

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Caracterización de un modelo murino de infección y persistencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) aislada de humano e IgA intestinal”

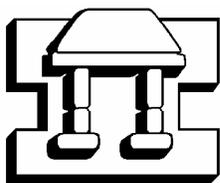
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

MIGUEL ÁNGEL ONTIVEROS TORRES



IZTACALA

DIRECTORAS DE TESIS:
DRA. TERESA ESTRADA GARCÍA
M. en C **CATALINA LÓPEZ SAUCEDO**

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉX.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

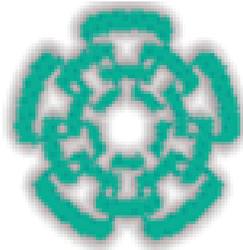


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



El presente trabajo se realizo en el laboratorio de la Dra. Maria Teresa Estrada García del departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco. Así mismo agradezco a la Dirección y contralorías del CINVESTAV el apoyo económico que me fue otorgado durante noviembre del 2005.

DEDICATORIAS

A mis padres:

Elena Torres Barriéntos y Carlos Ontiveros Salazar

Por otorgarme el mejor regalo que todo ser ha recibido: la vida. Jamás podré terminar de agradecer todo su apoyo, cariño y comprensión, este logro nos acerca un poco al sueño que nos forjamos los tres: "Tratar de conquistar el mundo".

A mi familia:

Dani, Cristy, Karla, Itzel, Saul, los gatos y el Chiquilín

Otra de las cosas más preciosas que me asignaron en esta vida lo constituyen ustedes. Jamás me quitarán la dicha de haber crecido junto a mi hermosa familia. Gracias.

A mi abuelita:

"Papachita"

Lamento tanto que no este ahora con nosotros, poder decirle que por fin lo logramos una más de nuestras metas, mil gracias por todo ese cariño y bendiciones vertidas al más tambaleante de sus nietos....

A la esencia Inmortal

Al ojo que cubre toda perspectiva, al señor de la montaña, que retoza entre los matorrales, al que acontece mis sueños, al de la perpetua mirada que cobija la esperanza de un errante mundo.....

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Teresa Estrada García

Por rescatarme de ese peregrinaje y darle un sentido constructivo a mi vida, mil gracias por darme la oportunidad de trabajar con usted y con su maravilloso equipo de trabajo, por sus consejos y regaños enriquecedores, que reflejan la preocupación que sentía por su erosionado servidor.

A la M en C. Catalina López Saucedo

Por todo el apoyo técnico y bibliográfico que me brindo para la realización de este trabajo.

A mi pandilla del laboratorio

A Katy, Izita, Martita, Ale, Héctor, José Juan, Roshy, Oscar, Marisela, Daniel, Oswaldo, la Sra. Mago y la Sra. Bety, ustedes son unos maravillosos personajes, que hacen tan amena la existencia en el laboratorio y de los cuales he aprendido muchísimo.

Un agradecimiento especial para Catalina, Iza y Martha, no solo por enseñarme que la maldad humana es inconmensurable, sino por que sin ustedes el día sería tan nublado y gris, gracias por ser un sol amigas y por su invaluable apoyo...

A mi pandilla de Iztacala:

Para Ale, Dianibiris, Belem, Samantha, Monicacha, Elsa, Vero, Lisseth, Lulu, Mony, Anita, Rosalba Becky-Jones, Chava Néstor, Chino, Noe, Servandosaurio, Marcelo, Marco, David, Richard y todos los demás. De Iztacala aprendí lo maravilloso que es la Biología, de mis amigos aprendí a vivir.

A mi eterna pandilla:

Ale Ribero, Mirza, Clara, Beto, Willy, Lalo, a la Familia Huitrón, Aldape, Hugo, Leonel, Marco. Espero contar toda la vida con la presencia de tan fundamentales amistades.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|-----------|
| ÍNDICE DE GRÁFICOS, TABLAS Y FIGURAS..... | iv |
| ABREVIATURAS..... | vi |
| RESUMEN..... | viii |
| 1.0 INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 Epidemiología de diarreas en México..... | 1 |
| 1.2 Agentes etiologicos que causan diarrea..... | 2 |
| 1.3 <i>Escherichia coli</i> | 2 |
| 1.4 <i>Escherichia coli</i> diarrogenicas..... | 2 |
| 1.5 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC)..... | 3 |
| 1.6 Patogénesis de ETEC..... | 3 |
| 1.6.1 La enterótoxina termolábil (LT)..... | 4 |
| 1.6.2 La enterótoxina termoestable (ST)..... | 6 |
| 1.7 Inmunidad intestinal..... | 8 |
| 1.7.1 Mecanismos de protección innata en el intestino..... | 8 |
| 1.7.2 La barrera de mucosa intestinal..... | 8 |
| 1.7.3 Importancia de la Inmunoglobulina A secretora (IgAs) en la defensa intestinal..... | 9 |
| 1.7.3.1 Descripción estructural de la molécula de IgAs..... | 9 |
| 1.7.3.2 Inducción de la respuesta de IgAs en el sistema inmune de mucosas..... | 10 |
| 1.7.3.3 Linfocitos B..... | 13 |
| 1.7.3.3.1 Células B foliculares..... | 13 |
| 1.7.3.3.2 Células B de zona marginal..... | 14 |
| 1.7.3.3.3 Células B1..... | 14 |
| 1.7.3.4 Intervención protectora de la IgAs a diferentes niveles..... | 15 |
| 1.8 Inmunidad innata y adaptativa..... | 16 |
| 1.9 La molécula CD40L y su importancia en la respuesta inmune..... | 17 |
| 2.0 ANTECEDENTES..... | 18 |
| 2.1 Respuesta inmune contra ETEC..... | 18 |
| 2.2. Planteamiento del Problema..... | 19 |
| 3.0 JUSTIFICACIÓN..... | 20 |
| 4.0 OBJETIVOS..... | 20 |
| 4.1 Objetivo general..... | 20 |
| 4.2 Objetivos particulares..... | 20 |
| 5.0 MATERIAL Y METODO..... | 21 |
| 5.1 Descripción de las cepas murinas..... | 21 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 5.1.1 | Características inmunológicas de los ratones experimentales C57BL/6..... | 21 |
| 5.1.2 | La cepa C57BL/6-Tnfsf5 ^{tm1lmx} (KOCD40L) como modelo idóneo de infección..... | 21 |
| 5.2 | Cepas murinas utilizadas..... | 22 |
| 5.3 | Genotipificación de las cepas de ratones experimentales..... | 22 |
| 5.3.1 | Extracción del DNA Murino..... | 22 |
| 5.3.2 | Iniciadores seleccionados para genotipificación por PCR de las cepas murinas..... | 23 |
| 5.3.3 | Mezcla de reacción para el ensayo de PCR..... | 23 |
| 5.3.4 | Programa de amplificación para identificar el gen que codifica para CD40L..... | 24 |
| 5.3.5 | Detección de los productos amplificados..... | 24 |
| 5.4 | Reproducción del modelo de infección y persistencia..... | 24 |
| 5.4.1 | Preparación del inóculo bacteriano..... | 24 |
| 5.4.2 | Inoculación de los ratones..... | 25 |
| 5.5 | Determinación de los genes de patogenia de ETEC por PCR múltiplex en los ensayos de persistencia e IgA intestinal..... | 25 |
| 5.5.1 | Muestreo de heces..... | 25 |
| 5.5.2 | Lisado bacteriano para obtener DNA..... | 26 |
| 5.5.3 | Reacción de PCR múltiplex para identificar ETEC..... | 26 |
| 5.5.3.1 | Iniciadores seleccionados..... | 26 |
| 5.5.3.2 | Mezcla de reacción para la PCR múltiplex..... | 27 |
| 5.5.3.3 | Programa de amplificación para identificar los genes <i>lt</i> y <i>st</i> | 27 |
| 5.6 | Extracción de la IgA de heces..... | 27 |
| 5.6.1 | Recolección de heces..... | 27 |
| 5.6.2 | Extracción de la IgA total de heces de ratón..... | 28 |
| 5.7 | Dot blot para determinar la presencia de la IgA total..... | 28 |
| 5.7.1 | Revelado de la membrana de nitrocelulosa..... | 29 |
| 5.8 | Estandarización de la ELISA para cuantificar IgA en las heces de los ratones KOCD40L..... | 29 |
| 5.8.1 | Curva de calibración de la concentración de IgA de ratón y determinación de IgA en los extractos obtenidos de heces..... | 29 |
| 6.0 | RESULTADOS..... | 32 |
| 6.1 | Definiciones operacionales..... | 32 |
| 6.2 | Genotipificación de los ratones silvestres C57BL/6 y KOCD40L..... | 32 |
| 6.3 | Identificación de los genes <i>lt</i> y <i>st</i> | 35 |
| 6.4 | Persistencia de ETEC en ratones KOCD40L de 7 semanas de edad con una dosis bacteriana de 1×10^8 | 36 |
| 6.4.1 | Comportamiento de los plásmidos LT y ST en el modelo de infección y persistencia de ETEC..... | 42 |
| 6.5 | Persistencia de ETEC en ratones KOCD40L de 11 semanas de edad con una dosis bacteriana de 1.5×10^8 | 44 |
| 6.6 | Determinación por dot blot de la IgA total en heces de los ratones KOCD40L y en la cepa silvestre C57BL/6 de 7 semanas de edad..... | 49 |
| 6.7 | Cuantificación por ELISA de la IgA total en heces de los ratones KOCD40L en condiciones basales y 30 días post-reto..... | 50 |

