VGJ ϕ y CTX ϕ | 24 |
| 2.8 Respuesta inmunológica en conejos o ratas de cepas atenuadas de <i>V. cholerae</i> O139 | 25 |
| CONCLUSIONES | 29 |
| RECOMENDACIONES | 30 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 31 |
| AUTOBIBLIOGRAFÍA..... | 36 |

INTRODUCCIÓN

El cólera es una enfermedad diarreica aguda que provoca deshidratación severa rápida en el humano. Aunque el 75% de las infecciones transcurren asintomáticas o leves, el 25% restante requiere atención médica oportuna para salvar la vida del paciente. El costo de cada ingreso por cólera y la atención hospitalaria se ha estimado entre 15 y 206 USD (Poulos y cols., 2012). Puesto que un episodio de cólera o la infección asintomática inducen protección inmunológica duradera y la vacunación es una de las estrategias de mayor costo-efectividad probadas, la obtención de una vacuna eficaz y barata contra el cólera constituye un objetivo razonable.

El cólera es endémico en más de 50 países y ocasiona entre tres y cinco millones de casos y 200 000 muertes anuales y la tasa de letalidad alcanza hasta un 30% en grupos vulnerables expuestos a situaciones de riesgo (Clemens y cols., 2011). Esta enfermedad diarreica aguda es causada por la actividad bioquímica de la toxina colérica producida durante la infección intestinal del humano por la bacteria Gram-negativa *Vibrio cholerae*. Entre más de 200 serogrupos de *V. cholerae* identificados, sólo los serogrupos O1 y O139 se han asociado a brotes epidémicos de la enfermedad, siendo *V. cholerae* O1 de biotipo El Tor el agente etiológico predominante en la actualidad.

Sin embargo, *V. cholerae* O139 es un serogrupo emergente que se aisló por primera vez en la India a finales de 1992. Las cepas de este serotipo, conocidas como cepas emergentes, se extendieron rápidamente hacia diversas regiones de cólera endémico de este país y hacia países vecinos incluyendo Bangladesh, Pakistán, Tailandia, China, Malasia y Rusia (Ramamurthy y cols., 1993; Nair y cols., 1994). En algunos lugares las cepas del nuevo serogrupo, desplazaron totalmente a las del serogrupo O1, aunque el surgimiento de una variante diferente de *V. cholerae* de serogrupo O1 y biotipo El Tor revirtió esta situación (Sharma y cols., 1997). Posteriormente han ocurrido reapariciones cíclicas de variantes diferentes de *V. cholerae* O139 en la India, China y Bangladesh, conocidas como cepas re-emergentes.

Una de las variaciones que ha caracterizado a estas nuevas cepas se refiere al patrón de susceptibilidad a los antibióticos, particularmente a estreptomina, trimetoprima, sulfametoxazol y cloranfenicol. En las cepas O139 los genes que confieren la resistencia a estos antibióticos son portados por un transposón conjugativo auto transmisible denominado SXT (Waldor y cols., 1996). Otras de las variaciones fundamentales identificadas en las cepas re-emergentes se relacionan con los niveles de producción de cápsula y la heterogeneidad en el número, organización y tipos de profagos CTX ϕ que portan (Basu y cols., 1998; Faruque y cols., 2003; Qadri y cols., 2005). Dicho profago es el portador del operón *ctxAB* codificante de la toxina colérica, principal factor de patogénesis de *V. cholerae* (Waldor y Mekalanos, 1996). Los factores que han determinado el surgimiento, la desaparición o la existencia mantenida de variantes particulares de *V. cholerae* no están claramente definidos; sin embargo, varios estudios epidemiológicos sugieren que el serogrupo O139 pudiera expandirse a otras áreas del mundo donde el cólera es endémico (Faruque y cols., 2003; Sarkar y cols., 2011). En Cuba, donde el cólera ha estado ausente por más de 130 años, en junio de

2012 se detectó un brote de cólera causado por vibriones del serogrupo O1. Aunque el brote de cólera en la provincia de Granma se cerró dos meses después, no se ha descartado la posible evolución a cólera endémico, especialmente tras el paso del huracán Sandy en noviembre de 2012.

Según informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), 12 países asiáticos han reportado el aislamiento de *V. cholerae* O139. En 2002 el 15% de los casos de cólera confirmados por laboratorio en los países de Asia correspondieron a este serogrupo (WHO, 2003). En los últimos cinco años, la información acerca de la ocurrencia de infección con cepas de este serogrupo está disponible sólo de China y Tailandia, aunque en general la verdadera extensión del problema no se conoce debido a la subnotificación de los casos de cólera por problemas con la vigilancia epidemiológica y también por temor a las consecuencias económicas y sociales (WHO, 2009; WHO, 2010a).

Los brotes de cólera causados por cepas del serogrupo emergente se caracterizan por una mayor incidencia en la población adulta, en contraste con la enfermedad causada por vibrios de serogrupo O1 en regiones de cólera endémico, donde la inmunidad adquirida por la exposición natural al agente bacteriano mantiene al adulto protegido contra la enfermedad (Qadri y cols., 1997). Diversos datos epidemiológicos y experimentales han demostrado la ausencia de protección cruzada entre los dos serogrupos epidémicos de *V. cholerae* e indican que una vacuna sero-específica es necesaria (Albert y cols., 1994; Qadri y cols., 2005; Ali y cols., 2011).

En reunión coordinada por la OMS y celebrada en El Cairo en 2005, así como en el documento de posición de la OMS sobre vacunas de cólera, expertos de este organismo recomendaron el uso de vacunas orales contra cólera en ciertas situaciones endémicas y epidémicas, como complemento a las estrategias existentes para el control de la enfermedad (seguridad del agua, sanidad y manejo de casos) y reafirmaron la necesidad de disponer de una vacuna contra *V. cholerae* O139 para ser utilizada en casos de emergencia epidémica de cólera, siempre que se evidencie la circulación local de cepas de este serotipo (WHO, 2006; WHO, 2010b).

La vacunación contra el cólera se aborda mediante dos enfoques fundamentales: las vacunas orales de vibriones inactivados y las de vibriones vivos atenuados. Las únicas vacunas comercialmente disponibles corresponden a dos variantes de células muertas. Estas vacunas son seguras, fáciles de administrar e inductoras de eventos adversos mínimos, pero precisan de dos o tres dosis, por lo que la logística del proceso de revacunación constituye una barrera significativa para su uso en situaciones epidémicas. Además, para mantener un nivel adecuado de protección son necesarias intervenciones de refuerzo cada dos o tres años (Chowdhury y cols., 2009), lo cual limita su uso ya que los costos fundamentales de las campañas de vacunación se asocian con la distribución de la vacuna, más que con su costo de fabricación.

Las vacunas de microorganismos vivos tienen la ventaja de que la administración de una única dosis podría proveer una protección inmunológica duradera, dada la similitud con el proceso de infección natural, lo que evitaría el régimen de múltiples dosis. Por esta razón resulta razonable trabajar en el desarrollo de una

vacuna de vibriones vivos de serogrupo O139 que sea eficaz tras administrar una sola dosis. Sin embargo, el reto de este tipo de vacunas es alcanzar un equilibrio entre la inmunogenicidad y la reactogenicidad.

El único candidato vacunal disponible contra el serogrupo O139 es un producto bivalente (O1 y O139), de células muertas que ha sido desarrollado en dos países diferentes, Vietnam (mORCVAX) y la India (Shanchol). Esta última variante resultó precalificada por la OMS en septiembre de 2011. Ambos productos han demostrado ser seguros e inmunogénicos tanto en adultos como en niños, aunque la respuesta anti-O139, en general, ha sido modesta y la protección que confiere contra este serogrupo no ha sido demostrada (Clemens y cols., 2011).

En este momento no existe ninguna vacuna viva licenciada que proteja contra la infección por *V. cholerae* O139; sólo existen dos variantes de cepas atenuadas que han sido evaluadas en pequeños estudios en voluntarios sanos. Estos prototipos son la cepa CVD112, desarrollada por el Centro para el Desarrollo de Vacunas (CVD) de los Estados Unidos y la cepa Bengal-15, obtenida por el Instituto de Investigaciones Médicas del Ejército de los Estados Unidos (Coster y cols., 1995; Tacket y cols., 1995). Estas cepas se evaluaron en dos estudios pilotos que incluyeron un reto experimental. Los retos se realizaron entre cuatro y cinco semanas después de la inoculación. Una dosis de 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) de ambas cepas garantizó más de un 80% de eficacia protectora, pero con esa dosis la cepa CVD112 resultó reactogénica (Coster y cols., 1995; Tacket y cols., 1995). La cepa Bengal-15, resultó segura e inmunogénica en dicho estudio (Coster y cols., 1995). Ningún otro ensayo clínico de estas variantes, en formulación simple o combinada, ha sido reportado aún, lo cual deja abierto el campo para el desarrollo de nuevas estrategias vacunales contra este serogrupo emergente. Por estas causas es razonable trabajar en el desarrollo de cepas atenuadas de *V. cholerae* serogrupo O139 que puedan evaluarse como ingrediente activo de vacunas de vibriones vivos atenuados.

El proyecto cubano de desarrollo de vacunas contra el cólera obtuvo cepas genéticamente modificadas de *V. cholerae* de serogrupo O1 y biotipo El Tor. Una de las cepas, el candidato vacunal 638 se obtuvo mediante supresión del profago CTX ϕ y el subsiguiente remplazo del gen *hapA*, que codifica la principal proteasa soluble de *V. cholerae* (HA/P), por un alelo inactivado por inserción del gen de la endoglucanasa A de *Clostridium thermocellum*. Fando (2004) demostró que dicho gen heterólogo es un marcador adecuado para los vibriones de serogrupo O1 que constituyan el ingrediente activo de una vacuna viva contra el cólera, por cuanto es estable, no es tóxico al vibrión y permite la distinción fácil e inequívoca de la bacteria marcada. Por ello es razonable introducir este marcador en cepas de serogrupo O139 y verificar su funcionalidad.

Un candidato vacunal que contiene a la cepa 638 como ingrediente activo ha sido evaluado en diversos estudios clínicos, en los que la administración oral de una dosis ha sido bien tolerada, inmunogénica y, en una pequeña cohorte de voluntarios, protectora contra el cólera producido por una cepa El Tor (Benítez y cols., 1999; García y cols., 2005; García y cols., 2011). En contraste con los resultados obtenidos con la cepa 638, su precursor *hapA*⁺ resultó altamente reactogénico durante su evaluación clínica (Fando, 2004).

Todos estos elementos avalan la contribución de HA/P a la reactogenicidad que caracteriza a los candidatos vacunales vivos. Es por ello que el locus que codifica esta proteasa constituye un sitio adecuado para insertar genes heterólogos que faciliten el marcaje de las cepas atenuadas y al mismo tiempo inactiven la producción de la enzima.

Las vacunas vivas atenuadas de cólera tienen la ventaja de estimular respuestas inmunológicas similares a la que provee la infección natural en la convalecencia (Ali y cols., 2011). Paralelamente, de existir transmisión entre contactos, estas vacunas contribuyen a la inmunidad de grupo o rebaño. Sin embargo, en el entorno regulatorio, la mayor preocupación es la posibilidad de reversión a la virulencia por readquisición de los genes de la toxina colérica, un evento que puede ocurrir por mecanismos de transferencia genética horizontal entre los que se incluyen la transducción por bacteriófagos como CTX ϕ , que infecta a *V. cholerae* a través de su receptor específico, el pelo co-regulado con la toxina (TCP) (Waldor y Mekalanos, 1996). Este pelo constituye además un factor esencial para la colonización del intestino humano por este microorganismo (Herrington y cols., 1988). Los genes de CTX ϕ también pueden adquirirse por un mecanismo eficiente e independiente de TCP consistente en la transducción especializada mediante un fago híbrido entre CTX ϕ y el vibriofago VGJ ϕ , otro fago filamentoso que utiliza como receptor a la fimbria hemaglutinina sensible a manosa (MSHA) (Campos y cols., 2003a). Por ello, la supresión del gen que codifica la subunidad principal de esta fimbria, *mshA*, se anticipa como una estrategia adecuada para minimizar el riesgo de reversión a la virulencia. La supresión de este gen no deberá afectar el desempeño vacunal, pues los vibriones no requieren la MSHA para colonizar el intestino, ni este ensamblado molecular participa en la inducción de una respuesta inmune protectora (Tacket y cols., 1998). Considerando la similitud genética del serogrupo O139 y las cepas de *V. cholerae* O1 El Tor, así como el adecuado desempeño en humanos demostrado por la cepa 638, este trabajo estuvo guiado por la siguiente

hipótesis:

“La modificación genética de una cepa toxigénica de *V. cholerae* de serogrupo O139 mediante supresión del profafo CTX ϕ , el remplazo del gen de la hemaglutinina proteasa por un alelo inactivo marcado con el gen *celA* y la delección del gen de la hemaglutinina sensible a manosa, origina cepas atenuadas que colonizan y son inmunogénicas en biomodelos relevantes”.

A partir de esta hipótesis se propuso como **objetivo general:**

Obtener cepas atoxigénicas de *V. cholerae* O139 portadoras del gen marcador de la endoglucanasa A insertado en el locus de la hemaglutinina proteasa, que sean mutantes de *mshA* y que induzcan respuesta inmune en biomodelos experimentales, caracterizada por la seroconversión de anticuerpos séricos con actividad bactericida.

Para cumplimentar este objetivo general se trazaron los siguientes **objetivos específicos:**

1. Seleccionar una cepa toxigénica de *V. cholerae* O139 útil como precursor para atenuación por modificación genética con fines vacunales, teniendo en cuenta su sensibilidad a los antibióticos cuya resistencia codifica el elemento SXT, su virulencia y colonización en el ratón lactante y la ausencia de elementos genéticos móviles relacionados con el bacteriófago VGJ ϕ .
2. Determinar la organización genética del profago CTX ϕ en la cepa seleccionada y diseñar una estrategia dirigida a suprimir este profago y los genes de la toxina colérica que codifica.
3. Obtener cepas de *V. cholerae* O139 genéticamente modificadas (CGM) de tercera generación mediante: 1) supresión del profago CTX ϕ en la cepa seleccionada; 2) remplazo del gen *hapA* por un alelo inactivado por la inserción del gen codificante de la endoglucanasa A y 3) supresión del gen *mshA* que codifica la subunidad principal de la fimbria MSHA, las cuales resulten atenuadas sin detrimento de su capacidad colonizante del intestino delgado de ratones Balb/c lactantes.
4. Evaluar la susceptibilidad de las CGM de tercera generación a la infección por los bacteriófagos VGJ ϕ y CTX ϕ .
5. Determinar si las CGM de tercera generación y sus parentales de primera y segunda generación inducen respuesta inmunológica cuando se inoculan por vía intraduodenal o intragástrica en los modelos de conejo o rata adultos, respectivamente.

La **novedad científica** de esta tesis consiste en que es la primera vez que se informa sobre la implementación en cepas de *V. cholerae* O139 de una estrategia secuencial de tres tipos de modificaciones genéticas, la cual permitió la obtención con fines vacunales de cepas desprovistas de los genes del profago CTX ϕ , marcadas con el gen de la endoglucanasa A de *C. thermocellum* y portadoras de mutaciones que impiden la producción de la hemaglutinina proteasa y la fimbria hemaglutinina sensible a manosa. Este trabajo va desde la selección y caracterización de la cepa toxigénica de partida, hasta la construcción y evaluación *in vitro* y en modelos animales de las cepas atenuadas derivadas de esta. Por otra parte, las cepas descritas en este trabajo son las primeras de *V. cholerae* O139 en las que la mutación *mshA* se emplea con el objetivo de mejorar la bioseguridad de una vacuna.

Los resultados aquí presentados tienen además **importancia teórica** ya que se describe por primera vez la existencia de diversidad alélica a nivel de precursores pre-CTX ϕ . En este sentido, se propone un nuevo modelo que explica una posible relación evolutiva entre CTX ϕ y sus precursores, según el cual a partir de un ancestro común pre-CTX ϕ tuvo lugar la diversificación en los tipos alélicos existentes y posteriormente, ocurre la adquisición de *ctxAB* por las diversas formas precursoras. En consecuencia, se propone la hipótesis de que los genes de la toxina colérica podrían constituir un elemento genético móvil, susceptible de ser adquirido por cierto mecanismo específico. A partir de la publicación de estos resultados, otros autores han encontrado evidencias que soportan este modelo evolutivo y que extienden su alcance a otros alelos que han sido descritos posteriormente.