| | |
|--|----|
| 7.0 DISCUSIÓN | 52 |
| 8.0 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS | 57 |
| 9.0 BIBLIOGRAFÍA | 58 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS, TABLAS Y FIGURAS

| | | | |
|----------------|-----------|--|----|
| Figura | 1 | Acción patogénica de ETEC..... | 4 |
| Figura | 2 | Estructura tridimensional cristalográfica de la toxina LT..... | 5 |
| Figura | 3 | Mecanismo de intoxicación celular por la toxina termolábil..... | 6 |
| Figura | 4 | Principales rutas de señalización intracelular activadas por ST..... | 7 |
| Figura | 5 | Estructura dimérica de la IgA secretora en mucosas..... | 10 |
| Figura | 6 | Tejido linfoide asociado al intestino..... | 11 |
| Figura | 7 | Transporte de la IgAs a través del epitelio de las mucosas..... | 12 |
| Figura | 8 | DNA total aislado de las cepas murinas para la genotipificación..... | 33 |
| Figura | 9 | Productos de amplificación del gen <i>CD40L</i> y <i>3PDH</i> | 34 |
| Figura | 10 | Productos de amplificación del gen <i>It</i> y <i>st</i> | 35 |
| Figura | 11 | Productos de amplificación del gen <i>It</i> y pérdida del plásmido <i>st</i> | 42 |
| Figura | 12 | Dot blot de IgA en extractos de heces..... | 49 |
| Tabla | 1 | Iniciadores seleccionados para la amplificación específica del gen <i>CD40L</i> y del gen constitutivo <i>G3PDH</i> | 23 |
| Tabla | 2 | Componentes de la mezcla de reacción para el ensayo de PCR para identificar los genes <i>CD40L</i> y <i>G3PDH</i> | 23 |
| Tabla | 3 | Iniciadores seleccionados para la amplificación específica de los genes codificantes para las enterotoxinas características de ETEC..... | 26 |
| Tabla | 4 | Componentes de la mezcla de reacción para la PCR múltiplex de ETEC..... | 27 |
| Tabla | 5 | ELISA para determinar la concentración de IgA en heces..... | 31 |
| Tabla | 6 | UFC de ETEC en el primer ensayo de infección y persistencia..... | 41 |
| Tabla | 7 | Número de colonias que perdieron el plásmido ST en el primer ensayo de infección y persistencia..... | 43 |
| Tabla | 8 | UFC de ETEC en el segundo ensayo de infección y persistencia..... | 48 |
| Tabla | 9 | Concentraciones de IgA en las heces de los ratones..... | 51 |
| Gráfico | 1 | Porcentaje de persistencia y UFC de ETEC en el ratón KO-1 de 7 semanas de edad..... | 38 |
| Gráfico | 2 | Porcentaje de persistencia y UFC de ETEC en el ratón KO-2 de 7 semanas de edad..... | 39 |
| Gráfico | 3 | Porcentaje de persistencia y UFC de ETEC en el ratón KO-3 de 7 semanas de edad..... | 40 |
| Gráfico | 4 | Porcentaje de persistencia y UFC de ETEC en el ratón KO-1 de 11 semanas de edad..... | 45 |
| Gráfico | 5 | Porcentaje de persistencia y UFC de ETEC en el ratón KO-2 de 11 semanas de edad..... | 46 |
| Gráfico | 6 | Porcentaje de persistencia y UFC de ETEC en el ratón KO-3 de 11 semanas de edad..... | 47 |
| Gráfico | 7 | Curva de calibración de la IgA..... | 51 |

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------|--|
| A | Adenina |
| AMPc | Adenosin monofosfato cíclico |
| ADP | Adenosin difosfato |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| C | Citosina |
| CD40L | Ligando de CD40 |
| CFA | Factores de colonización antigénicos |
| CFTR | Regulador de conductansa transmembranal de fibrosis quística |
| Cl⁻ | Ion cloruro |
| CST | Caldo soya tripticasa |
| Ctx | Toxina colérica |
| dATP | Desoxiadenil trifosfato |
| dCTP | Desoxicitocil trifosfato |
| dGTP | Desoxiguanosil trifosfato |
| DNA | Acido desoxirribonucleico |
| dNTP | Desoxirribonucleotidos trifosfato |
| dTTP | Desoxitimidil trifosfato |
| EAEC | <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa |
| EHEC | <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica |
| EIEC | <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva |
| ELISA | Inmunoensayo ligado a enzima (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) |
| EPEC | <i>Escherichia coli</i> enteropatogena |
| ETEC | <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica |
| FAE | Celulas epiteliales asociadas a folículos |
| g | Gramo |
| G | Guanina |
| GALT | Tejido linfoide asociado a intstino |
| GAPDH ó G3PDH | Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa |
| GC-C | Guanilato ciclase C |
| GM1 | Gangliosido 1 |
| GMPc | Guanosin monofosfato cíclico |
| h | Hora |
| IgA | Inmunoglobulina A |
| IgAs | Inmunoglobulina A secretora |
| INF | Interferón |
| Kb | Kilobases |
| KDa | Kilodaltones |
| KO | Knockout |
| LPS | Lipopolisacarido |