Estos resultados tienen también **importancia práctica** ya que este trabajo permite disponer por primera vez en Cuba de cepas atenuadas pertenecientes al serogrupo O139 de *V. cholerae* que han resultado atenuadas e inmunogénicas en animales de dos especies diferentes: ratas y conejos, lo cual avala la continuidad de su desarrollo farmacéutico y la posterior evaluación preclínica y en estudios con voluntarios.

Los resultados de esta tesis han sido presentados en varios eventos nacionales e internacionales como los *Congresos Biotecnología Habana 2006 y 2011* (La Habana, Cuba), el *Congreso CNIC 2010* (La Habana, Cuba) y el *Congreso de la Sociedad Interamericana de Microscopía CIASEM 2011* (Mérida, México). Estos resultados forman parte de una patente concedida en Cuba y otros 49 países y han sido publicados en la Revista CENIC, en la revista Acta Microscópica y en las revistas *Research in Microbiology* (Factor de Impacto: 3,101) y *Microbes and Infection* (Factor de Impacto: 2,763). Los resultados de esta tesis han sido citados por otros autores en las publicaciones *Proceedings of National Academy Science* (107), *Infection, Genetics and Evolution* (2) y *Environmental Microbiology Reports* (10) del año 2010 y *Proceedings of National Academy Science* (11) del año 2011.

Por otra parte, este estudio ha contribuido a la formación de nuevos profesionales, lo cual se refleja en la defensa exitosa de dos tesis de diploma de estudiantes de la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana que incluyeron resultados parciales obtenidos en este trabajo.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Microorganismos, medios de cultivo, procedimientos de microbiología y biología molecular

Cepas bacterianas. Se emplearon las cepas de patógenas de *V. cholerae* O139 SG25 (India, 1992), AI1837 (India, 1993), CRC262 (India, 2000) y CRC266 (India, 2000). Las cepas de *V. cholerae* O1 569bB (patógena, biotipo Clásico), KHT52 (patógena, biotipo El Tor, mutante *tcpA*) y 638 (C7258 Δ CTX Φ *hapA::celA*). Se empleó además la cepa *Escherichia coli* S17-1 λ pir.

Animales de laboratorio. Los animales utilizados en este trabajo fueron ratones hembras adultas de la línea consanguínea Balb/c, con sus crías o neonatos de 3 a 5 días de nacidos (1,5 - 2 g), ratas Sprague Dawley adultas (126 - 152 g) y conejos Nueva Zelanda adultos (1,5 - 2 kg). Todos los diseños experimentales y protocolos de ensayos se realizaron respetando lo establecido por las regulaciones de seguridad biológica referidas al uso adecuado de animales de laboratorio.

Medios de cultivo. Se empleó medio rico LB (Sambrook y cols., 1989) para propagar *E. coli* y *V. cholerae*, agar TCBS (Oxoid) para la selección y el aislamiento selectivo de *V. cholerae*, caldo TSB (Booth y cols., 1983) para la expresión de la hemaglutinina proteasa (HA/Proteasa) y la producción de biopelículas, al igual que el medio syncase (Finkelstein y cols., 1966); caldo AKI para la expresión de la toxina del cólera y el pili co-regulado con la toxina (TCP) y agua de peptona alcalina (APA) como caldo de enriquecimiento para *V. cholerae*. Los medios de cultivo se complementaron, cuando fue necesario, con ampicilina (Amp), 100 μ g/ml; kanamicina (Kan), 50 μ g/ml y polimixina B (polB), 10 U/ml.

Cultivo en medio AKI para inducir la expresión de la toxina colérica y la proteína TcpA. Se empleó una variante corta del procedimiento de (Iwanaga y Yamamoto, 1985). Una colonia crecida en agar sangre se inoculó en 10 ml de caldo AKI contenido en tubos de cultivo. Se incubó estático a 37°C durante 4 h, se transfirió a un erlenmeyer estéril de 50 ml y se incubó con agitación orbital de 200 rpm a 37°C por otras 4 h.

Cultivo en TSB para expresión de la Hemaglutinina proteasa. Una alícuota de 10⁶ vibriones se inoculó en 50 ml de caldo TSB sin glucosa y se cultivó durante 20 h a 30°C en una zaranda orbital termostata a 100 rpm (Booth y cols., 1983).

Ensayo de motilidad. Cada cepa se inoculó por punción en LB sólido con agar al 0,3% (Gardel y Mekalanos, 1996) y se incubó a 37°C durante 6 h; al cabo de este tiempo, se midió el diámetro recorrido a través del agar.

Procedimientos de Biología Molecular. Las enzimas y reactivos para biología molecular se adquirieron de la firma Promega y se emplearon siguiendo las recomendaciones del fabricante. La purificación de plasmidios se efectuó empleando los sistemas *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* y *Wizard Plus Midipreps DNA Purification System* (Promega, EUA). El aislamiento del ADN total de *V. cholerae* se realizó según el procedimiento descrito por (Ausubel y cols., 1995). La separación electroforética del ADN se efectuó en geles de agarosa al 0,8% preparados en tampón Tris acetato-EDTA (Sambrook y cols., 1989). La purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se realizó utilizando el sistema “*GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit*” (Amershan, RU), según el protocolo indicado por el fabricante.

Transformación bacteriana. La transformación de *E. coli* y *V. cholerae* con plasmidios replicativos se realizó mediante electrotransformación, siguiendo los procedimientos descritos por (Dower y cols., 1988) y (Stoebner y Payne, 1988), respectivamente. Para transformar plasmidios suicidas en *V. cholerae* se utilizó el método de conjugación bacteriana, empleando como cepa donadora *E. coli* S17-1 λ pir transformada con el vector suicida y la cepa receptora de *V. cholerae* que se deseaba transformar.

Detección de secuencias por hibridación con sondas marcadas (*Southern blotting*). La técnica de hibridación *Southern blotting* se realizó esencialmente según Sambrook y cols., 1989. Las muestras de ADN (1 μ g de ADN total), digeridas con 5 U de las enzimas de restricción de interés, se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se transfirieron a una membrana de nylon Hybond-N siguiendo el procedimiento descrito por Chomczynski, 1992. Para el marcaje y detección de las sondas se utilizó el sistema no radiactivo “DIG-DNA labeling and detection kit” (Roche).

Secuenciación de ADN. Para obtener las secuencias de determinadas regiones de interés dentro del genoma de cepas de *V. cholerae* se diseñaron oligonucleótidos que permitieran la amplificación de esas zonas mediante una PCR. La secuenciación de los productos obtenidos se contrató a la compañía Macrogen (Korea del Sur) que la realizó empleando esos mismos oligonucleótidos como cebadores. Las secuencias obtenidas se ensamblaron con la ayuda del subprograma AlignX del programa Vector NTI suite 6000 (InforMax, Inc.) y se compararon con las depositadas en las bases de datos internacionales, utilizando el programa Blastn. Para generar el árbol filogenético se empleó el software MEGA.5 (Kumar y cols., 2004).

Detección de las proteínas MshA y TcpA mediante Western blotting. Las proteínas de las muestras a analizar se fraccionaron mediante SDS-PAGE en geles de 15% de acrilamida (Laemmli, 1970) y se transfirieron de los geles a las membranas de nitrocelulosa por el método descrito por Towbin y Gordon (1979). Como anticuerpos primarios se emplearon el AcM 1F12F10 anti-MshA (Falero y cols., 1998) o el AcM anti-TcpA 10E10E1 (Falero y cols., 2003), ambos a 5 μ g ml⁻¹. Las membranas se revelaron por adición de diaminobenzidina (0,12 mg mL⁻¹) y H₂O₂ (0,012%) en disolución de Tris 20mM; pH 7,6.

1.2 Procedimientos para la caracterización de cepas toxigénicas de *V. cholerae* O139

Susceptibilidad a antibióticos. La susceptibilidad a sulfametoxazol (23,75 μ g) -trimetoprima (1,25 μ g) y cloranfenicol (30 μ g) se realizó mediante la técnica de difusión por discos. La interpretación de los resultados se realizó en función de las normas del CLSI 2010 (del Inglés, *Clinical and Laboratory Standards Institute*). La susceptibilidad a estreptomycinina se evaluó por siembra en placas de LB suplementadas con estreptomycinina a 100 μ g ml⁻¹ de alícuotas de 5 μ l de las cepas de *V. cholerae* que contenían entre 10⁴ y 10⁵ UFC.

Ensayo de virulencia y colonización en ratones lactantes. Se empleó una modificación del procedimiento descrito por Richardson (1994). Luego de un ayuno de 3 horas, grupos de ratones lactantes Balb/c se asignaron aleatoriamente a los grupos experimentales y se inocularon por intubación gástrica con 50 μ l de una suspensión que contenía entre 10⁵ y 10⁶ UFC de las cepas de *V. cholerae* O139 SG25, AI1837, CRC262 y

CRC266. Al concluir dicho procedimiento, 25 μ l de diluciones seriadas 10^{-2} - 10^{-5} de cada suspensión utilizada se sembraron por duplicado en placas de LB que se incubaron 24 h a 37°C.

Para la determinación de virulencia, los animales (n=10) se mantuvieron durante 21 días y la sobrevivencia se registró diariamente. Para evaluar la colonización, cada grupo experimental (n = 5) se muestreó a las 24 h de inoculado para determinar el contenido intestinal de vibriones. Para ello, los cinco ratones se sacrificaron en atmósfera de cloroformo, luego de lavar sus intestinos delgados, estos se extrajeron y se les midió su longitud (L) y diámetro (d) y finalmente se homogenizaron, cada uno en 5 ml de PBS, empleando un disruptor de cuchillas Ultraturrax T25. El número de bacterias recuperado de cada intestino delgado de ratón se contó por siembra en placas. Los resultados se reportaron en UFC por cm^2 de área intestinal; calculada según: $A (\text{cm}^2) = L \times 2\pi \times (d/2)$.

Southern blotting para verificar la presencia de secuencias homólogas a VGJ ϕ . Se usó la sonda de hibridación VGJ ϕ -Dig que reconoce toda la secuencia del genoma de VGJ ϕ . El ADN total de las cepas AI1837, SG25, CRC262 y CRC266 se digirió con la enzima *EcoR* I. Los productos correspondientes a 1 μ g de ADN se fraccionaron en una electroforesis en gel de agarosa 0,8% y se procesaron mediante *Southern blotting*.

1.3 Procedimientos para caracterizar el ordenamiento genético del profago CTX ϕ en la cepa seleccionada

Polimorfismo de los fragmentos de restricción de CTX ϕ . Se determinó mediante hibridación de ácidos nucleicos de tipo *Southern blotting*. Se emplearon sondas de ADN que reconocen específicamente diferentes regiones del genoma de CTX ϕ : CTA-Dig (banda de 700 pb que contiene al gen *ctxA* del fago CTX ϕ); core-Dig (fragmento de 1485 pb que abarca región desde gen *gIII*^{CTX} hasta el gen *zot* del fago CTX ϕ) y RS1-Dig (fragmento de 1200 pb que contiene parte de *rstR*, la región *ig-2* y parte de *rstA* de los fagos CTX ϕ y RS1 ϕ). El ADN total de la cepa CRC266 se digirió de manera independiente con las endonucleasas *Sal* I, *Bgl* II, *Hind* III, *EcoR* I y *Ava* I. Se sometió además a digestiones dobles con las enzimas *Ava* I-*Bgl* II, *Ava* I-*Hind* III y *Ava* I-*EcoR* I. Alícuotas que contenían 1 μ g de ADN digerido se procesaron para detección del patrón de fragmentos de restricción en cada caso.

Caracterización de los elementos atoxigénicos de la estructura de CTX ϕ . Se realizó una amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el equipo de ciclos térmicos PTC150 (MJ Research, EUA). La reacción se llevó a cabo empleando 1,25 unidades de Pfu (Promega). En la mezcla se añadieron además: 100 ng de molde, 30 pmoles de los oligonucleótidos CNC-9982 (5'-GCTGTCGCAGTATAGAGGTG-3') y CNC-9983 (5'-AAGCACCACGACAGGCAAAG-3') y 10 nmoles de cada desoxinucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP). Las mezclas de reacción se sometieron a 30 ciclos de: 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 45 segundos de hibridación a una temperatura de apareamiento de 58°C y un tiempo de extensión de 3 minutos. Luego de estos ciclos, se realizó un paso final de extensión a 72°C por 5 minutos. El fragmento amplificado se secuenció.

1.4 Procedimientos de obtención de CGM de primera generación desprovistas de los genes de CTX ϕ

Procedimientos para construir el plasmidio suicida útil para deletar genes tóxicos del CTX ϕ . El fragmento de 690 pb portador del gen *ctxB* se escindió plasmidio pVT8B con la enzima *BamH* I, se purificó y se ligó al plasmidio pURS1 (Campos y cols., 1998) previamente digerido con *BamH* I y *Bgl* II. Un clon que contenía el vector pURS1 con un fragmento contenido del extremo 5' del elemento RS1 fusionado al gen *ctxB* en la orientación correcta se denominó pURSB. El fragmento *Xba* I-*Pvu* II que contenía la fusión se purificó a partir de gel y se ligó al vector suicida pCVD442 – digerido con *Sma*I-*Xba*I (Donnenberg y Kaper, 1991). La cepa de *E. coli* S17-1 λ pir se electrotransformó con el producto de la reacción. El derivado de pCVD442 que incorporó el inserto se denominó pCVRSB-10. La cepa de *E. coli* S17-1 λ pir transformada se conservó por congelación.

Procedimientos para obtener las CGM de primera generación. El plasmidio suicida pCVRSB-10 se movilizó por conjugación hacia *V. cholerae* CRC266. Se seleccionaron diez exconjugantes de *V. cholerae* resistentes a ampicilina (Amp^R) y se conservaron. De manera aleatoria, se seleccionaron dos de los exconjugantes Amp^R y se cultivaron en caldo LB, sin la presión selectiva del antibiótico. Cuatro clones procedentes de cada exconjugante se propagaron y se conservaron congelados.

El ADN total de cada uno de los ocho clones conservados se fragmentó con *Sac* I y se analizó por hibridación tipo *Southern blotting* se emplearon las sondas core-Dig y CTA-Dig. Se identificaron como cepas atenuadas de primera generación tres clones que no poseían secuencias homólogas a las sondas mencionadas, los cuales se nombraron TLP3, TLP11 y TLP13.

1.5 Procedimientos para la obtención de CGM de segunda generación portadoras del gen de la endoglucanasa A

Procedimientos para obtener el plasmidio suicida necesario para insertar gen *celA* en el locus de *hapA* de *V. cholerae*. Se insertó un adaptador *Bgl* II en el sitio *Sma* I del plasmidio suicida pCVD442 y se obtuvo el plasmidio pCVDB. El fragmento portador del del gen *celA* de *Cl. thermocellum*, insertado en el gen *hapA* de *V. cholerae* se escindió del plasmidio pIJHC1 (Robert y cols., 1996) con la enzima *Bgl* II y se clonó en el plasmidio suicida pCVDB, previamente digerido con *Bgl* II. Células electrocompetentes de la cepa de *E. coli* S17-1 λ pir se transformaron con el producto de la reacción y un derivado de pCVDB que incorporó el alelo recombinante se denominó pCVDBCelA.

Procedimiento para obtener las CGM de segunda generación. El vector suicida pCVDBCelA se movilizó por conjugación hacia la cepa modificada de primera generación TLP13. Se conservaron 3 exconjugantes que mostraron actividad celulolítica. Estos tres exconjugantes se cultivaron en caldo rico sin selección para propiciar la segregación del alelo natural y del vector suicida. El ADN total de tres clones sensibles a ampicilina derivados de cada exconjugante se digirió con enzima *Xho* I para detección de secuencias con las sondas *hapA*-Dig y *celA*-Dig, que reconocen específicamente las secuencias de los genes *hapA* y *celA*, respectivamente. Tres de los clones en los que ambas sondas cohibridaron con un fragmento *Xho* I de talla 3,2

kb mayor que la del fragmento correspondiente a la cepa TLP13 se seleccionaron como cepas genéticamente modificadas de segunda generación y se denominaron TLP131, TLP132 y TLP134.

1.6 Procedimientos para la obtención de las CGM de tercera generación por supresión del gen *mshA*

El remplazamiento del locus *mshA* de la cepa TLP132 por el locus mutado presente en el plasmidio suicida pCVΔ*mshA* (Martinez y cols., 2005) se realizó según se ha descrito previamente. Se seleccionaron diez clones derivados de dos exconjugantes. El ADN total de los clones seleccionados se digirió con la enzima *Bstx I* y se procesaron para detección de secuencias con la sonda *mshA*-Dig que reconoce el gen *mshA* de *V. cholerae*. Tres de los clones en los que la sonda hibridó con un único fragmento *Bstx I*, que indicó la pérdida de este sitio de corte en el fragmento en cuestión, se seleccionaron como cepas atenuadas de tercera generación y se nombraron TLP01, TLP03 y TLP05.

1.7 Procedimientos para verificar el fenotipo de las CGM de *V. cholerae* O139

Ensayo para evaluar la producción de la toxina colérica.

Los vibriones se cultivaron en medio AKI para inducir la expresión de la toxina colérica y esta se cuantificó en los sobrenadantes de los cultivos mediante un ensayo inmunoenzimático de enzima ligada dependiente del gangliósido GM1 (GM1-ELISA), según Holmgren (1973). Se empleó el anticuerpo monoclonal anti-CtxA (AcM1G10G5), a una concentración de 1 µg ml⁻¹ en PBS. La reacción de revelado se efectuó con H₂O₂ al 0,04% como sustrato y O-fenilendiamina (1mg ml⁻¹) como cromógeno.

Ensayos para evaluar la actividad endoglucanasa A de las colonias.

Se realizó según el procedimiento de Cornet y cols. (1983) sobre colonias cultivadas por 14 h en placas de LB agar. Las colonias se cubrieron con una capa fina (5 ml por placa) de gel de agar al 0,7% y carboximetilcelulosa al 0,3%, fundido en tampón fosfato citrato pH 6,3. Las placas se incubaron 3 h a 70°C y luego se tiñeron durante 5 minutos con una disolución acuosa de rojo congo al 1%. Se destiñeron usando NaCl 1M. La actividad endoglucanasa se detectó como un halo transparente alrededor de las colonias.

Procedimientos de microscopía electrónica para detección de la presencia de flagelo y cápsula.

Para la detección del flagelo, los vibriones se tiñeron negativamente con acetato de uranilo 1% (m/v) y se montaron en rejillas de cobre recubiertas con membrana soporte de Formvar. Para la detección de la cápsula se empleó la técnica de inclusión en resina epóxica, previo marcaje con rojo de rutenio (Fassel y Edmiston, 1999). Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 100S (Japón) y las imágenes se capturaron con una cámara digital MegaView G2 (Olympus, Muster, Alemania).

Procedimientos para evaluar la capacidad de producción de biopelículas.

Los ensayos de formación de biopelículas se llevaron a cabo en placas de poliestireno de 96 pocillos, estériles y de fondo plano. Se siguió una modificación del método descrito por Yildiz y cols. (2001) en la cual se utilizó safranina en la tinción. Para ello, las cepas a evaluar se cultivaron toda la noche a 37°C en caldo LB con agitación de 200 rpm. Se realizó una dilución 10⁻² de cada cepa en los diferentes medios a evaluar (Syncase y TSB, con y sin suplemento de glucosa al 0,4%). Las placas se incubaron a 30°C durante 24 h, 48 h y 72 h. Luego de tres lavados con tampón PBS, las biopelículas se tiñeron con safranina 0,1% y la solubilización del

colorante se logró empleando ácido acético al 33%. Las biopelículas se cuantificaron mediante la lectura de la $DO_{490\text{ nm}}$. El valor de corte se calculó sobre la base de tres desviaciones estándar por encima de la $DO_{490\text{ nm}}$ del medio sin inocular.

1.8 Evaluación de la capacidad de virulencia y colonización

En el estudio de virulencia se empleó una dosis de 10^8 UFC de la cepa patogénica CRC266 y sus derivados atoxigénicos. Para el estudio de la capacidad de colonización, grupos de 15 ratones Balb/c neonatos se inocularon intragástricamente con 5×10^5 UFC de las cepas genéticamente modificadas. Tanto la preparación del inóculo, como el procedimiento seguido posteriormente se realizaron según se describió antes, sólo que en este caso grupos de 5 ratones por cada cepa inoculada se sacrificaron al cabo de las 24, 72 y 120 h.

1.9 Procedimientos para evaluar la susceptibilidad de las CGM de tercera generación a la infección por los fagos VGJ ϕ y CTX ϕ

Los ensayos de infección se realizaron según el proceder descrito por Campos y cols. (2003a). Para la susceptibilidad a VGJ ϕ , la cepa donante (569B/ VGJKan- Φ), portadora de una versión del fago VGJ ϕ marcada con un gen que confiere resistencia a kanamicina (Kan), se creció hasta una DO_{600} entre 1 y 1,3 en LB. Se eliminaron las células de 1 ml de este cultivo por filtración (filtros Sartorius de 0,22 μm) y alícuotas de 100 μl se usaron como fuentes donadoras de fagos. Se sembró una alícuota de 50 μL del filtrado en una placa de LB sólido, la cual se incubó a 37°C toda la noche para comprobar la ausencia de células. Por otro lado, una alícuota de cada CGM de tercera generación y su parental TLP132 se cultivó en caldo LB por 6 h a 37°C y 200 rpm, hasta alcanzar una DO_{600} entre 1 y 2 UDO ($\sim 10^9$ células ml^{-1}). Una alícuota de 20 μl de cada cultivo se mezcló con 100 μl de sobrenadante libre de células de la cepa donante y la mezcla de infección se incubó 0,3 h a temperatura ambiente y se contaron las UFC resistentes a Kan. En paralelo, las CGM cultivadas para este ensayo se emplearon además para la detección de MshA por *Western blotting*.

En el ensayo de infección con CTX ϕ , las CGM se cultivaron en medio AKI para expresión de TcpA. La cepa donante (569B/CTXKan- ϕ) (Campos y cols., 2003a) se cultivó en LB-Kan y hasta alcanzar una $DO_{600\text{ nm}}$ igual a 2 UDO. El sobrenadante se filtró (0,2 μm) y una alícuota de 100 μl del filtrado se mezcló con 20 μl del cultivo de la cepa receptora. Se procedió como se explicó antes y 25 μl de las diluciones seriadas $10^0 - 10^{-3}$ se sembraron en placas de LB-kan. Cantidades equivalentes de los lisados celulares se procesaron para la realización del *Western blotting* para detectar la expresión de TcpA.

Grupos de 7 ratones por cepa se inocularon con una dosis de 10^5 UFC, según el procedimiento explicado antes y los ratones luego de inoculados se mantuvieron separados de las madres durante 20 h. De cada grupo se seleccionaron aleatoriamente 5 ratones a los que se les inoculó por vía intragástrica 50 μL de una suspensión del fago CTX-Kan ϕ con alrededor de 10^7 partículas. El resto de los ratones de cada grupo sirvieron de controles negativos de la infección. Se esperó tres horas y se determinó el contenido intestinal de vibriones.

1.10 Procedimientos para evaluar la respuesta inmunológica inducida en los modelos de conejo y rata adultos

Métodos para evaluar la inmunogenicidad de las CGM en el modelo de inoculación intraduodenal en conejos

Inmunización. El modelo de inoculación intraduodenal (García y cols., 1998) se empleó para inocular grupos de al menos 4 conejos Nueva Zelanda blancos con 1×10^9 UFC de las cepa CRC266 y sus derivados de primera (TLP13), segunda (TLP132) y tercera generación TLP01 y TLP05). La sangre de los animales se colectó por punción en la vena central de la oreja antes de la inoculación y luego de 7, 14, 21 y 28 días de inoculados.

Ensayo vibriocida. Los títulos vibriocidas de los sueros colectados, se determinaron mediante el ensayo vibriocida colorimétrico optimizado para el serogrupo O139 descrito por Vichi y cols. (2010). Se realizaron diluciones dobles seriadas con disolución salina de las muestras de suero a evaluar, comenzando por 1:10 hasta 1:10 240. El título se definió como el inverso de la mayor dilución del suero en la que se apreció inhibición del crecimiento bacteriano, reflejado por la invariabilidad del color en el medio de cultivo.

Métodos para evaluar las propiedades inmunogénicas en el modelo intragástrico de rata de las CGM

Inmunización. Ratas Sprague Dawley, machos con 40 días de edad se inocularon con 5×10^{10} UFC de las CGM TLP13, TLP132, TLP01 y TLP05, se empleó una cánula intragástrica. El grupo control se inoculó con tampón bicarbonato-ascorbato (Sifontes-Rodríguez y cols., 2009). La sangre de los animales se colectó usando la vía del plexo ocular y la extracción se realizó antes de la inoculación y luego de 3, 7, 9, 14, 21 y 28 días de inoculados. Los sueros se obtuvieron, se separaron en alícuotas y se almacenaron a -20°C hasta su uso en análisis posteriores

Ensayo vibriocida. Se siguió el proceder descrito para el estudio en conejos, solo que en este caso como fuente de complemento externo se empleó complemento comercial de gazapo suministrado por PEL-FREEZ.

1.11 Análisis estadísticos

Se empleó el paquete GraphPath Prisma versión 4 (2003) y Minitab 15 (2006) y el nivel de significación se fijó en 0,05. El método de comparación empleado se indica en cada caso en la sección de Resultados y Discusión.

2. RESULTADOS y DISCUSIÓN

2.1. Características de cepas toxigénicas de *V. cholerae* O139 y selección de una cepa precursora para modificación genética con fines vacunales

Para seleccionar la cepa toxigénica más adecuada como progenitor de partida para obtención de cepas atenuadas útiles como ingrediente activo de candidatos vacunales de cólera contra los vibriones del serogrupo O139, se analizaron cuatro aislamientos clínicos procedentes de la India. Dos cepas de vibriones emergentes de los años 1992 – 93 y otras dos de vibriones re-emergentes de años posteriores al 1996. Se evaluó el patrón de susceptibilidad a los antibióticos codificados por el elemento SXT, la virulencia de cada cepa para el ratón lactante, su capacidad de colonización y su estado de portadora o no del fago VGJ ϕ .

Las cepas emergentes SG25 y AI1837 fueron resistentes a los antibióticos cotrimoxazol, estreptomina y cloranfenicol. Estos marcadores de resistencia se encuentran codificados en el transposón conjugativo autotransmisible SXT (Waldor y cols., 1996). En cambio, las cepas re-emergentes CRC262 y CRC266 fueron sensibles. El patrón mostrado por CRC266 y CRC262 se corresponde con el de otras cepas descritas en diversos reportes que muestran que a partir de 1996, tras la re-emergencia epidemiológica de este serogrupo, se comenzaron a aislar en la India, China y Bangladesh diferentes clones que portaban una variante del elemento de inserción conjugativo SXT que carece de los genes que confieren resistencia a esos antibióticos, por lo que, contrario a los primeros aislamientos, los re-emergentes eran susceptibles a dichos agentes antimicrobianos (Faruque y cols., 1999; Hochhut y cols., 2001; Beaber y cols., 2002; Yu y cols., 2012). Esta característica resulta conveniente para un candidato vacunal vivo ya que una vez liberado al ambiente, no contribuiría a la diseminación en el entorno de los genes de resistencia a antibióticos.

Las capacidades de virulencia y colonización de cada cepa se evaluaron en el modelo del ratón lactante. Todas las cepas estudiadas, excepto SG25, produjeron efecto letal en al menos 80% de los animales inoculados con aproximadamente 5×10^5 UFC de cada una de ellas (Figura 1 A). La diferencia entre cepas no alcanzó significación estadística (Log-rank, $p > 0,05$). En cambio, respecto a la capacidad de colonización, el nivel de colonización de la cepa SG25 es inferior al del resto de las cepas: AI1837, CRC262 y CRC266 (Figura 1 B) (Prueba de Kruskal-Wallis; $p < 0,05$; Prueba de Dunn *a posteriori*; $p < 0,05$). No se encontraron diferencias significativas entre las cantidades de vibriones aislados de los grupos de animales inoculados con AI1837, CRC262 y CRC266, (Prueba de Dunn, *a posteriori*; $p > 0,05$), lo que indica que las capacidades de colonización de estas cepas son similares entre sí. Por otra parte, según resultados de *Southern blotting*, la cepa CRC266, contrario a CRC262, aislada en un período similar, no porta secuencias homólogas a VGJ ϕ , luego no está infectada con este fago, ni con otros fagos relacionados (Figura 1C).

Considerando estos resultados, la cepa CRC266 se seleccionó como punto de partida para realizar manipulaciones genéticas dirigidas a obtener mutantes atoxigénicos. La cepa seleccionada, no diseminará VGJ ϕ y otros de su tipo en el entorno, lo cual acarrearía un impacto ambiental negativo, dada la capacidad potencial de estos fagos, tras su interacción con cepas portadoras de CTX ϕ , para convertir cepas no-

toxigénicas de *V. cholerae* (vacunales o ambientales) en cepas virulentas, según sugieren (Campos y cols., 2003a), ya sea por la formación de un fago híbrido VGJ ϕ / CTX ϕ o por diseminación del genoma de CTX ϕ dentro de la cápsida de otros fagos filamentosos.

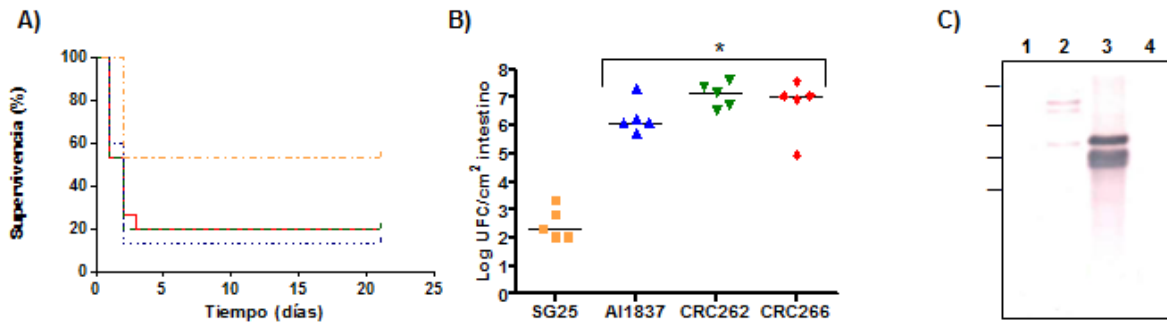


Figura 1. A) Supervivencia de ratones lactantes de la línea Balb/c (N=10) inoculados con aproximadamente 5×10^5 UFC de las cepas toxigénicas de *V. cholerae* O139 CRC266 (—), CRC262 (---), AI1837 (....) y SG25 (-.-). B) En el eje vertical se representan los valores del logaritmo decimal de la cantidad de vibriones recuperados de los intestinos de cinco ratones procesados luego de 24 horas de ser inoculados con entre 10^5 y 10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) de las cepas indicadas, así como su mediana. El asterisco indica diferencias significativas respecto a la cepa SG25 (Prueba de Dunn, $p < 0,05$). C) Análisis por *Southern blotting* de la presencia de secuencias homólogas al genoma del fago VGJ ϕ en cepas de *V. cholerae* O139. El ADN total de cada muestra digerido con *EcoRI* se aplicó en el orden siguiente: 1, AI1837; 2, SG25; 3, CRC262; 4, CRC266. A la izquierda se indica la posición de las bandas pertenecientes al ADN del fago λ digerido con *HindIII*, las cuales resultan más relevantes como patrón para este análisis, en orden descendente (kb): 23,1; 9,5; 6,5 y 4,3.