| | |
|-------------------------|--|
| LT | Enterótoxina termolábil |
| mA | Mili-amperes |
| mg | Miligramos |
| MgCl₂ | Cloruro de magnesio |
| ml | Mililitros |
| Milli Q | Agua desionizada |
| min | Minutos |
| mM | Milimolar |
| μl | Microlitro |
| μM | Micromolar |
| Na⁺ | Iones sodio |
| NaCl | Cloruro de sodio |
| NAD | Dinucleotido de nicotin amida |
| nm | Nanómetros |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OPS | Organización Panamericana de la Salud |
| pb | Pares de bases nitrogenadas |
| PBS | Solución amortiguadora de fosfatos (tampón fosfato salino) |
| PBS-T | Tween diluido en PBS |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| pH | Potencial de iones hidrógeno |
| plgR | Receptor de inmunoglobulina polimérica |
| PKA | Proteíncinasa A |
| PKG-II | Proteincinasa II dependiente de GMPc |
| PM | Peso molecular |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SDS | Dodecilsulfato sódico |
| ST | Enterótoxina termoestable |
| T | Timina |
| Taq | Termus acuaticus (Polimerasa) |
| TAE | Regulador Tris-acetato EDTA |
| TCR | Receptor de linfocitos T |
| TNF | Factor de necrosis tumoral |
| Tm | Temperatura media de alineamiento |
| TTE | 1,2-triclorotrifluoretano |
| UFC | Unidades formadoras de colonias |

RESUMEN

Las enfermedades diarreicas constituyen actualmente una importante causa de morbi-mortalidad tanto en México, como en otros países subdesarrollados a nivel mundial. Las *Escherichia coli* diarregénicas en su conjunto representan el grupo bacteriano mas importante causante de diarrea a nivel mundial, entre los cuales destaca por su frecuencia y gravedad las *E. coli* enterotoxigénica (ETEC). ETEC esta considerada la principal causa de la diarrea infantil durante el periodo de destete, así como de la llamada diarrea del viajero en adultos. Se estima que ETEC es responsable de aproximadamente 210 millones de episodios diarreicos y de 380,000 muertes al año en niños menores de 5 años de edad. ETEC es un patógeno específico de especie, es decir que las ETECs que infectan humano solo infectan a esta especie y no a otra. Es precisamente por esto que hasta el momento, se han estudiado escasamente los mecanismos de la respuesta inmune intestinal ante una infección con ETEC en humanos, la mayoría de los trabajos se han enfocado a la respuesta de anticuerpos (IgA) contra factores de colonización antigénica, lipopolisacáridos y contra la toxina LT, de este patógeno. La falta de un modelo animal de infección de ETEC aislada de humano representa una gran desventaja para el estudio de la patogénesis de la infección de ETEC y para el estudio de los mecanismos de la respuesta inmune (tanto innata como adquirida) del huésped ante una infección por esta bacteria. Por esta razón nuestro grupo de investigación desarrollo un modelo murino de infección y persistencia con una ETEC aislada de humanos (H10407) utilizando ratones KO del CD40L con fondo genético C57BL/6. El objetivo primordial de esta investigación experimental fue la reproducción y caracterización del modelo murino KO del CD40L descrito anteriormente. Los resultados fueron los siguientes: logramos reproducir el modelo murino de infección y persistencia de ETEC, inoculando a los ratones con una dosis de 1.5×10^8 . Se asoció que cuando las UFCs/g de ETEC en las heces a las 24 h eran $\geq 1 \times 10^6$ el ratón había recibido una dosis adecuada para poder ser colonizado y determinamos que las UFCs de ETEC/g de heces en los días subsecuentes que nos permitan lograr persistencias prolongadas oscilan alrededor de 10^5 . Observamos que la infección por ETEC después de un reto con esta bacteria se puede establecer por más de 5 meses y posteriormente puede ser eliminada de manera natural. Demostramos que los ratones knockout de la molécula CD40L presentan IgA en la mucosa intestinal así como un incremento en la concentración de la IgA intestinal 30 días post-reto comparado con la concentración de IgA antes de inocular a los ratones. La presencia de IgA en ratones que carecen totalmente de la molécula CD40L (indispensable para que se lleve a cabo el cambio de isotipo) nos indica

que la producción de IgA no depende totalmente de la interacción CD40-CD40L, sugiriendo que se trata de IgA proveniente de células B1 y no de linfocitos B2.

1.0 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas continúan siendo una importante causa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, principalmente en los países en vías de desarrollo, localizados en África, Asia y América Latina (Garrido, *et al.*, 1990). Aproximadamente 1.8 millones de personas mueren cada año debido a enfermedades diarreicas y un 90% de ellas son niños menores de 5 años, por lo general en países en vías de desarrollo (Organización Mundial de la Salud, 2004; Centros para el control y la Prevención de enfermedades y Organización Panamericana de la Salud, 2004). Además la mayoría de los niños que presentan numerosos episodios diarreicos quedan con algún grado de desnutrición, lo que los predispone a padecer con mayor frecuencia episodios de diarrea, que suelen ser más graves (Sepúlveda, *et al.*, 1998).

1.1 EPIDEMIOLOGÍA DE DIARREAS EN MÉXICO

En México, la mortalidad por diarrea por cada 100,000 niños menores de 5 años ha venido disminuyendo gradualmente en los últimos años; de 25.5 muertes en el 2002 a 24.9 en el año 2003, 24.0 en el 2004 y 23 defunciones para el 2005 (Indicadores de salud infantil, Secretaria de Salud, 2005 Quinto informe de gobierno). Sin embargo, a pesar de esta disminución el número de decesos aún es elevado, por ejemplo en el año 2002 se registraron 1,954 muertes por diarrea (Tercer Informe de Gobierno, 2003).

Es importante hacer notar que, la disminución en la tasa de mortalidad por diarrea, no se ha reflejado en una disminución en la tasa de morbilidad. Esto se puede deber tal vez, a que no se han mejorado las condiciones de vida de la población de bajos recursos económicos, puesto que es precisamente en esta población donde el número de episodios diarreicos en los infantes son mayores (Kosek, *et al.*, 2003). En el 2005 el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica de la Dirección General de Epidemiología (Secretaría de Salud) reporto un total de 4 765, 567 episodios de enfermedades infecciosas intestinales, esto significa que la tasa global (por cada 100 000 habitantes) es de 4 476.74, sin embargo las cifras en menores de 1 año

son realmente alarmantes llegando a tasas de 26 022.28 y de 14 257.84 en niños de 1-4 años. La Organización Panamericana de la Salud estimó que en México, mueren 2000 niños cada año a causa del a diarrea (OPS, 2004 Comunicado de prensa). Sin embargo se considera que el valor de morbilidad esta subestimado, ya que se ha reportado que en nuestro país ocurren anualmente cuatro episodios de diarrea por niño al año, esto significa que anualmente se presentan entre 30 y 40 millones de episodios diarreicos en la población infantil (Vega, 2002).

1.2 AGENTES ETIOLÓGICOS QUE CAUSAN DIARREA

En nuestro país la mayoría de los cuadros diarreicos son de naturaleza infecciosa, siendo los factores predisponentes más importantes aquellos de carácter sanitario, socioeconómico y cultural. Los agentes etiológicos de estas enfermedades pueden ser de origen viral, parasitario y/o bacteriano, globalmente estas últimas representan aproximadamente un 80% de los casos (Adachi, *et al*, 2000), en los periodos no epidémicos debidos a agentes particulares como ocurre anualmente con rotavirus (Gonzáles, *et al.*, 1997). Uno de los agentes bacterianos más importantes por la severidad y frecuencia de los casos son los grupos de *Escherichia coli* diarrogénicas (Tóme, *et al.*, 1996).