2.2 Estructura genética del profago CTX ϕ en CRC266

Organización general del profago CTX ϕ en CRC266

Se investigó la estructura y organización genética de CTX ϕ en CRC266 para definir posteriormente la estrategia a seguir para su atenuación. El número de copias de CTX ϕ y su distribución en esta cepa se determinó por el estudio del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), mediante análisis por hibridación de ácidos nucleicos de tipo *Southern blotting*, utilizando tres sondas específicas para diferentes regiones del profago CTX ϕ . Una de ellas reconoce a *ctxAB* (*ctxAB*-Dig), genes que codifican para CT; la otra, parte de la región que comprende el módulo de morfogénesis del fago CTX ϕ (conocida como *core*) que incluye los genes *gIII^{ctx}*, *ace* y *zot* (*core*-Dig) y por último, la sonda RS-Dig que reconoce parte de la región RS2 de CTX ϕ y RS1.

La enzima de restricción *SalI* no posee sitios de corte en CTX ϕ por lo que se empleó para estimar el número de sitios del cromosoma de la cepa CRC266 en los que existían copias de dicho profago. La aparición de una banda de más de 23 kb con las tres sondas empleadas indicó que independientemente del número y tipo de profagos presentes, todos están agrupados en un único sitio del genoma de esta cepa.

Para determinar el número y la organización de los profagos en este ordenamiento genético se empleó la enzima *AvaI*, ya que esta posee un único sitio de corte en el gen *cep* del profago CTX ϕ . Considerando la talla e intensidad de las bandas correspondientes a los fragmentos *AvaI* reveladas por las tres sondas, se puede deducir que al menos cinco copias en tándem de profagos (con y sin CT) conforman el arreglo

genético de CTX ϕ en la cepa CRC266 y que no existe ningún elemento RS1 ϕ ubicado entre ellas, ya que en ese caso deberían esperarse otras tallas en las bandas identificadas (Figura 2).

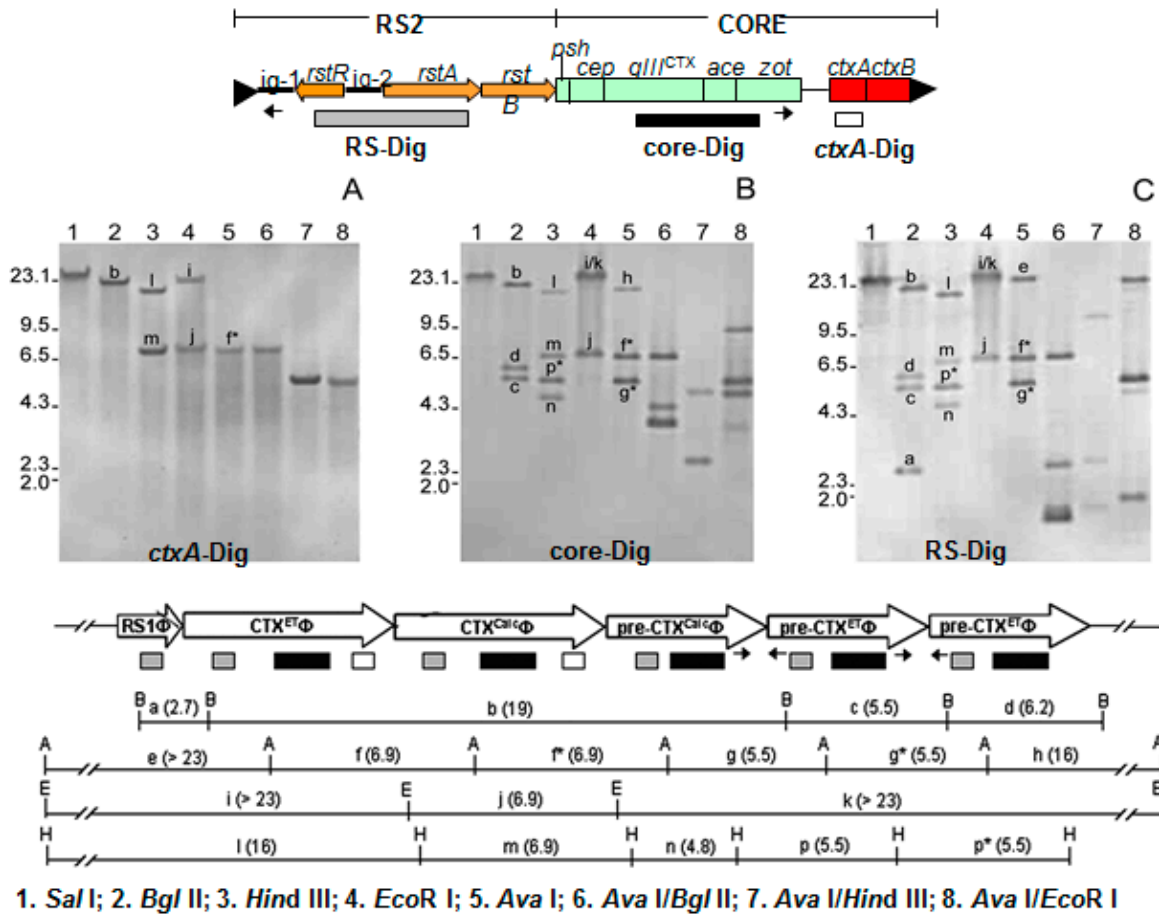


Figura 2. Análisis por *Southern blotting* de la estructura del arreglo de profagos CTX ϕ en la cepa toxigénica de *V. cholerae* O139 CRC266. El ADN total se digirió con las que se indican y las bandas se detectaron con las sondas (A) *ctxAB*-Dig, (B) *core*-Dig y (C) *RS*-Dig. (D) Esquema de la organización del profago CTX ϕ en CRC266, deducido a partir de los resultados del análisis por *Southern blotting*. Pre-CTX^{ET} ϕ y pre-CTX^{Calc} ϕ representan las formas precursoras de CTX ϕ El Tor y Calcuta, respectivamente. También se representa un mapa detallado del profago CTX ϕ que comprende las regiones RS2 y *core*. La localización de la región del genoma de CTX ϕ identificada por las sondas *RS*-, *core*- y *ctxAB*-Dig se representa como rectángulos en gris, negro y blanco, respectivamente. La distribución y el tamaño de los fragmentos de restricción (kb) obtenidos en las digestiones con *Bgl* II (B), *Ava* I (A), *EcoR* I (E) y *Hind* III (H), revelados durante el experimento de *Southern blotting* y empleados para construir el mapa de restricción representado en el diagrama, aparece debajo del mismo. Las letras en minúscula se corresponden con las bandas de los paneles A, B y C. Cuando una banda proviene de fragmentos comigrantes, derivados de copias en tándem, se empleó la misma letra con y sin asterisco, aunque sólo la letra marcada con asterisco se representa en los paneles A, B, y C.

La existencia de un único sitio de restricción *Bgl* II en la región RS de CTX^{ET} ϕ y de *Hind* III en los CTX^{Calc} ϕ se utilizó para explorar la distribución de estos tipos de profagos en el arreglo estudiado. El análisis global mostró la coexistencia de dos copias intactas de CTX^{ET} ϕ y CTX^{Calc} ϕ con tres copias de posibles precursoras de CTX ϕ (pre-CTX ϕ), que carecen de los genes de la toxina colérica, precedidos por una copia del profago RS1 ϕ . Estas formas precursoras poseen los patrones de restricción característicos de

los fagos tipo El Tor y Calcuta. Luego, por primera vez la diversidad de los alelos, descrita anteriormente para CTX ϕ , se registra entre los tipos precursores de este fago, localizados, además, dentro de una misma cepa epidémica (Figura 2).

En resumen, todas las evidencias aquí descritas indicaron que en el sitio *dif* del cromosoma 1 de la cepa CRC266 existen dos profagos CTX ϕ intactos (variantes El Tor y Calcuta) y al menos tres precursores de CTX ϕ , carentes de los genes *ctxAB*, dispuestos en tándem y flanqueados por el extremo 5' por un elemento RS1 ϕ , mientras que el extremo 3' está ocupado por al menos una copia pre-CTX ϕ :



Caracterización de las variantes atoxigénicas de CTX ϕ detectadas en CRC266

Resultó de interés confirmar si las formas atoxigénicas identificadas en CRC266 constituían precursores de CTX ϕ (pre-CTX ϕ). Para ello, el ADN cromosomal de esta cepa se usó como molde en una reacción de PCR en la cual se emplearon como cebadores un par de oligonucleótidos (CNC-9982 y CNC-9983) que hibridan en el gen *zot* (directo) y en la región *ig-1* (inverso), respectivamente. Se obtuvo una banda de 900 pb que se secuenció. .

El análisis de la secuencia de una de las formas precursoras presentes en CRC266 confirmó que, al igual que otras formas precursoras descritas por Boyd y cols., 2000 y Qu y cols., 2003, estas carecen de las regiones reguladora y codificadora del operón *ctxAB*. Por otro lado, mostró que el gen *zot* de esta forma atoxigénica de CTX ϕ posee una alta homología con la de otros pre-CTX ϕ ya descritos, a la vez que difería de la secuencia de *zot* del CTX ϕ de la cepa N16961 (*V. cholerae* O1), particularmente hacia su extremo 3'. Este nivel de identidad permite concluir que las variantes atoxigénicas de CTX ϕ presentes en CRC266 probablemente correspondan a formas precursoras de este fago que hayan sido adquiridas mediante un proceso de infección y lisogenización. Por otra parte, la región terminal de *zot* podría haber sido adquirida conjuntamente con las regiones reguladora y codificadora de los genes de *ctxAB* por parte de una forma precursora, dada su cercanía al sitio donde se inserta el operón *ctxAB* en los fagos toxigénicos.

La región *ig-1*, localizada cuesta arriba de *rstR*, también se considera un área de gran variabilidad entre fagos distintos (Kimsey y cols., 1998). El análisis de esta zona arrojó resultados novedosos, indicativos de una posible relación evolutiva de pre-CTX ϕ /CTX ϕ . Al construir un árbol filogenético derivado de la comparación de las secuencias correspondientes a regiones *ig-1* de diferentes pre-CTX ϕ s y CTX ϕ s, se pudo identificar que los diferentes pre-CTX ϕ estudiados se agrupaban diferencialmente con distintos alelos de CTX ϕ y no todos en una única rama, como debería esperarse de tener estos un origen clonal, y si la diversificación alélica hubiese ocurrido en un evento posterior a la adquisición de los genes *ctxAB*. Cada rama identificada, además, correspondió exactamente con los principales tipos de CTX ϕ descritos hasta el momento.

Este es un aspecto novedoso ya que por primera vez se extiende la diversidad alélica descrita en CTX ϕ a sus precursores. Las evidencias presentadas permiten proponer un nuevo modelo evolutivo, según el cual a partir de un ancestro común pre-CTX ϕ tuvo lugar la diversificación en los tipos alélicos existentes (El Tor, Calcuta y probablemente otros) y posteriormente, ocurre la adquisición de *ctxAB* por las diversas formas precursoras (Figura 3).

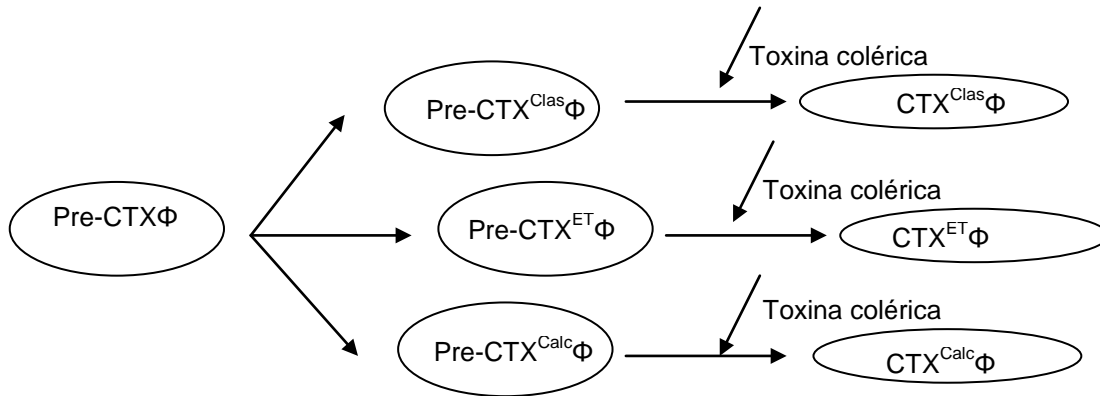


Figura 3. Modelo evolutivo de CTX ϕ : Una forma ancestral de pre-CTX ϕ divergió dando lugar a las diferentes variantes precursoras, las cuales adquirieron de manera independiente los genes *ctxAB* (codificadores de la toxina colérica), a partir de una fuente aún no identificada y probablemente mediante un mecanismo específico, el cual originó las variantes actuales de CTX ϕ .

Como muchos otros fagos portadores de genes de toxinas, el operón *ctxAB* se localiza adyacente al sitio *att* de CTX ϕ , lo cual pudiera conllevar a que escisiones imprecisas provocaran la formación de nuevos fagos poseedores de secuencias ubicadas adyacentes al sitio de inserción en el cromosoma bacteriano. Sin embargo, los resultados presentados en esta tesis sugieren, además, que la adquisición de *ctxAB* por diferentes formas precursoras pre-CTX ϕ ha ocurrido más de una vez durante la evolución de los fagos, en contraste con la idea propuesta por Boyd y cols. (2000) de que una forma precursora común adquirió el operón *ctxAB* y, posteriormente, divergió para dar lugar a las variantes CTX ϕ actuales. Por lo tanto, de acuerdo a la teoría aquí presentada, la adquisición de los genes tóxicos pudiera ser un fenómeno no tan accidental como se había propuesto, sino que *ctxAB* podría ser un elemento genético móvil, susceptible de ser adquirido por cierto mecanismo específico, aún por identificar (Figura 3).

Resultados recientes reportados por Mantri y cols. (2010) corroboran el modelo propuesto en este trabajo de tesis, al confirmar la existencia de al menos cuatro variantes alélicas a nivel de pre-CTX ϕ (Clásica, El Tor, Calcuta y ambiental) cuando estudiaron más de 100 cepas de *V. cholerae*. Esta conclusión confirma la hipótesis esbozada en este trabajo con relación a la diversidad alélica a nivel de precursores y a su relación evolutiva con CTX ϕ , en lo que se refiere a que la diversificación de pre-CTX ϕ en los diversos alelos de *rstR* ocurrió antes de la adquisición de *ctxAB*.

2.3 Obtención de cepas genéticamente modificadas de *V. cholerae* de primera generación

El método de mutagénesis dirigida empleando vectores suicidas (Ketley y cols., 1993; Michalski y cols., 1993) permite lograr la atenuación por eliminación de grandes fragmentos de ADN, lo cual descarta la posibilidad de reversión por variaciones genéticas puntuales. La existencia de secuencias repetidas y flanqueantes del tipo RS y RS1 ϕ ha facilitado en muchos casos la remoción completa del profago CTX ϕ (Fando, 2004). Sin embargo, a diferencia de muchas cepas de biotipo El Tor, las cepas de *V. cholerae* O139, por lo general, carecen de secuencias del profago satélite RS1 ϕ ubicadas hacia el extremo 3' de las copias de CTX ϕ . Ese es el caso también de CRC266 (Figura 2), lo que hace más complejo el proceso de eliminación de los genes tóxicos en estas cepas.

Con el objetivo de deletar los genes de CTX ϕ del genoma de la cepa CRC266, el plasmidio suicida pCVRSB-10 se movilizó hacia esta cepa de *V. cholerae* mediante conjugación con la cepa *E. coli* S17-1 λ pir transformada con pCVRSB-10. La imposibilidad de replicación de los plasmidios derivados de pCVD442 en *V. cholerae* determina que la selección de clones resistentes a Amp y polB, luego del proceso conjugativo, esté determinada por la inserción del plasmidio suicida en el genoma de la cepa receptora. Este hecho ocurre fundamentalmente mediante procesos de recombinación entre secuencias génicas de *V. cholerae* presentes en el plasmidio y sus homólogas del cromosoma bacteriano. En CRC266 residen varias copias de profagos CTX ϕ y precursores de este fago que portan regiones homólogas con aquellas contenidas en pCVRSB-10, por lo que la inserción del plasmidio podría tener lugar en diferentes lugares del arreglo de profagos.