1.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli, es un bacilo corto, facultativo, Gram-negativo, que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. Esta bacteria es una habitante común de los animales de sangre caliente, incluyendo los humanos (Kaper & O'Briend, 1998), es predominante en la flora normal intestinal aerobia y anaerobia facultativa, la cual es eliminada por las heces hacia el exterior. Se puede encontrar en el medio ambiente ya que es capaz de sobrevivir durante cierto tiempo en el agua y los alimentos, de manera que su aislamiento es indicador de contaminación fecal reciente (Blanco, *et al.*, 1997).

Normalmente cumple una función importante en el cuerpo, suprimiendo el crecimiento de especies de bacterias dañinas así como también sintetizando cantidades apreciables de vitaminas (Gyles, 1994; Kaper & O'Briend, 1998). Sin embargo, algunas cepas de *E. coli* han adquirido factores de virulencia a través de mecanismos de transferencia horizontal, por lo que pueden causar daños a nivel de tracto urinario, meningitis o sepsis y daño gastrointestinal (Nataro & Kaper, 1998).

1.4 *Escherichia coli* DIARROGÉNICAS

Las cepas de *E. coli* que producen diarrea se han clasificado en 5 grupos con base en los mecanismos de patogenia que inducen, el cuadro clínico que producen y el tipo de interacción con la mucosa intestinal (Levine, 1987): Estos grupos son: ***E. coli* enterotoxigénica (ETEC)**, ***E. coli* enteroinvasiva (EIEC)**, ***E. coli* enteropatógena (EPEC)**, ***E. coli* enterohemorrágica (EHEC)** y ***E. coli* enteroagregativa** (Mühldorfer & Hacteer, 1994; Nataro & Kaper, 1998). Algunos autores proponen una sexta categoría llamada ***E. coli* de adherencia difusa (DAEC)** (Nataro & Kaper, 1998). En el presente trabajo estamos interesados en ETEC.

1.5 *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÉNICA (ETEC)

ETEC es el segundo grupo de *E. coli* que se asocio con diarrea a finales de la década de los 60's (Levine, 1987). En 1971 DuPont *et al*, demostraron por primera vez en voluntarios sanos, que las cepas de ETEC eran capaces de causar diarrea.

ETEC es una bacteria no invasiva que es especie-específica, es la principal causa de diarrea en infantes durante el periodo de destete en países en vía de desarrollo, la frecuencia de aislamiento de este patógeno en niños con diarrea es del 10 al 30% y es el principal agente etiológico de la llamada "diarrea del viajero" asociado a adultos (Levine, 1987; Nataro & Kaper, 1998). La enfermedad tiene un periodo de incubación de 14 a 50 h. El cuadro clínico se caracteriza por diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en pocos casos se presentan fiebre y vómito. La diarrea producida por ETEC puede ser leve, breve y autolimitada pero también puede ser grave (Eslava, *et al.*, 1994; Nataro & Kaper, 1998; Flores-Abuxapquí, *et al.*, 1994). Se estima que anualmente ETEC causa 210 millones de episodios de diarrea en niños menores de 5 años de edad, resultando en 380,000 muertes (OMS, 1999).

1.6 PATOGÉNESIS DE ETEC

El mecanismo de patogenicidad de ETEC una vez que se ha ingerido a través de agua y alimentos contaminados involucra 2 fases (DuPont, *et al.*, 1971): 1) Unión de los microorganismos a la mucosa del intestino delgado a través de los factores de colonización (CFA) u otras moléculas, permitiendo la colonización del microorganismo en el intestino (Fig. 1) (Nataro & Kaper, 1998). 2) Producción y liberación de sus enterotoxinas, que son responsables de la diarrea secretora característica de ETEC (Levine, *et al.*,

1987). Las cepas de ETEC pueden producir la toxina termolábil (LT) codificada por el gen *lt*; o la toxina termoestable (ST) codificada por el gen *st*, ó ambas (Gyles, *et al.*, 1974; Levine, *et al.*, 1987). Ambos genes están localizados en plásmidos transferibles que también pueden tener información genética para los CFA's, y algunos genes de ST se han encontrado en transposones (Cassels & Wolf, 1995; Mc Veigh, *et al.*, 2000). Aparentemente estos plásmidos se pueden perder con relativa facilidad, especialmente el asociado con ST (Olarde, 1985).

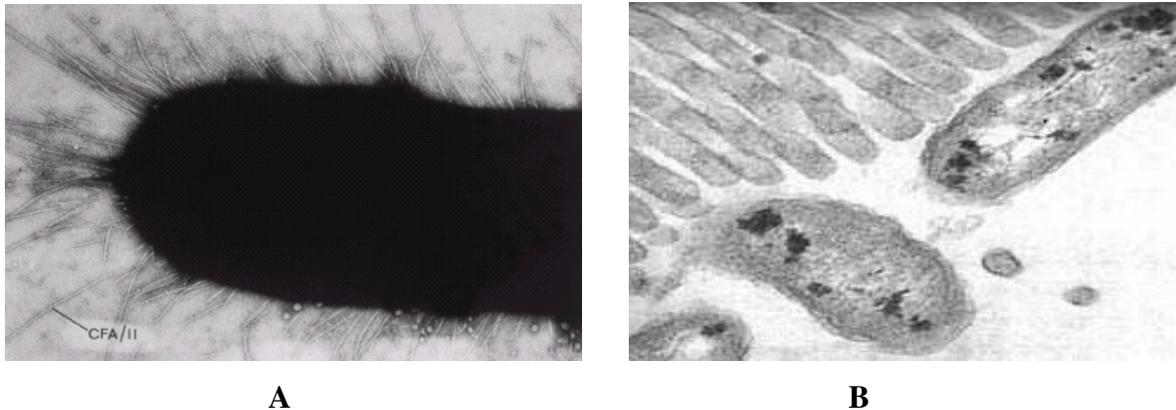


Figura 1. Acción patogénica de ETEC. En la figura A se aprecian los Factores de colonización antigénica (CFA's) típicos en la superficie de este organismo a modo de una capa vellosa capilariforme. La interacción de la bacteria con las microvellocidades de las células epiteliales del intestino delgado se puede apreciar en la figura B.

1.6.1 La enterotoxina termolábil (LT)

La toxina LT es similar en: estructura química, función y antigenicidad a la toxina producida por *Vibrio cholerae*, compartiendo un 80% de homología a nivel de nucleótidos (Spangler, 1992; Sixma, *et al.*, 1993). LT es una proteína oligomérica de elevado peso molecular (85 KDa) constituida por una unidad A y cinco subunidades B, las cuales están arregladas como un anillo pentamérico, dentro del cual se encuentra insertada la subunidad A (Figura 2). Esta conformación estructural es altamente resistente a las características del ambiente intestinal como son: a un pH bajo de 2, a la degradación por tripsina u otras proteolasas (Ruddock, *et al.*, 1995).