Luego de un segundo evento de recombinación favorecido por la ausencia de presión selectiva, se obtuvieron mutantes de *V. cholerae* sensibles a ampicilina y capaces de crecer en presencia de sacarosa. Estos clones corresponden a dobles recombinantes que perdieron el plasmidio anteriormente integrado. El análisis del mediante hibridación tipo *Southern blotting* con las sondas core- y CTA-Dig, permitió identificar tres clones caracterizados por la ausencia tanto del gen de *ctxA*, como del resto de los genes incluidos en el módulo de morfogénesis, luego están desprovistas del profago CTX ϕ que se denominaron TLP3, TLP11 y TLP13 (Figura 4 A).

2.4 Obtención de cepas genéticamente modificadas de *V. cholerae* de segunda generación

Para facilitar los estudios de campo es conveniente utilizar cepas vacunales que posean algún rasgo que las distinga fácilmente de otras circulantes en el ambiente. Fando (2004) demostró que el gen *celA* de *Cl. thermocellum*, que codifica una β (1-4) glucanohidrolasa termofílica denominada endoglucanasa A, es un marcador adecuado para estos fines, por cuanto se trasmite de forma estable y no es tóxico. La estrategia utilizada para insertar el gen heterólogo *celA* en el genoma de la cepa TLP13 fue el remplazamiento alélico del gen natural de la hemaglutinina proteasa (*hapA*) por el alelo recombinante interrumpido por el gen *celA* contenido en el plasmidio suicida pCVDBCelA.

El gen *hapA* de TLP13 mapeó en un fragmento *Xho* I de 6,5 kb (Figura 4 B). En las carrileras correspondientes a los exconjugantes obtenidos luego del primer evento de recombinación se identificó el aumento en ~13 kb del tamaño del fragmento *Xho* I que contiene a *hapA* indicativo de la inserción del plasmidio en el locus de este gen. Los clones TLP131, TLP132 y TLP134 se seleccionaron sobre la base de que su ADN presentó un fragmento de ~9,5 kb que se identificó tanto con la sonda *hapA*-Dig, como con la sonda *celA*-Dig. Estas cepas constituyen mutantes de segunda generación, cuyo genotipo común es $\Delta CTX\phi/hap::celA$, por cuanto están desprovistas del profago CTX ϕ (como TLP13, su progenitor de primera generación) y además poseen una copia del gen *celA* insertada en el locus *hapA* de su genoma.

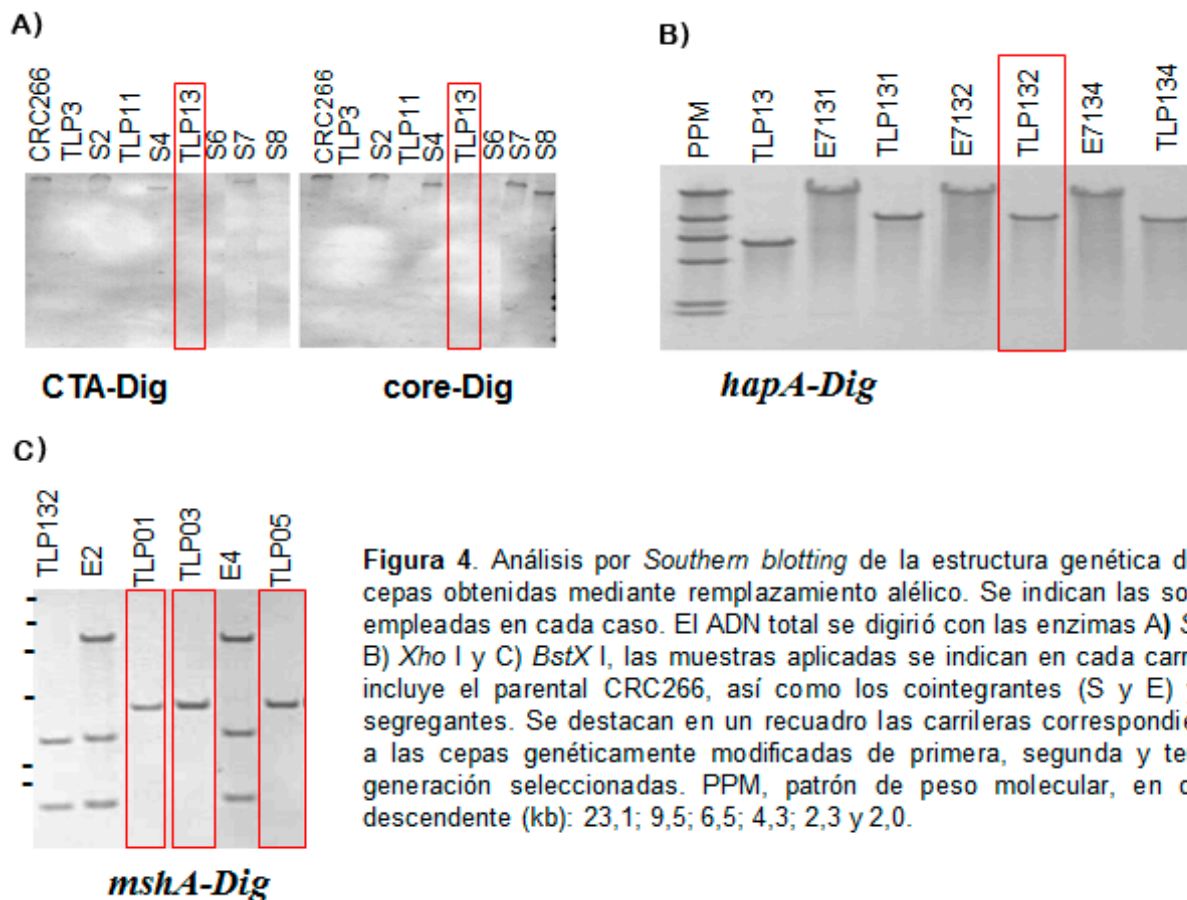


Figura 4. Análisis por *Southern blotting* de la estructura genética de las cepas obtenidas mediante remplazamiento alélico. Se indican las sondas empleadas en cada caso. El ADN total se digirió con las enzimas A) *Sac* I, B) *Xho* I y C) *BstX* I, las muestras aplicadas se indican en cada carril, se incluye el parental CRC266, así como los cointegrantes (S y E) y los segregantes. Se destacan en un recuadro las carrileras correspondientes a las cepas genéticamente modificadas de primera, segunda y tercera generación seleccionadas. PPM, patrón de peso molecular, en orden descendente (kb): 23,1; 9,5; 6,5; 4,3; 2,3 y 2,0.

2.5 Obtención de cepas genéticamente modificadas de *V. cholerae* de tercera generación

El aislamiento de los fagos como VGJ ϕ , con capacidad de transmitir eficientemente los genes de CT, aumenta el interés de buscar soluciones que reduzcan la posibilidad de readquirir los genes tóxicos en las cepas vivas, con el fin de mejorar las propiedades de bioseguridad del candidato vacunal en cuestión. La transmisión del operón *ctxAB* por VGJ ϕ se produce a través de la formación de un fago híbrido funcional denominado HybP ϕ que, al igual que VGJ ϕ , infecta a *V. cholerae* a través de la fimbria MSHA, la cual se encuentra ampliamente distribuida en la mayoría de las cepas de *V. cholerae* toxigénicas circulantes en el ambiente (Campos y cols., 2003b). Teniendo en cuenta estos precedentes, el último paso de la estrategia estuvo dirigido a obtener cepas de tercera generación, incapaces de producir la fimbria MSHA,

caracterizadas por exhibir total protección contra la incorporación y posterior diseminación de los genes que codifican CT mediante fagos híbridos del tipo de HybP ϕ .

La construcción de mutantes $\Delta mshA$ se realizó mediante el remplazamiento del gen *mshA* del cromosoma de la cepa de *V. cholerae* TLP132, por un alelo que posee deletado el 82% del gen presente en el plasmidio pCV $\Delta mshA$. El hecho de que la mutación introducida sea una delección casi total del gen asegura la irreversibilidad del evento y por tanto, la no expresión de esta fimbria. El proceso de construcción de los mutantes se siguió mediante la digestión enzimática del ADN total de las cepas en estudio con la endonucleasa *BstX* I y la técnica de *Southern blotting*, empleando como sonda el propio gen *mshA* mutado. Se identificaron varios clones que contenían la delección del gen *mshA*, identificados por la aparición de una sola banda, de 4,0 kb, (Figura 4 C) detectada por la sonda *mshA*-Dig, lo cual se corresponde con el hecho de que la secuencia del gen *mshA* mutado carece del sitio de corte *BstX* I que caracteriza al gen *mshA* salvaje. Tres de estos clones se seleccionaron y se denominaron TLP01, TLP03 y TLP05.

2.6 Virulencia y colonización intestinal en ratones Balb/c de las cepas genéticamente modificadas

Todas las CGM se estudiaron en ratones Balb/c lactantes para medir el grado de atenuación y la capacidad de colonización, antes de ser evaluadas en humanos. Ninguna de ellas provocó efecto letal por vía orogástrica en los ratones. La capacidad de virulencia de estas cepas se evaluó empleando una dosis de 10^8 UFC de cada una de estas cepas, al igual que de la cepa parental CRC266. Todos los animales inoculados con las CGM sobrevivieron, mientras que CRC266 produjo efecto letal en el 86% de los animales que recibieron esta cepa (Figura 5). Este es un resultado esperado, por cuanto este efecto es producido, esencialmente, por la toxina colérica, ya que en esta especie el resto de las toxinas producidas por *V. cholerae* no tributan a la letalidad. El impacto de las mutaciones sucesivas queda opacado por el de aquella inicial que eliminó los genes *ctxAB*. De acuerdo con estos resultados las modificaciones genéticas realizadas en este estudio garantizan un nivel bajo de virulencia en los ratones lactantes, que no produce efecto letal en este modelo. Por lo que se puede concluir que los clones TLP01, TLP03 y TLP05 están atenuados respecto a su progenitor CRC266 (Log Rank, $p < 0,0001$).

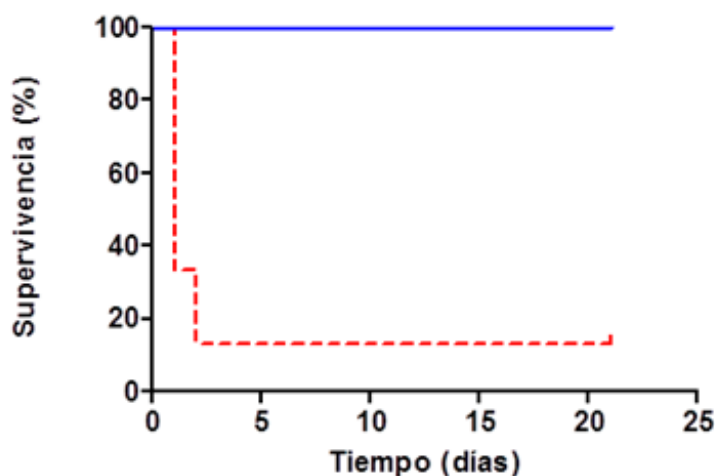


Figura 5. Supervivencia de ratones Balb/c inoculados con cepas de *V. cholerae* O139. En el gráfico se indica con línea discontinua (rojo) el efecto sobre los animales de la inoculación con 10^8 UFC de la cepa toxigénica CRC266. La línea continua en azul representa el comportamiento de los ratones inoculados con igual dosis del clon TLP13. Los ratones inoculados con las cepas mutantes TLP132, TLP01, TLP03 y TLP05 tuvieron un comportamiento similar al grupo de TLP13, se mantuvieron vivos durante todo el experimento.

Se evaluó además la capacidad colonizadora de los mutantes obtenidos con relación a su parental inmediato (Figura 6). El análisis en el modelo de colonización del ratón infante indicó que las cepas TLP13, TLP132, TLP01, TLP03 y TLP05 colonizaron el 100% de los ratones. Sin embargo, los niveles de colonización alcanzados por ellas a las 24 h fueron inferiores a los de la cepa CRC266 (Prueba Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). La capacidad colonizadora de los mutantes $\Delta mshA$ seleccionados no difirió significativamente del comportamiento de sus parentales TLP13 y TLP132 (Prueba Kruskal Wallis, $p > 0,05$). Estos resultados confirmaron que la afectación en la producción de MSHA no origina defectos de colonización evidenciados en este modelo.

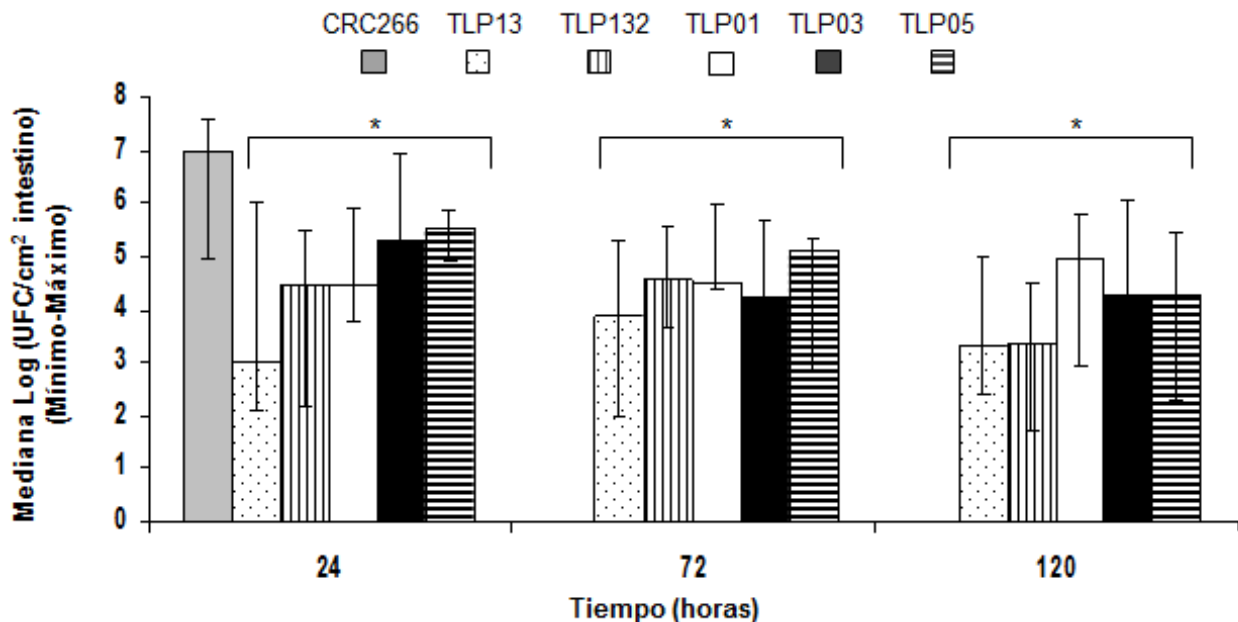


Figura 6. En el eje vertical se representan los valores del logaritmo decimal de la cantidad de vibriones recuperados a tres tiempos muestrales de los intestinos de cinco ratones luego de ser inoculados con entre 10^5 y 10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) de las cepas indicadas. En el caso de la cepa toxigénica, solo se realiza el análisis a las 24 h. El asterisco indica diferencias significativas respecto a la cepa parental toxigénica CRC266 (Prueba de Dunn, $p < 0,05$). No se detectaron diferencias significativas al comparar los resultados de todas las cepas atenuadas a los diferentes tiempos (Prueba de Dunn, $p > 0,05$).

2.6 Fenotipo de cepas genéticamente modificadas de *V. cholerae* O139

Las cepas de primera (TLP13), segunda (TLP132) y tercera generación (TLP01, TLP03 y TLP05) resultaron indistinguibles mediante pruebas serológicas, apariencia morfológica y velocidad de crecimiento. Estos resultados indican que las modificaciones genéticas introducidas no afectan el crecimiento y la morfología de las cepas mutantes.

La cepa toxigénica CRC266 produjo un nivel promedio de $18,16 \pm 2,35$ $\mu\text{g/mL}$ de toxina colérica en caldo AKI. En cambio, los mutantes de primera generación TLP3, TLP11 y TLP13 no produjeron niveles detectables de esta holotoxina por el método del GM_1 -ELISA (límite de detección $1,95$ $\mu\text{g/mL}$). Este

resultado está en correspondencia con la ausencia de secuencias codificadoras de CT en el cromosoma de estas cepas.

Todos los clones de segunda generación, así como las CGM de tercera generación, marcados con el gen heterólogo, mostraron el patrón positivo que se muestra en la Figura 7, lo que confirma la expresión del gen *celA*. La actividad endoglucanasa que confiere el gen insertado no es propia de *V. cholerae* y constituye, por tanto, un buen marcador para diferenciar estas cepas vacunales de otras cepas de *V. cholerae* de una manera rápida y sencilla.

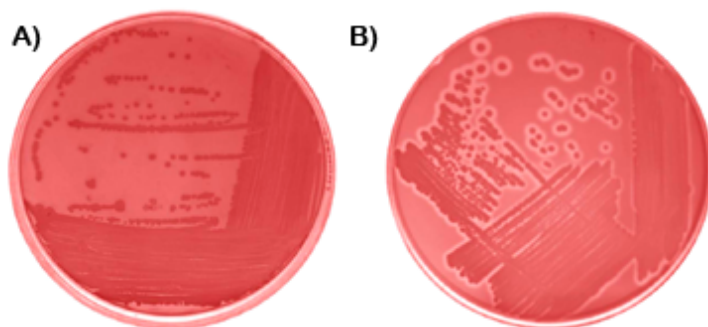


Figura 7. Apariencia de las colonias de *V. cholerae* luego del ensayo de la actividad endoglucanasa. A, fenotipo del parental TLP133; y B, fenotipo observado en cada uno de los mutantes de segunda y tercera generación: TLP131, TLP132, TLP134, TLP01, TLP03 y TLP05.

El estudio de la motilidad de estas cepas se realizó por punción en agar suave (0,3%). Los clones TLP01 y TLP03 conservan las características móviles del parental TLP132. A diferencia del resto de los mutantes isogénicos, el clon TLP05 resultó ser no mótil. Sin embargo, ese fenotipo no está relacionado con la ausencia de flagelo, el cual fue visible en todas las cepas al examinarlas en el microscopio electrónico, mediante tinción negativa con acetato de uranilo. Al igual que CRC266, todas presentan cápsula.

La capacidad para producir biopelículas de la cepa CRC266 y los derivados atoxigénicos desarrollados en este trabajo, en condiciones con status nutricionales diferentes, se estudió durante 72 h. Lo más relevante de este análisis lo constituye el hecho de que TLP01 y TLP05 no formaron biopelículas *in vitro*, cuando crecieron en medio rico, en condiciones en las que sus parentales sí las produjeron. Watnick y cols. (2001) han demostrado que la motilidad, particularmente el movimiento flagelo, pero no MSHA, influyen en la producción de ese tipo de biopelículas en *V. cholerae* O139. Por lo cual el fenotipo no mótil de TLP05 podría explicar su incapacidad para formar las biopelículas, en las condiciones ensayadas en esta tesis. El comportamiento de TLP01, sin embargo, debe estar relacionado con alguna mutación espontánea aún no identificada.

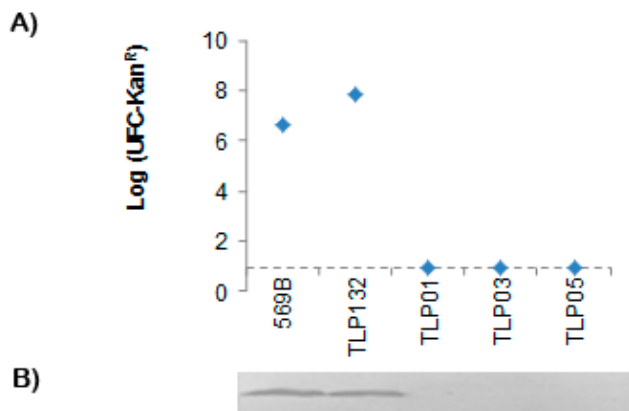
La fimbria MSHA, por otra parte, ha sido implicada en la adherencia y formación de biopelículas sobre las superficies quitinosas de los exoesqueletos de organismos planctónicos, por lo que pudiera ser esencial para la sobrevivencia de los vibriones en sus hábitats naturales (Chiavelli y cols., 2001). Luego, una vez en el medio ambiente, las cepas atenuadas TLP01 y TLP05, podrían verse limitadas a formar biopelículas debido a la incapacidad para producir MSHA. Será necesario realizar otros experimentos dirigidos a confirmar el desempeño de estos mutantes en esas condiciones. Los resultados obtenidos, así como los estudios precedentes, permiten inferir que la incapacidad para formar estas estructuras debe ser favorable para el

desempeño como vacunas de las cepas TLP01 y TLP05.

2.7 Susceptibilidad a la infección por los bacteriófagos VGJ ϕ y CTX ϕ

Expresión de MshA e infección con VGJ ϕ

Como consecuencia de la delección del gen *mshA*, las cepas TLP01 y TLP05 no producen la pilina de 17kDa, MshA, según corroboraron los resultados del *Western blotting* (Figura 8). Estas cepas, a su vez, fueron refractarias a la infección con el fago VGJ ϕ (Figura 8), lo cual reduce al mínimo la posibilidad de infección por fagos híbridos tipo HybP ϕ . Por otra parte, Faruque y cols. (2005) y Campos y cols. (2010) han descrito otros fagos, KSF-1 ϕ y VEJ ϕ , respectivamente, que pudieran empaquetar el genoma de CTX ϕ y luego transmitirlo a cepas que no expresen TCP, el receptor de CTX ϕ . Tanto KSF-1 ϕ como VEJ ϕ , así como VSK, VSKK y fs2, que también emplean la fimbria MSHA como receptor, son capaces de integrarse en el sitio *dif* de *V. cholerae*, el mismo sitio que emplean VGJ ϕ y CTX ϕ (Das y cols., 2011). Luego, el mecanismo antes descrito pudiera ser más general y, a través de la fimbria MSHA, muchos otros fagos pudieran transmitir los genes *ctxAB* y participar en la continua evolución de las cepas toxigénicas de *V. cholerae*. Las cepas TLP01 y TLP05, al no producir MSHA, presentan mejores propiedades de seguridad ambiental que su parental TLP132, ya que tienen menor riesgo de readquirir CTX ϕ mediante mecanismos como los aquí descritos.



Por otra parte, Campos y cols. (2003a) demostraron que a diferencia de VGJ ϕ y CTX ϕ , que se integran preferentemente en el sitio *difI*, HybP ϕ es capaz de integrarse en un sitio diferente del cromosoma de *V. cholerae* y, además, es capaz de sortear la inmunidad de fagos, ya que la maquinaria replicativa de VGJ ϕ es la que conduce la replicación del fago híbrido. Esto implica que estrategias como la eliminación del sitio de integración de CTX ϕ (*attRS*) o la presencia de una copia de *rstR* en las cepas vacunales (Kimsey y Waldor, 1998), serían inefectivas para evitar la reversión estable a la virulencia por parte de las cepas vacunales atenuadas que posean estas características.

Infección con CTX ϕ y expresión de TcpA

Dada la ausencia de secuencias de CTX ϕ y RS1 ϕ en las cepas TLP01 y TLP05, estas pueden ser susceptibles a la infección con CTX ϕ . Sin embargo, al realizar un experimento de infección se encontró que las cepas atoxigénicas obtenidas a partir de CRC266 se infectan *in vitro* por el fago CTX ϕ significativamente menos que el control positivo empleado. Ese comportamiento, sin embargo, no se debe a dificultades con la expresión del TcpA (subunidad principal de la fimbria TCP, receptora del fago CTX ya que todas las cepas analizadas excepto KHT52, el control negativo del experimento, expresaron TcpA en las condiciones de cultivo empleadas (Figura 9). La resistencia a la infección con este fago pudiera reflejar algún impedimento en el ensamblaje de la fimbria TCP, tal vez por una reducción de la cantidad de ToxR producida en esas condiciones de ensayo.

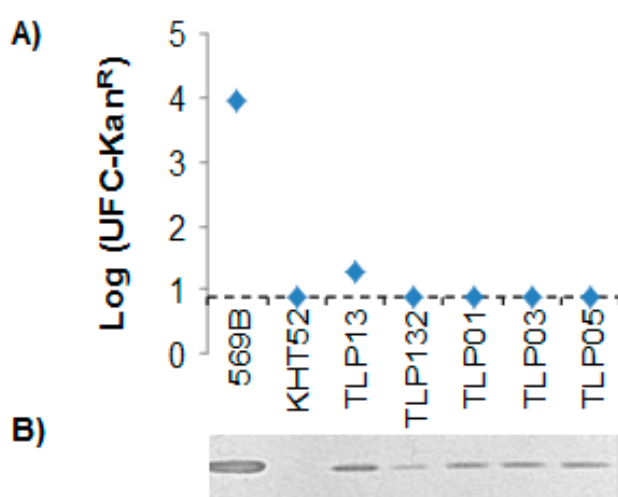


Figura 9. Susceptibilidad al fago CTX-Kan Φ (A) y análisis por *Western blotting* de la expresión de la subunidad principal del receptor TCP (B) en las cepas 569b (control positivo de TcpA), KHT52 (control negativo de TcpA), TLP13, TLP132, TLP01, TLP03 y TLP05. La susceptibilidad al fago se expresa en función del promedio del logaritmo de las unidades formadoras de colonias (UFC) resistentes a kanamicina producidas por la infección con CTX-Kan Φ . Las barras de error indican las desviaciones estándares de dos experimentos independientes. Línea discontinua, límite de detección.

Sin embargo, tanto TLP132 como los mutantes $\Delta mshA$ son capaces de infectarse con CTX ϕ en el intestino del ratón lactante, y colonizaron a niveles similares a TLP13. Las posibilidades de readquisición de los genes de CT en las cepas TLP01 y TLP05 quedarían limitadas, fundamentalmente, al ambiente intestinal humano, y dependería de la co-infección del individuo con la cepa vacunal y una cepa toxigénica, dada la restricción a condiciones específicas de crecimiento a que está sujeta la expresión de TCP.

Las cepas TLP01 y TLP05 se seleccionaron para estudiar su desempeño como inmunógenos en dos especies de mamíferos y definir el mejor candidato para pasar a la fase de desarrollo farmacéutico y ser evaluado en ensayos con voluntarios sanos.

2.8 Respuesta inmunológica en conejos o ratas de cepas atenuadas de *V. cholerae* O139

Inmunogenicidad en conejos

Para la evaluación de las potencialidades inmunológicas de las cepas desarrolladas en este trabajo se determinó la respuesta de anticuerpos inhibidores del crecimiento bacteriano (vibriocidas) que se inducen por la inoculación intraduodenal de una dosis de 10^9 UFC en conejos adultos (García y cols., 1998). Se incluyeron en el estudio la cepa salvaje CRC266 y sus derivados atoxigénicos de primera (TLP13), segunda (TLP132) y tercera (TLP01 y TLP05) generación.

Durante la evaluación de la respuesta de anticuerpos vibriocidas en el modelo de conejo, a partir de los siete días, momento en el que se realiza la primera medición, se encontró seroconversión en todos los conejos infectados (Tabla 1) y desde ese momento hasta el final del experimento, los títulos alcanzados fueron superiores a los de los respectivos sueros pre-inóculo. En todas las cepas, los títulos más altos se detectaron entre los 14 y 21 días post-inoculación y en esos momentos, estos alcanzaron niveles entre 640 y 5 120. No se encontraron diferencias significativas en la respuesta bactericida que se indujo por las diferentes cepas estudiadas (MANOVA de clasificación simple, Criterio de Wilks: $p=0,751$; Prueba de Lawley-Hotelling: $p=0,827$ y Prueba de Pillai: $p=0,685$). Este análisis indica que las delecciones e inserciones genéticas que tuvieron lugar para la construcción final de las cepas con fines vacunales de *V. cholerae* O139, TLP01 y TLP05, así como las mutaciones espontáneas que hayan podido ocurrir durante este proceso, no afectaron su capacidad para producir una respuesta inmune adecuada, semejante a la de la cepa salvaje, en este modelo animal.

Tabla 1. Respuesta de anticuerpos vibriocidas en conejos inoculados por vía intraduodenal con una simple dosis de 10^9 UFC de cepas de *V. cholerae* O139.

| Cepas | Sero-conversión* n/total | GMT a diferentes tiempos (Mínimo-Máximo) | | | | |
|---------------|-----------------------------|---|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | 0 d | 7 d | 14 d | 21 d | 28 d |
| CRC266 | 4/4 | 8 (5-10) | 640 (80-5120) | 2559 (1280-5120) | 2153 (1280-5120) | 1811 (1280-2560) |
| TLP13 | 4/4 | 10 | 760 (160-1280) | 1076 (640-1280) | 760 (160-2560) | 1076 (320-2560) |
| TLP132 | 3/3 | 10 | 807 (640-1280) | 1279 (640-2560) | 807 (640-1280) | 807 (320-2560) |
| TLP01 | 4/4 | 6 (5-10) | 190 (80-640) | 760 (640-1280) | 380 (160-640) | 640 (320-1280) |
| TLP05 | 3/3 | 10 (5-20) | 320 (160-1280) | 2032 (1280-5120) | 1613 (640-5120) | 2032 (1280-5120) |

*Seroconversión: incremento de cuatro veces en el título de anticuerpos vibriocidas respecto a los valores pre-inoculación (incremento de dos en el índice de dilución). n, número de conejos que seroconvirtieron; Total, número de conejos inoculados; GMT, media geométrica del título. No se encontraron diferencias significativas en la respuesta bactericida que se indujo por las diferentes cepas estudiadas (MANOVA de clasificación simple; Criterio de Wilks, Prueba de Lawley-Hotelling y Prueba de Pillai: $p > 0,05$).

Inmunogenicidad en ratas

El modelo de rata se empleó como modelo adicional en los estudios preclínicos dirigidos a evaluar la capacidad inmunogénica de las diferentes generaciones de CGM desarrolladas en este trabajo. Para ello, una dosis única de 5×10^{10} UFC de la CGM de primera generación, TLP13 y sus derivados de segunda (TLP132) y tercera generación (TLP01 y TLP05) se administró por vía orogástrica en ratas adultas (6 animales por cepa), siguiendo el procedimiento descrito por Sifontes y cols. (2009). En paralelo un grupo control (N=4) recibió solamente el vehículo sin carga bacteriana.

Para conocer la capacidad inmunogénica de estas cepas, se determinó la respuesta de anticuerpos inhibidores del crecimiento bacteriano (vibriocidas). En todos los grupos experimentales se detectó

seroconversión de anticuerpos bactericidas desde el tercer día después de la inoculación (primer punto evaluado) y la respuesta fue positiva en todos los animales desde los 9 hasta los 14 días, momento en el que comienza a disminuir la tasa de seroconversión (Tabla 2). En el grupo control, que solo recibió el vehículo sin carga, no se detectó respuesta alguna. Las medias geométricas de los títulos vibriocidas inducidos por las cepas TLP13, TLP132 y TLP01 alcanzaron su punto máximo a los siete días y tendieron a un rango entre 80 y 5 120. Ya a los 14 días, estos títulos vibriocidas estaban en fase decreciente. El comportamiento del grupo inmunizado con la cepa TLP05 fue diferente, por cuanto el momento del pico en la respuesta fue a los 9 días. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la respuesta vibriocida que se indujo por las diferentes cepas estudiadas (MANOVA de clasificación simple, criterio de Wilks: $p=0,089$; Prueba de Lawley-Hotelling : $p=0,112$ y prueba de Pillai: $p=0,075$). Este análisis indica que las diferentes modificaciones genéticas no afectaron la capacidad de las cepas para promover una respuesta inmune en el modelo de rata adulta. La excreción de vibrios, detectada en los coprocultivos, fue de muy corta duración en este modelo (menos de 48 h), aunque, suficiente para provocar una respuesta inmunitaria significativa.