El pentámero que forma la subunidad B es precisamente la que tiene la capacidad de unirse al gangliosido GM1, un receptor de superficie celular, presente en la porción apical de las células del epitelio intestinal (Spangler, 1992). La subunidad A posee la actividad catalítica o enzimática, específicamente tiene actividad de ADP-ribosiltransferasa y actúa transfiriendo una unidad de ADP-ribosil del NAD a la subunidad alfa de la

proteína Gs unida a GTP, la cual a su vez estimula la enzima adenilato ciclasa de manera permanente, aumentando así los niveles intracelulares del AMP cíclico (AMPc). El AMPc dependiente de cinasa se activa, permitiendo la fosforilación de los canales de cloro localizados en la membrana apical de la célula epitelial. La fosforilación de los canales de cloro tiene como resultado la estimulación de la secreción de iones cloro de las células de las criptas hacia el lumen intestinal y la inhibición de la absorción de NaCl por las células de la punta de las vellosidades intestinales (Figura 3).

El incremento de estos iones en el lumen intestinal conlleva a la salida pasiva de agua de los enterocitos, produciendo una diarrea osmótica de tipo secretora (Evans, *et al.*, 1972).

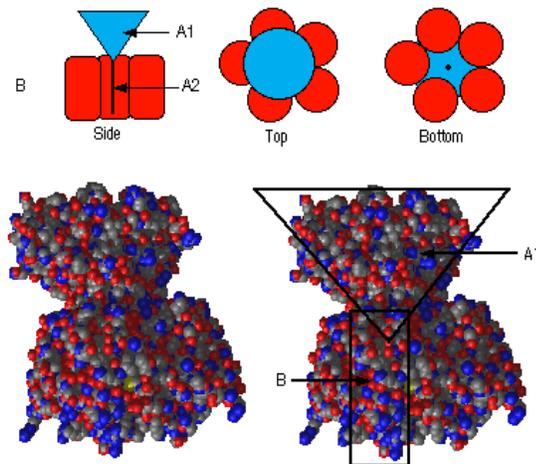


Figura 2. Estructura tridimensional cristalográfica de la toxina LT. La inserción de los componentes de la subunidad A (A1 y A2) dentro del anillo pentamérico conformado por las 5 subunidades B, constituyen una molécula altamente estable ante las agresiones del ambiente intestinal.

Cuando ETEC infecta al intestino, no secreta inmediatamente la toxina termolábil, pero es probablemente liberada después de la permeabilización de su membrana externa por las sales biliares y las proteínasas características del ambiente intestinal del hospedero (Hunt & Hardy, 1991). LT también puede ser liberada vía la producción de vesículas en la membrana exterior de este microorganismo patógeno (Horstman & Kuehn, 2000).

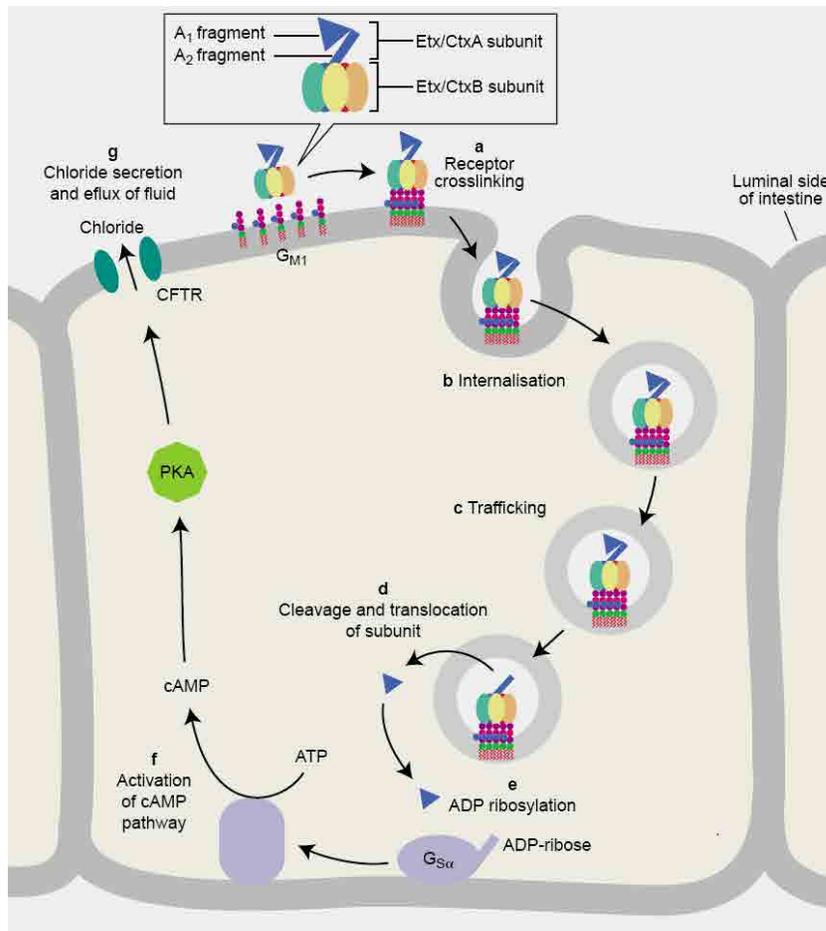


Figura 3. Mecanismo de intoxicación celular por la toxina termolábil. Su unión al receptor GM1, permite su ingreso y tránsito vía vesicular, el cual culmina con la escisión enzimática de la subunidad A1, la cual al entrar al citosol ejerce una ribosilación de adenosin difosfato (ADP) en la proteína G que activa simultáneamente a la enzima adenilato ciclasa que transforma ATP en cAMP, activando a una proteína quinasa A (PKA) por ribosilación. Esta enzima estimula al regulador transmembranal de fibrosis quística (CFTR) a abrir los canales de iones cloro, permitiendo su salida junto con gran cantidad de agua del citoplasma, características de la diarrea secretora. Tomado de Salmond & colaboradores, 2002.

1.6.2 La enterotoxina termoestable (ST)

La toxina termoestable es un pequeño polipéptido monomérico de aproximadamente 19.2 KDa, es resistente a una temperatura de 100° C, ya que estructuralmente contiene múltiples residuos de cisteína, algunos de los cuales se encuentran formando puentes disulfuro, haciendo a la toxina estable a temperaturas altas y a un pH de 1.0 (Kupersztoch, *et al.*, 1990). El principal receptor de la toxina ST es la guanilato ciclasa C (GC-C) un receptor en células intestinales (Carrithers, *et al.*, 1994).

Cuando ST se une a GC-C se incrementa los niveles del segundo mensajero, guanosin monofosfato cíclico (GMPc). Tanto las cinasas dependientes de GMPc (PKG-II) como del AMPc (PKA), activan los canales de cloro y HCO_3^- , por su interacción con el regulador transmembranal de fibrosis quística (CFRT) de los canales de cloro, permitiendo la estimulación de la secreción de iones cloro y la inhibición de la absorción del NaCl (figura 4). El incremento de estos iones en el lumen intestinal conlleva a la salida pasiva de agua y electrolitos de los enterocitos a través de la vía paracelular, produciendo la diarrea osmótica característica de ETEC (Blanco, *et al.*, 1997; Carrithers, 2003; Sears, *et al.*, 1996).