Tabla 2. Respuesta de anticuerpos vibriocidas en sueros de ratas inoculadas intragástricamente con una simple dosis de 5×10^{10} UFC de cepas atenuadas de *V. cholerae* O139.

| Cepa | Sero-conversión* n/total | GMT a diferentes tiempos (Mínimo-Máximo) | | | | | | |
|--------|-----------------------------|---|------------------|-------------------|-------------------|------------------|----------------|---------------|
| | | 0 d | 3 d | 7 d | 9 d | 14 d | 21 d | 28 d |
| TLP13 | 6/6 | 5 | 359 (160-640) | 452 (160-1280) | 254 (80-640) | 57 (40-80) | 16 (5-80) | 11 (5-40) |
| TLP132 | 6/6 | 5 | 142 (40-640) | 570 (320-5120) | 359 (320-5120) | 127 (20-5120) | 71 (5-2560) | 50 (5-320) |
| TLP01 | 6/6 | 5 | 127 (40-320) | 226 (80-640) | 201 (40-320) | 57 (40-320) | 25 (5-320) | 25 (5-320) |
| TLP05 | 6/6 | 5 | 57 (5-160) | 90 (5-320) | 90 (80-160) | 45 (20-160) | 14 (5-160) | 11 (5-80) |

*Seroconversión: incremento de cuatro veces en el título de anticuerpos vibriocidas respecto a los valores pre-inoculación. n, número de ratas que seroconvirtieron; Total, número de ratas inoculadas; GMT, media geométrica del título. No se encontraron diferencias significativas en la respuesta vibriocida que se indujo por las diferentes cepas estudiadas (MANOVA de clasificación simple; criterio de Wilks, Prueba de Lawley-Hotelling y prueba de Pillai: $p > 0,05$).

La rata ha sido un modelo poco explorado en la experimentación de cólera, sin embargo existen evidencias de que luego de inoculación oral de *V. cholerae*, estos animales son capaces de generar una respuesta inmune contra el microorganismo. (Kalambaheti y cols., 1998; Sifontes-Rodríguez y cols., 2009). Los resultados aquí obtenidos constituyen el primer reporte de evaluación de cepas O139 en ratas y sugieren que a pesar de poseer cápsula estas son capaces de inducir una respuesta inmune sistémica, que en términos de anticuerpos bactericidas es comparable a lo que se observa cuando se emplea este modelo con vibrios O1 (Sifontes-Rodríguez y cols., 2009).

Consideraciones finales

El desarrollo de una vacuna de dosis única que proporcione una protección efectiva a largo plazo contra el cólera, más allá de la ofrecida por las vacunas disponibles en la actualidad, facilitaría el uso más generalizado de la inmunización para combatir esta enfermedad. El empleo de vacunas vivas atenuadas abre una posibilidad en este sentido. Siendo los serogrupos O1 y O139 de *V. cholerae* los agentes etiológicos de la enfermedad, no existe en este momento ninguna vacuna viva atenuada que proteja contra la infección con *V. cholerae* O139.

Las cepas vivas atenuadas resultan muy promisorias para reducir el impacto global del cólera. Contra el serogrupo O139, no obstante, solo dos cepas atenuadas, CVD112 y Bengal-15, han sido evaluadas en humanos (Coster y cols., 1995; Tacket y cols., 1995). Ambos candidatos O139 resultaron seguros e inmunogénicos en voluntarios. Sin embargo, luego de los primeros estudios pilotos realizados en la década del 90, no se han publicado otros artículos relacionados con la evaluación o el desarrollo farmacéutico de estas cepas. El resto de las cepas atenuadas del serogrupo O139 que se han reportado muestran en los estudios preclínicos resultados poco alentadores, sobre su posible desempeño y seguridad en humanos (Ravichandran y cols., 2006; Chan y cols., 2010; Cheong y cols., 2010).

El proyecto cubano de desarrollo de la vacuna de cólera incluye la construcción de una cepa genéticamente modificada de *V. cholerae* O139 que proteja contra el cólera producido por este serogrupo. Para cumplir esa meta se realizó el trabajo descrito en esta tesis, para lo cual se empleó una estrategia similar, pero perfeccionada, de la seguida para obtener la cepa 638, del serogrupo O1. Las cepas TLP01 y TLP05, descritas en este trabajo, constituyen una variante mótil y no mótil, respectivamente, derivadas de un aislado clínico de *V. cholerae* O139. El estudio preclínico de ambas cepas resultó satisfactorio, por cuanto se demostró que la estrategia empleada garantizó una atenuación significativa de la virulencia en el modelo para cólera de ratón infante, sin comprometer la inmunogenicidad, la cual se estudió en dos modelos animales: el conejo y la rata adultos. Al no existir un modelo animal que reproduzca la enfermedad, nada sustituye la evaluación en voluntarios para conocer el nivel de seguridad alcanzado por determinado candidato vacunal. El poseer mayor similitud con la cepa 638 permite sugerir el pase, en primer lugar, de la cepa TLP01 a la fase de desarrollo farmacéutico. Este criterio se basa, además, en que los resultados de inmunogenicidad en ratas pudieran ser indicadores de sobre-atenuación en la cepa TLP05 con relación a TLP01. En última instancia, el mejor candidato será aquel que induzca en humanos la respuesta inmune más potente, con el mejor perfil de seguridad. Existen experiencias previas del empleo de variantes vacunales bivalentes, pero no existe hasta la fecha ninguna formulación de este tipo basada en cepas vivas atenuadas (Anh y cols., 2007; Mahalanabis y cols., 2008). Las cepas TLP01 o TLP05, conjuntamente con la cepa 638, pudieran constituir el ingrediente activo de una vacuna bivalente contra el cólera.

CONCLUSIONES

1. La cepa de *V. cholerae* O139 CRC266 es virulenta y coloniza el intestino del ratón neonato, no posee secuencias del fago VGJ ϕ y es susceptible a cloranfenicol, estreptomicina, sulfametoxazol y trimetoprima, todo lo cual permite su empleo como cepa de partida para la obtención de cepas vivas atenuadas de *V. cholerae* con fines vacunales.
2. La cepa CRC266 posee una estructura compleja de profagos CTX ϕ , localizada en el sitio *difI* de su cromosoma, en la que se identificó por primera vez en una cepa de *V. cholerae* la existencia de alelos diferentes de formas precursoras de CTX ϕ .
3. Las cepas TLP01 y TLP05, derivadas de CRC266, constituyen variantes mótil y no mótil, respectivamente, que carecen de copias de CTX ϕ en su genoma, por lo que no producen toxina colérica, que poseen el gen *hapA* interrumpido por el gen *celA* de *C. thermocellum*, por lo que pueden ser identificadas por su capacidad celulolítica, que poseen, además, una delección del 82% en el gen *mshA* que impide la producción de la subunidad proteica principal de la fimbria MSHA y que colonizan el intestino de ratones Balb/c lactantes sin provocar efecto letal.
4. Las cepas TLP01 y TLP05 no se infectan con VGJ ϕ , no se infectan *in vitro* con CTX ϕ , y sólo lo hacen durante la colonización intestinal, todo lo cual les confiere mejores propiedades de bioseguridad ya que no pueden readquirir los genes de la toxina colérica a través de la infección con fagos híbridos que utilicen la fimbria MSHA como receptor.
5. Las cepas TLP01 y TLP05 resultan inmunogénicas en los modelos de conejo y rata adultos, por cuanto la inoculación de una dosis única de estas cepas en dichos biomodelos induce la producción de anticuerpos séricos con actividad bactericida *in vitro* contra una cepa de *V. cholerae* O139, lo cual avala la continuidad del desarrollo farmacéutico de estas cepas, dirigido a la preparación de una formulación vacunal que pueda ser estudiada en humanos.

RECOMENDACIONES

- Realizar el desarrollo farmacéutico de las cepas TLP01, primero, y TLP05, si es necesario, así como los estudios preclínicos y clínicos fase I-II con el producto formulado para seleccionar el mejor candidato vacunal.
- Realizar estudios preclínicos y clínicos con una formulación bivalente del producto seleccionado y la cepa 638.
- Evaluar la capacidad de las cepas TLP01 y TLP05 de producir biopelículas dependientes de calcio.
- Analizar la potencialidad de las cepas TLP01 y TLP05 para producir biopelículas y adquirir competencia natural en presencia de quitina, y evaluar así los riesgos reales de readquisición de los genes que codifican la toxina del cólera en el ambiente, mediante este mecanismo.
- Determinar la capacidad de resistencia de las cepas TLP01 y TLP05 ante componentes antibacterianos asociados a los habitats naturales de *V. cholerae*.
- Identificar la naturaleza de la mutación que determina la falta de motilidad en la cepa TLP05, así como la estabilidad del fenotipo que confiere.
- Identificar la naturaleza de la mutación que determina el perfil mixto de OMP en las cepas TLP01 y TLP05.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anh DD, Canh DG, López AE, Thiem VD, Long PT, Son NH y cols. (2007) Safety and immunogenicity of a reformulated Vietnamese bivalent killed, whole-cell, oral cholera vaccine in adults. *Vaccine* 25: 1149-1155
2. Albert MJ, Alam K, Rahman AS, Huda S y Sack RB (1994) Lack of cross-protection against diarrhea due to *Vibrio cholerae* O1 after oral immunization of rabbits with *V. cholerae* O139 Bengal. *J Infect Dis* 169 (3): 709-710
3. Ali M, Emch M, Park JK, Yunus M y Clemens J (2011) Natural cholera infection-derived immunity in an endemic setting. *J Infect Dis* 204 (6): 912-918
4. Ausubel FM, Brent R y Kingston RE (1995) *Short protocols in molecular biology* New York: John Wiley & Sons Inc.
5. Basu A, Mukhopadhyay AK, Sharma C, Jyot J, Gupta N, Ghosh A, Bhattacharya SK, Takeda Y y cols. (1998) Heterogeneity in the organization of the CTX genetic element in strains of *Vibrio cholerae* O139 Bengal isolated from Calcutta, India and Dhaka, Bangladesh and its possible link to the dissimilar incidence of O139 cholera in the two locales. *Microb Pathog* 24 (3): 175-183
6. Beaber JW, Hochhut B y Waldor MK (2002) Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* 184 (15): 4259-4269
7. Benitez JA, Garcia L, Silva A, Garcia H, Fando R, Cedre B, Perez A, Campos J y cols. (1999) Preliminary assessment of the safety and immunogenicity of a new CTX Φ -negative, hemagglutinin/protease-defective El Tor strain as a cholera vaccine candidate. *Infect Immun* 67 (2): 539-545
8. Blokesch M y Schoolnik GK (2007) Serogroup conversion of *Vibrio cholerae* in aquatic reservoirs. *PLoS Pathog* 3 (6): e81
9. Booth BA, Boesman-Finkelstein M y Finkelstein RA (1983) *Vibrio cholerae* soluble hemagglutinin/protease is a metalloenzyme. *Infect Immun* 42 (2): 639-644
10. Boyd EF, Heilpern AJ y Waldor MK (2000) Molecular analyses of a putative CTX Φ precursor and evidence for independent acquisition of distinct CTX Φ s by toxigenic *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* 182 (19): 5530-5538
11. Campos J, Fando R, Silva A, Rodriguez BL y Benitez JA (1998) Replicating function of the RS1 element associated with *Vibrio cholerae* CTX phi prophage. *FEMS Microbiol Lett* 164 (1): 141-147
12. Campos J, Martinez E, Izquierdo Y y Fando R (2010) VEJ Φ , a novel filamentous phage of *Vibrio cholerae* able to transduce the cholera toxin genes. *Microbiology* 156 (Pt 1): 108-115
13. Campos J, Martinez E, Marrero K, Silva Y, Rodriguez BL, Suzarte E, Ledon T y Fando R (2003a) Novel type of specialized transduction for CTX Φ or its satellite phage RS1 mediated by filamentous phage VGJ Φ in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* 185 (24): 7231-7240
14. Campos J, Martinez E, Suzarte E, Rodriguez BL, Marrero K, Silva Y, Ledon T, del Sol R y cols. (2003b) VGJ Φ , a novel filamentous phage of *Vibrio cholerae*, integrates into the same chromosomal site as CTX phi. *J Bacteriol* 185 (19): 5685-5696
15. Chan M, Cheong TG, Kurunathan S, Chandrika M, Ledon T, Fando R, Lalitha P, Zainuddin ZF y cols. (2010) Construction and characterization of an auxotrophic *ctxA* mutant of O139 *Vibrio cholerae*. *Microb Pathog* 49 (5): 211-216
16. Cheong TG, Chan M, Kurunathan S, Ali SA, ZiNing T, Zainuddin ZF, Lalitha P y Ravichandran M (2010) Construction and characterization of *rtxA* and *rtxC* mutants of auxotrophic O139 *Vibrio cholerae*. *Microb Pathog* 48 (2): 85-90
17. Chiavelli DA, Marsh JW y Taylor RK (2001) The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. *Appl Environ Microbiol* 67 (7): 3220-3225
18. Chomczynski P (1992) One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal Biochem* 201 (1): 134-139
19. Chowdhury MI, Sheikh A y Qadri F (2009) Development of Peru-15 (CholeraGarde), a live-attenuated oral cholera vaccine: 1991-2009. *Expert Rev Vaccines* 8 (12): 1643-1652

20. Clemens J, Shin S, Sur D, Nair GB y Holmgren J (2011) New-generation vaccines against cholera. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8: 701-710
21. Coster TS, Killeen KP, Waldor MK, Beattie DT, Spriggs DR, Kenner JR, Trofa A, Sadoff JC y cols. (1995) Safety, immunogenicity, and efficacy of live attenuated *Vibrio cholerae* O139 vaccine prototype. *Lancet* 345 (8955): 949-952
22. Croft NM y Hodges M (2005) IgM: mucosal response in acute diarrhoeal disease of infants. *Scand J Gastroenterol* 40 (8): 965-971
23. Das B, Bischerour J y Barre FX (2011) VGJphi integration and excision mechanisms contribute to the genetic diversity of *Vibrio cholerae* epidemic strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (6): 2516-2521
24. Donnenberg MS y Kaper J (1991) Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun* 59: 4310
25. Dower WJ, Miller JF y Ragsdale CW (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16 (13): 6127-6145
26. Falero G, Rodriguez BL, Rodriguez I, Campos J, Ledon T, Valle E, Silva Y, Marrero K y cols. (2003) Production and characterization of monoclonal antibodies to El Tor toxin co-regulated pilus of *Vibrio cholerae*. *Hybrid Hybridomics* 22 (5): 315-320
27. Falero G, Rodriguez BL, Valmaseda T, Perez ME, Perez JL, Fando R, Robert A, Campos J y cols. (1998) Production and characterization of a monoclonal antibody against mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae*. *Hybridoma* 17 (1): 63-67
28. Fando, R. (2004) Obtención, caracterización y evaluación de cepas atenuadas de *Vibrio cholerae* para fines vacunales. Tesis de Doctorado,
29. Faruque SM, Bin N, I, Fujihara K, Diraphat P, Chowdhury N, Kamruzzaman M, Qadri F, Yamasaki S y cols. (2005) Genomic sequence and receptor for the *Vibrio cholerae* phage KSF-1phi: evolutionary divergence among filamentous vibriophages mediating lateral gene transfer. *J Bacteriol* 187 (12): 4095-4103
30. Faruque SM, Chowdhury N, Kamruzzaman M, Ahmad QS, Faruque AS, Salam MA, Ramamurthy T, Nair GB y cols. (2003a) Reemergence of epidemic *Vibrio cholerae* O139, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 9 (9): 1116-1122
31. Faruque SM, Sack DA, Sack RB, Colwell RR, Takeda Y y Nair GB (2003b) Emergence and evolution of *Vibrio cholerae* O139. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (3): 1304-1309
32. Faruque SM, Siddique AK, Saha MN, Asadulghani, Rahman MM, Zaman K, Albert MJ, Sack DA y cols. (1999) Molecular characterization of a new ribotype of *Vibrio cholerae* O139 Bengal associated with an outbreak of cholera in Bangladesh. *J Clin Microbiol* 37 (5): 1313-1318
33. Fullner KJ, Boucher JC, Hanes MA, Haines GK, III, Meehan BM, Walchle C, Sansonetti PJ y Mekalanos JJ (2002) The contribution of accessory toxins of *Vibrio cholerae* O1 El Tor to the proinflammatory response in a murine pulmonary cholera model. *J Exp Med* 195 (11): 1455-1462
34. Fullner KJ, Lencer WI y Mekalanos JJ (2001) *Vibrio cholerae*-induced cellular responses of polarized T84 intestinal epithelial cells are dependent on production of cholera toxin and the RTX toxin. *Infect Immun* 69 (10): 6310-6317
35. Garcia H, Thompson R, Valera R, Fando R, Fumani J, Jani I, Mirabal M, Armesto MI y cols. (2011) A single dose of live-attenuated 638 *Vibrio cholerae* oral vaccine is safe and immunogenic in adult volunteers in Mozambique. *VacchiMonitor* 20 (3): 1-8
36. Garcia IL, Oliva HR, Cedre MB, Valmaseda PT, Garcia SH, Talavera CA, Perez Quinoy JL y Sierra GG (1998) Intraduodenal inoculation of adult rabbits for evaluating the immunogenicity of genetically attenuated *Vibrio cholerae* strains. *Lab Anim Sci* 48 (5): 538-541
37. Garcia L, Jidy MD, Garcia H, Rodriguez BL, Fernandez R, Ano G, Cedre B, Valmaseda T y cols. (2005) The vaccine candidate *Vibrio cholerae* 638 is protective against cholera in healthy volunteers. *Infect Immun* 73 (5): 3018-3024
38. Gardel CL y Mekalanos JJ (1996) Alterations in *Vibrio cholerae* motility phenotypes correlate with changes in virulence factor expression. *Infect Immun* 64 (6): 2246-2255
39. Harrison LM, Rallabhandi P, Michalski J, Zhou X, Steyert SR, Vogel SN y Kaper JB (2008) *Vibrio cholerae* flagellins induce Toll-like receptor 5-mediated interleukin-8 production through mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB activation. *Infect Immun* 76 (12): 5524-5534

40. Herrington DA, Hall RH, Losonsky G, Mekalanos JJ, Taylor RK y Levine MM (1988) Toxin, toxin-coregulated pili, and the toxR regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. *J Exp Med* 168 (4): 1487-1492
41. Hochhut B, Lotfi Y, Mazel D, Faruque SM, Woodgate R y Waldor MK (2001) Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. *Antimicrob Agents Chemother* 45 (11): 2991-3000
42. Holmgren J (1973) Comparison of the tissue receptors for *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins by means of gangliosides and natural cholera toxoid. *Infect Immun* 8 (6): 851-859
43. Iwanaga M y Yamamoto K (1985) New medium for the production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. *J Clin Microbiol* 22 (3): 405-408
44. Jertborn M, Svennerholm AM y Holmgren J (1996) Intestinal and systemic immune responses in humans after oral immunization with a bivalent B subunit-O1/O139 whole cell cholera vaccine. *Vaccine* 14 (15): 1459-1465
45. Kalambaheti T, Chaisri U, Srimanote P, Pongponratn E y Chaicumpa W (1998) Immunogenicity and protective role of three formulations of oral cholera vaccine. *Vaccine* 16 (2-3): 201-207
46. Kenner JR, Coster TS, Taylor DN, Trofa AF, Barrera-Oro M, Hyman T, Adams JM, Beattie DT y cols. (1995) Peru-15, an improved live attenuated oral vaccine candidate for *Vibrio cholerae* O1. *J Infect Dis* 172 (4): 1126-1129
47. Ketley JM, Michalski J, Galen J, Levine MM y Kaper JB (1993) Construction of genetically marked *Vibrio cholerae* O1 vaccine strains. *FEMS Microbiol Lett* 111 (1): 15-21
48. Kierek K y Watnick PI (2003) The *Vibrio cholerae* O139 O-antigen polysaccharide is essential for Ca²⁺-dependent biofilm development in sea water. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (24): 14357-14362
49. Kimsey HH, Nair GB, Ghosh A y Waldor MK (1998) Diverse CTX Φ and evolution of new pathogenic *Vibrio cholerae*. *Lancet* 352 (9126): 457-458
50. Kimsey HH y Waldor MK (1998) CTX Φ immunity: application in the development of cholera vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (12): 7035-7039
51. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (259): 680-685
52. Liang W, Wang S, Yu F, Zhang L, Qi G, Liu Y, Gao S y Kan B (2003) Construction and evaluation of a safe, live, oral *Vibrio cholerae* vaccine candidate, IEM108. *Infect Immun* 71 (10): 5498-5504
53. Losonsky GA, Yunyongying J, Lim V, Reymann M, Lim YL, Wasserman SS y Levine MM (1996) Factors influencing secondary vibriocidal immune responses: relevance for understanding immunity to cholera. *Infect Immun* 64 (1): 10-15
54. Mahalanabis D, Lopez AL, Sur D, Deen J, Manna B, Kanungo S, von Seidlein L, Carbis R y cols. (2008) A randomized, placebo-controlled trial of the bivalent killed, whole-cell, oral cholera vaccine in adults and children in a cholera endemic area in Kolkata, India. *PLoS One* 3 (6): e2323
55. Mantri CK, Mohapatra SS, Colwell RR y Singh DV (2010) Sequence analysis of *Vibrio cholerae* *orfU* and *zot* from pre-CTXphi and CTX Φ reveals multiple origin of pre-CTXphi and CTXphi. *Environ Microbiol Rep* 2 (1): 67-75
56. Martinez E, Silvera R, Campos J, Rodriguez BL, Silva Y, Suzarte E, Ledon T, Marrero K y cols. (2005) Cepas vivas atenuadas de *Vibrio cholerae* con características mejoradas de seguridad ambiental. *Revista CNIC Ciencias Biológicas* 36 (3)
57. Meibom KL, Blokesch M, Dolganov NA, Wu CY y Schoolnik GK (2005) Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science* 310 (5755): 1824-1827
58. Mekalanos JJ y Sadoff JC (1994) Cholera vaccines: fighting an ancient scourge. *Science* 265: 1387-1389
59. Mel SF, Fullner KJ, Wimer-Mackin S, Lencer WI y Mekalanos JJ (2000) Association of protease activity in *Vibrio cholerae* vaccine strains with decreases in transcellular epithelial resistance of polarized T84 intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 68 (11): 6487-6492
60. Michalski J, Galen JE, Fasano A y Kaper JB (1993) CVD110, an attenuated *Vibrio cholerae* O1 El Tor live oral vaccine strain. *Infect Immun* 61 (10): 4462-4468

61. Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Mukhopadhyay AK, Garg S, Bhattacharya MK, Takeda T, Shimada T y cols. (1994) Spread of *Vibrio cholerae* O139 Bengal in India. *J Infect Dis* 169 (5): 1029-1034
62. Nusrin S, Khan GY, Bhuiyan NA, Ansaruzzaman M, Hossain MA, Safa A, Khan R, Faruque SM y cols. (2004) Diverse CTX phages among toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains isolated between 1994 and 2002 in an area where cholera is endemic in Bangladesh. *J Clin Microbiol* 42 (12): 5854-5856
63. Poulos C, Riewpaiboon A, Stewart JF, Clemens J, Guh S, Agtini M, Sur D, Islam Z y cols. (2012) Costs of illness due to endemic cholera. *Epidemiol Infect* 140 (3): 500-509
64. Qadri F, Svennerholm AM, Shamsuzzaman S, Bhuiyan TR, Harris JB, Ghosh AN, Nair GB, Weintraub A y cols. (2005) Reduction in capsular content and enhanced bacterial susceptibility to serum killing of *Vibrio cholerae* O139 associated with the 2002 cholera epidemic in Bangladesh. *Infect Immun* 73 (10): 6577-6583
65. Qadri F, Wenneras C, Albert MJ, Hossain J, Mannoor K, Begum YA, Mohi G, Salam MA y cols. (1997) Comparison of immune responses in patients infected with *Vibrio cholerae* O139 and O1. *Infect Immun* 65 (9): 3571-3576
66. Qu M, Xu J, Ding Y, Wang R, Liu P, Kan B, Qi G, Liu Y y cols. (2003) Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* O139 in China: polymorphism of ribotypes and CTX elements. *J Clin Microbiol* 41 (6): 2306-2310
67. Ramamurthy T, Garg S, Sharma R, Bhattacharya SK, Nair GB, Shimada T, Takeda T, Karasawa T y cols. (1993) Emergence of novel strain of *Vibrio cholerae* with epidemic potential in southern and eastern India. *Lancet* 341 (8846): 703-704
68. Ravichandran M, Ali SA, Rashid NH, Kurunathan S, Yean CY, Ting LC, Bakar AS, Lalitha P y cols. (2006) Construction and evaluation of a O139 *Vibrio cholerae* vaccine candidate based on a hemA gene mutation. *Vaccine* 24: 3750-3761
69. Richardson SH (1994) *In Vibrio cholerae and cholera. Molecular to global perspectives*. Wachmuth I.K., Blake P.A. y Olsvick O (eds). Washington: ASM press, pp. 203-225
70. Ritchie JM, Rui H, Bronson RT y Waldor MK (2010) Back to the future: studying cholera pathogenesis using infant rabbits. *MBio* 1 (1)
71. Robert A, Silva A, Benitez JA, Rodriguez BL, Fando R, Campos J, Sengupta DK, Boesman-Finkelstein M y cols. (1996) Tagging a *Vibrio cholerae* El Tor candidate vaccine strain by disruption of its hemagglutinin/protease gene using a novel reporter enzyme: *Clostridium thermocellum* endoglucanase A. *Vaccine* 14 (16): 1517-1522
72. Rui H, Ritchie JM, Bronson RT, Mekalanos JJ, Zhang Y y Waldor MK (2010) Reactogenicity of live-attenuated *Vibrio cholerae* vaccines is dependent on flagellins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (9): 4359-4364
73. Sarkar BL, Bhowmick TS, Das M, Rajendran K y Nair GB (2011) Phage types of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in the past decade in India. *Jpn J Infect Dis* 64 (4): 312-315
74. Sharma C, Maiti S, Mukhopadhyay AK, Basu A, Basu I, Nair GB, Mukhopadhyaya R, Das B y cols. (1997) Unique organization of the CTX genetic element in *Vibrio cholerae* O139 strains which reemerged in Calcutta, India, in September 1996. *J Clin Microbiol* 35 (12): 3348-3350
75. Sifontes-Rodriguez S, Infante-Bourzac JF, Diaz-Rivero D, Lopez-Feria Y, Perez-Perez M, Sosa-Roble E, Perez-Amat V, Lopez-Hernandez Y y cols. (2009) Repeated dose toxicity study of a live attenuated oral cholera vaccine in Sprague Dawley rats. *Arch Med Res* 40 (7): 527-535
76. Stoebner JA y Payne SM (1988) Iron-regulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 56 (11): 2891-2895
77. Stokes NR, Zhou X, Meltzer SJ y Kaper JB (2004) Transcriptional responses of intestinal epithelial cells to infection with *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 72 (7): 4240-4248
78. Tacket CO, Losonsky G, Nataro JP, Comstock L, Michalski J, Edelman R, Kaper JB y Levine MM (1995) Initial clinical studies of CVD 112 *Vibrio cholerae* O139 live oral vaccine: safety and efficacy against experimental challenge. *J Infect Dis* 172 (3): 883-886

79. Tacket CO, Losonsky G, Nataro JP, Cryz SJ, Edelman R, Fasano A, Michalski J, Kaper JB y cols. (1993) Safety and immunogenicity of live oral cholera vaccine candidate CVD 110, a delta ctxA delta zot delta ace derivative of El Tor Ogawa *Vibrio cholerae*. *J Infect Dis* 168 (6): 1536-1540
80. Tacket CO, Taylor RK, Losonsky G, Lim Y, Nataro JP, Kaper JB y Levine MM (1998) Investigation of the roles of toxin-coregulated pili and mannose-sensitive hemagglutinin pili in the pathogenesis of *Vibrio cholerae* O139 infection. *Infect Immun* 66 (2): 692-695
81. Udden SM, Zahid MS, Biswas K, Ahmad QS, Cravioto A, Nair GB, Mekalanos JJ y Faruque SM (2008) Acquisition of classical CTX prophage from *Vibrio cholerae* O141 by El Tor strains aided by lytic phages and chitin-induced competence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (33): 11951-11956
82. Vichi J, Suzarte E, Ledon T y Fando R (2010) Optimización del ensayo vibriocida colorimétrico para *V. cholerae* O139. *Revista CNIC Ciencias Biológicas*
83. Waldor MK y Mekalanos JJ (1996) Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 272 (5270): 1910-1914
84. Waldor MK, Tschape H y Mekalanos JJ (1996) A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. *J Bacteriol* 178 (14): 4157-4165
85. Watnick PI, Lauriano CM, Klose KE, Croal L y Kolter R (2001) The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol Microbiol* 39 (2): 223-235
86. WHO (2003) Cholera, 2002. Weekly epidemiological record (78): 269-276
87. WHO (2009) Cholera: global surveillance summary, 2008. Weekly epidemiological record 84: 309-324
88. WHO (2010a) Cholera, 2009. Weekly epidemiological record 85: 293-308
89. WHO (2010b) Vacunas contra el cólera: Documento de posición de la OMS. Weekly epidemiological record 85: 117-128
90. Yildiz FH, Dolganov NA y Schoolnik GK (2001) VpsR, a Member of the Response Regulators of the Two-Component Regulatory Systems, Is Required for Expression of vps Biosynthesis Genes and EPS(ETr)-Associated Phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *J Bacteriol* 183 (5): 1716-1726
91. Yu L, Zhou Y, Wang R, Lou J, Zhang L, Li J, Bi Z y Kan B (2012) Multiple Antibiotic Resistance of *Vibrio cholerae* Serogroup O139 in China from 1993 to 2009. *PLoS One* 7 (6)

AUTOBIBLIOGRAFÍA

Producción científica relacionada con la tesis

Ledón T., Ferrán B., Pérez C., Suzarte E., Vichi J., Marrero K., Oliva R., Fando R. TLP01, an *mshA* mutant of *Vibrio cholerae* O139 as vaccine candidate against cholera. 2012. *Microbes and Infection* 14: 968-978.

Ledón T., Rodríguez S., Matos M., Ancheta O., Benchimol M., Reinol F., Fando R. Electron microscopic visualization of capsular material of *Vibrio cholerae* O139 strains with ruthenium red staining. 2012. *Acta Microscópica* 21: 1-8.

Ledón T., Ferrán B., Fando R. Estudio de la funcionalidad de ToxR en cepas atenuadas de *Vibrio cholerae* O139. 2011. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 42: 25-28.

Ledón T., Campos J., Suzarte E., Rodríguez B., Marrero K., Fando R. El Tor and Calcutta CTX ϕ precursors coexisting with intact CTX ϕ copies in *Vibrio cholerae* O139 isolates. 2008. *Res. Microbiol.* 159: 81-87.

Patentes relacionadas con la tesis

Campos J., Moreira T., Marrero K., Rodríguez B.L., Martínez E., **Ledón T.**, Silva Y., Suzarte E., Delgado H.C., Urra C., Fando R. Attenuated strains of *Vibrio cholerae* and lyophilised vaccines containing same. No. PCT/CU2004/000002, concedida en: Europa, Estados Unidos, Sudáfrica, Malasia, Cuba, Argelia, ARIPO, Australia, China, India, Madagascar, México, OAPI, Republica Popular Democrática de Korea y Rusia.

Eventos Científicos

Bioteología Habana 2012. **Ledón T.** Ferrán B., Pérez C., Suzarte E., Vichi J., Marrero K., Oliva R., Fando R. TLP01, a *Vibrio cholerae* O139 vaccine candidate with enhanced environmental safety.

Congreso CIASEM 2011. **Ledón T.**, Rodríguez S., Matos M., Ancheta O., Benchimol M. I, Reinol F., Fando R. Electron Microscopic Visualization of Capsular Material of *Vibrio cholerae* O139 Strains with Ruthenium Red Staining.

Congreso Internacional CNIC 2010. **Ledón T.**, Ferrán B., Vichi J., Suzarte E, Oliva R y Fando R. Evaluación en modelos animales de cepas vivas atenuadas de *Vibrio cholerae* O139.

Bioteología Habana 2006. **Ledón T.**, Campos J., Suzarte E., Marrero K., Rodríguez B., Fando R. Diversity of CTX ϕ precursors in *Vibrio cholerae* O139 isolates.

Tutoría de Tesis de diploma

Tesis de diploma de Licenciatura en Bioquímica. 2007. Modificaciones genéticas y caracterización preliminar de cepas atoxigénicas de *Vibrio cholerae* O139 con fines vacunales.

Tesis de diploma de Licenciatura en Bioquímica. 2009. Evaluación inmunogénica de cepas atoxigénicas de *Vibrio cholerae* O139 con fines vacunales en dos modelos animales.