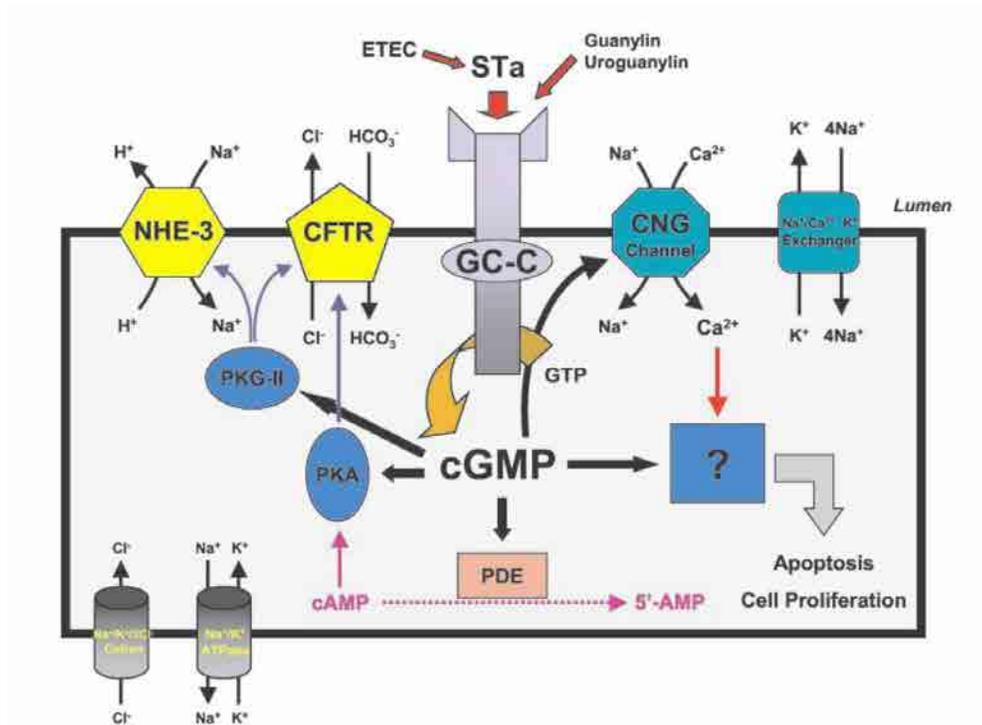


Figura 4. Principales rutas de señalización intracelular activadas por ST. La unión de la toxina termoestable con GC-C incrementa los niveles del segundo mensajero, cGMP, los cuales activan las cinasas PKG-II o PKA, que interactúan con los reguladores de los canales de iones Cl^- , HCO_3^- y Na^+ alterando las relaciones osmóticas normales y caracterizando la diarrea secretora provocada por ETEC. Tomado de Carrithers, 2003.

Varios estudios han mostrado que las moléculas que influyen en los niveles de nucleótidos cíclicos (cAMP y cGMP) tienen un efecto en la respuesta inmune; por lo tanto patógenos entéricos como ETEC puede interrumpir la homeostasis del microambiente del intestino (Wess & Petro, 1987).

1.7 INMUNIDAD INTESTINAL

El tracto gastrointestinal no es un órgano pasivo, sino que posee importantes funciones endocrinas, metabólicas, inmunológicas y de barrera junto a las de absorción de nutrientes agua y electrolitos; el epitelio intestinal interviene a través del transporte hidrosalino en otros procesos homeostáticos de gran importancia como la osmorregulación, el equilibrio hidrosalino, manutención de la concentración de potasio y regulación del volumen plasmático, además de poseer elementos de secreción que cooperan con la digestión de los alimentos y protección contra agentes infecciosos (Phillips, 1988; Walker, 1976).

1.7.1 Mecanismos de protección innata en el intestino

Los principales mecanismos de protección innata intestinal son: la acidez gástrica (pH de 2.0), la cual disminuye la carga bacteriana que llega al intestino delgado (Simon & Gorbach, 1982; DuPont, *et al.*, 1971) y de antígenos macromoleculares (Kraft, *et al.*, 1967), la peristalsis intestinal, la barrera de la mucosa intestinal y la flora normal que ecológicamente compite con los organismos patógenos por los nichos en el tracto intestinal.

1.7.2 La barrera de la mucosa intestinal

Los recubrimientos de las mucosas por glicoproteínas y glicolípidos tal vez inhiban el crecimiento de las bacterias intestinales o impidan su adherencia a la mucosa (Gorbach, 1971; Springer, 1970), puesto que se ha comprobado que los extractos de mucosa son capaces de bloquear los receptores de las bacterias y retrasar con ello la unión de estas a las superficies laminales (Freter, *et al.*, 1978). Además la producción local y la liberación de mucinas pueden generar una barrera selectiva a la penetración epitelial de enterotoxinas y otras moléculas biológicamente activas (Edwards, 1978). También es posible que las células caliciformes de la mucosa actúen conjuntamente con los mastocitos intestinales y los complejos antígeno-anticuerpo de la luz intestinal humana para liberar moco, lo que denota el sinergismo entre la utilización de antígenos inespecíficos y específicos por el intestino (Lake, *et al.*, 1980; Walker, 1978). Todos estos factores endógenos mencionados anteriormente contribuyen a mantener la integridad y las funciones de la mucosa intestinal, la cual forma un muro protector entre la luz intestinal y el resto del organismo (Phillips, 1988).

A pesar de todos estos mecanismos de protección innata, las superficies de la mucosa intestinal pueden ser susceptibles a infecciones por microorganismos que penetran el cuerpo a través de esta vía, ya que son

barreras delgadas y permeables por las actividades fisiológicas importantes que realizan (Janeway, *et al.*, 2003), además el intestino actúa como un portal de entrada de gran variedad de antígenos extraños en forma de alimentos. Como ya se ha mencionado, en situaciones normales la mucosa gastrointestinal ejerce una función de barrera para las bacterias y endotoxinas intraluminales, pero en determinadas circunstancias los patógenos bacterianos pueden alcanzar inicialmente los ganglios linfáticos mesentéricos e invadir los tejidos extraintestinales, constituyendo lo que se conoce como Translocación Bacteriana (Wells & Erlandsen, 1988). Para una efectiva protección contra patógenos intestinales se requiere tanto de una respuesta inmune en mucosas como sistémica. En mucosas, una de las principales líneas de defensa inmune, se encuentra en la mucosa intestinal, donde la inmunoglobulina A (IgA) es continuamente producida en defensa de las bacterias comensales y de los antígenos de la dieta; así mismo se produce IgA específica contra los cambios antigénicos en la flora intestinal y en contra de los patógenos (o de alguno de sus componentes como fimbrias, toxinas, etc.) (Mazanec, *et al.*, 1993; Carlson & Hanson, 1994).

1.7.3 Importancia de la Inmunoglobulina A secretora (IgAs) en la defensa intestinal.

La IgAs es considerada como primera línea de defensa contra patógenos que colonizan e invaden las superficies que se encuentran cubiertas por secreciones. Es ampliamente conocido que la IgAs juega un papel muy importante en la protección contra infecciones causadas por enteropatógenos y virus tanto en humanos como en otros animales (Michetti, *et al.*, 1992; Renegar, *et al.*, 2001).

1.7.3.1 Descripción estructural de la molécula de IgAs

La IgAs existe como una molécula polimérica compuesta de 2 o más monómeros de IgAs, el peso molecular de cada monómero es de 140 kDa y esta constituida por una cadena J que las une (15.6 kDa) y un componente secretor (70 kDa). Cada monómero de IgAs esta formado de 4 polipéptidos, dos cadenas pesadas α y dos cadenas ligeras κ ó λ unidas covalentemente por enlaces bisulfuro (Fig. 5). El componente secretor es una proteína altamente glicosilada producida por células epiteliales de la mucosa. Dicho componente secretor es de suma importancia porque estabiliza la estructura polimérica de la IgAs. La resistencia intrínseca de la IgAs a la proteólisis, es reforzada por la presencia del componente secretor y los oligosacáridos que porta, preservan las funciones biológicas de la molécula en las secreciones. La polivalencia de la IgAs (formación de dímeros y tetrámeros) aumenta su potencial para aglutinar a las

bacterias y neutralizar toxinas, enzimas y virus. La disminución de la habilidad de la IgAs para activar el complemento, opsonizar y fagocitar bacterias puede limitar las reacciones de la inflamación local y el daño al tejido mucoide (Kilian, *et al*; 1988). La IgA humana se divide en dos subclases; IgA1 e IgA2. Las cadenas pesadas de ambos tipos difieren solamente por 22 aminoácidos, tales diferencias estructurales le otorgan a la IgA2 resistencia a la acción de proteasas bacterianas que cortan específicamente a la IgA1 en la región de la bisagra. Estas proteasas que digieren a la IgA1 son producidas por varias bacterias patógenas de la mucosa y se piensa que interfieren con las propiedades protectoras de los anticuerpos IgAs (Marcotte & Lavoie, 1998).

La IgAs contiene oligosacáridos ligados tanto al grupo NH₂ del aminoácido asparagina, como al grupo OH de los aminoácidos serina treonina o lisina, conteniendo un total de 8.7% de carbohidratos, la mayoría de los cuales (63%) se encuentran unidos a la cadena pesada (Pierce-Cretel, *et al.*, 1981), estos oligosacáridos le confieren protección a la molécula de IgAs contra degradación por enzimas.

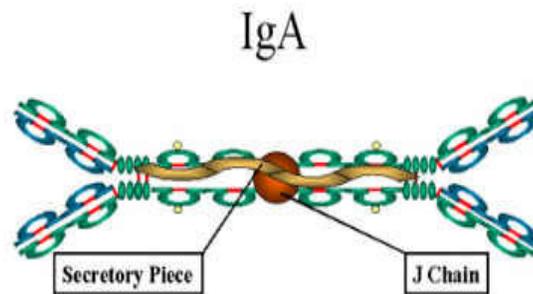


Fig. 5 Estructura dimérica de la IgA secretora en mucosas. El dímero formado por las moléculas de IgA es fuertemente estabilizado por una cadena J y un componente secretor, los cuales le otorgan estabilidad ante algunas proteasas sintetizadas por algunos tipos de bacterias patógenas.

1.7.3.2 Inducción de la respuesta de IgAs en el sistema inmune de mucosas

La mayor parte de los microorganismos cuando entran en contacto con las superficies de las mucosas del tracto gastrointestinal, estimulan la migración de linfocitos B precursores de IgAs sensibilizados con el antígeno desde el tejido linfoide asociado al intestino (GALT) (Mestecky, 1987). El GALT incluyendo numerosos nódulos linfoides solitarios denominados Placas de Peyer, son una fuente rica de células B (precuroras de IgA), que tienen el potencial de poblar distintos tejidos linfoides (figura 6).

Estos folículos linfoides están cubiertos por un epitelio especializado llamado “células epiteliales asociadas a folículos” (FAE) que contienen “células M” que toman y transportan antígenos desde el lumen intestinal al tejido linfóide que se encuentra por debajo. Después de la presentación de antígenos por las células efectoras, las células B precursoras de IgA y células T salen del GALT por los conductos linfáticos eferentes y alcanzan la sangre periférica a través del conducto torácico. Las células circulantes B y T migran entonces a la lámina propia del intestino, pulmones, tracto genitourinario y a las glándulas secretoras, donde son retenidas selectivamente (Mestecky, 1987).

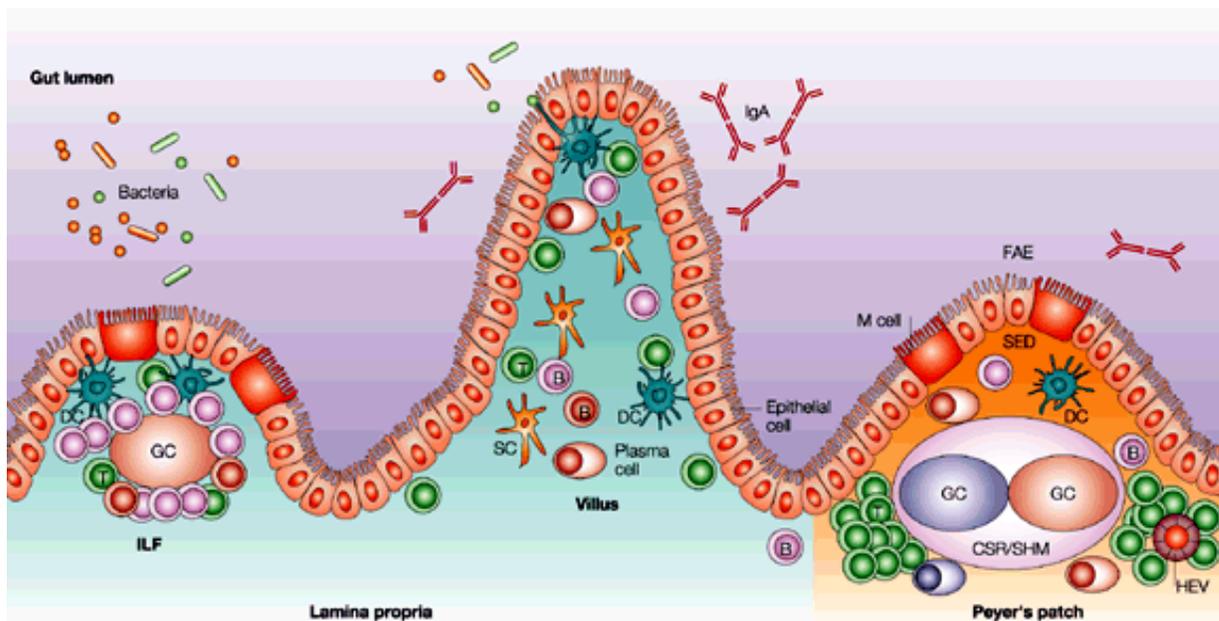


Figura 6. Tejido linfóide asociado al intestino. Representación esquemática del tejido linfóide asociado al intestino (GALT), con estructuras linfoides organizadas- Placas de Peyer y folículos linfoides aislados (ILFs)- y tejido difuso del epitelio y la lamina propia. Las Placas de Peyer y los ILFs están compuestos de un epitelio especializado asociado a folículo (FAE) que contiene células M, un domo subepitelial (SED) rico en células dendríticas (DCs), folículos de células B que contiene centros germinales (GCs), donde las células B foliculares eficientemente sufren el cambio de isotipo (CSR) e hipermutación somática (SHM). La migración de las células B dentro de la mucosa ocurre a través de las venúlas del endotelio alto (HEVs), localizadas en las regiones interfoliculares de las Placas de Peyer, las cuales contiene en su mayoría células T. Los tejidos difusos de la lamina propia (LP) contienen una gran cantidad de células plasmáticas productoras de inmunoglobulina A (IgA)⁺, células B y T, macrófagos, DCs y células estromales (SCs). Las DCs de la LP transportan antígenos del lumen y se los presentan directamente a las células B o T, lo cual puede inducir el cambio de isotipo a IgA y la diferenciación *in situ*. La IgA secretada es transportada a través del epitelio, donde sirve como primera línea de defensa en contra de patógenos y para el mantenimiento de la homeostasis en el intestino. Las células B productoras de IgA⁺ y las células plasmáticas están de color rojo, las células productoras de IgG⁺ en azul y las células IgM⁺ en rosa. Tomado de Fagarasan & Honjo, 2003.

En estos tejidos glandular y mucoso, las células B precursoras de IgAs se expanden clonalmente y maduran a células plasmáticas productoras de IgAs bajo la influencia de células T (Aldred, *et al.*, 1986). La IgAs

dimérica sintetizada en la lamina propia del intestino es secretada al espacio intersticial por la célula plasmática uniéndose al receptor de membrana poli-Ig (componente secretor) en la superficie basólateral de las células epiteliales. El complejo IgA-receptor se internaliza por endocitosis en la célula epitelial y es transportado a través del citoplasma del enterocito en vesículas a la superficie celular del lumen intestinal, evento llamado transcitosis (Fig. 7), en donde el dominio extracelular del componente secretor sufre proteólisis, es escindido enzimáticamente y deja los dominios transmembranales y citoplásmico unidos a la célula epitelial, liberando así la porción extracelular del receptor todavía unida a la región Fc de la IgA dimérica (Marcotte & Lavoie, 1998; Janeway, *et al.*, 2003).

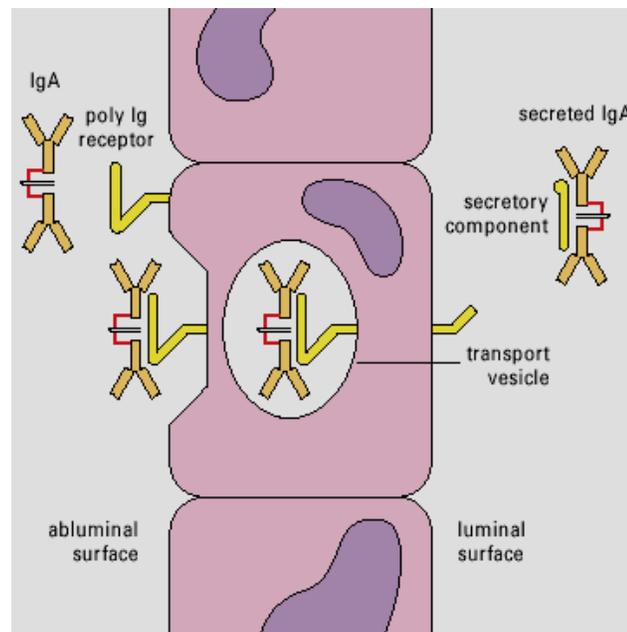


Figura 7. Transporte de la IgAs a través del epitelio de las mucosas. En el esquema se aprecia el mecanismo de transporte de la IgAs conocido como **transcitosis**. La IgA dimérica sintetizada en la lámina propia se une a un receptor poli-Ig en la superficie basólateral de la célula epitelial y es endocitado por vesículas y transportado a la superficie apical de la célula, donde estas vesículas se fusionan con la membrana plasmática, en la superficie apical el receptor poli-Ig es fragmentado para dejar el componente extracelular de unión a IgA unido a la molécula de anticuerpo (componente secretor). La parte residual del receptor poli-Ig no es funcional y se degrada. La IgA dimérica es protegida de las enzimas proteolíticas en el lumen intestinal por la presencia de este componente secretor. Mediante este mecanismo la IgA se transporta a través de los epitelios al lumen de varios órganos que están en contacto con el ambiente externo. Tomado de Roit et al, 1990.

Lo descrito anteriormente es llevado a cabo por linfocitos B2, sin embargo existen diferentes poblaciones de linfocitos B maduros con capacidad para producir anticuerpos (Hardy, *et al.*, 2001). Como ya se ha mencionado, durante el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa se producen estos anticuerpos

efectores de alta afinidad específicos para el patógeno o el inmunógeno, resultado de la interacción entre las células B y células T cooperadoras (Carsetti, *et al.*, 2004), esta respuesta precisa pero lenta, denominada timo dependiente (T-dependiente) involucra generalmente a células B2 (Fagarasan & Honjo., 2000). No obstante, anticuerpos ya presentes en el suero denominados anticuerpos naturales que contribuyen a la primera línea de defensa contra los agentes infecciosos extracelulares son producidos de manera T-independiente por una población particular de linfocitos B, denominados B1 (Carsetti, *et al.*, 2004).

1.7.3.3 Linfocitos B

En los organismos adultos, la población de células B *naïve* esta constituida por las células foliculares (BFO): localizadas en el bazo y los nódulos linfoides, las células de zona marginal (BZM) que se encuentran enriquecidas en la zona marginal del bazo y las células B1 que predominan en las cavidades pleural y peritoneal. En el bazo, de un 80 al 90 % de las células B son BFO y del 5 al 10 % son células BZM.

1.7.3.3.1 Células B foliculares

Las células BFO se denominan también convencionales o B2 y son la subpoblación de células B más abundante en el organismo, se originan a partir de precursores localizados en la médula ósea y una vez que han alcanzado la madurez se localizan en los folículos linfoides del bazo y los nódulos linfáticos, donde en ausencia de estimulación antigénica viven aproximadamente 130 días (Hao & Rajewsky, 2001). Se sabe que son las células que participan en los eventos del centro germinal (CG) y en consecuencia, pueden diferenciarse a células de memoria, generar células plasmáticas con alta afinidad hacia el antígeno y llevar a cabo cambio de isotipo de inmunoglobulinas preferencialmente hacia IgG, IgA e IgE.

1.7.3.3.2 Células B de zona marginal

Las BZM, a diferencia de las foliculares, no recirculan en la sangre y los folículos linfoides, en cambio se localizan en el bazo, en el límite de la pulpa blanca y el seno marginal, en estrecha vecindad con dos poblaciones de macrófagos restringidos también a esta área: los macrófagos metalofílicos y los macrófagos de zona marginal. Aun cuando se ha reportado que existen progenitores fetales para las células B de zona marginal (Hao & Rajewsky, 2001), ésta se deriva básicamente de progenitores localizados en la médula ósea, por lo que al nacimiento aun no se encuentra organizada y no es plenamente funcional sino hasta los dos años de edad en los humanos (Spencer, *et al.*, 1998) o a la segunda semana de vida en el ratón (Martín & Kearney., 2002).

Al parecer, la principal función de las BZM es la de funcionar como una primera línea de defensa contra antígenos particulados (Martín, *et al.*, 2001), ya que la zona marginal se encuentra enriquecida en clonas específicas contra antígenos timo-independientes, del tipo presente en la pared celular bacteriana y tras la estimulación antigénica, estas células se diferencian rápidamente a células plasmáticas, además, las BZM capturan, procesan y presentan antígenos más rápida y eficientemente que las células B foliculares (Oliver, *et al.*, 1999).

1.7.3.3.3 Células B1

Estas células son producidas a partir de progenitores enriquecidos durante la linfopoyesis fetal (Hayakawa & Hardy., 2000), por lo que son la subpoblación predominante en los fetos y neonatos, pero una vez que el organismo es adulto solo constituyen una pequeña fracción de las células B, que se encuentran confinadas básicamente a la cavidad pleural y peritoneal, donde mantienen números constantes debido a su capacidad de autorregeneración (Herzenberg 2000).

Las células B1 tienen BCRs de baja afinidad y polirreactivos, que unen antígenos bacterianos (fosforilcolina, varios polisacáridos) y endógenos (fosfatidilcolina, DNA), por lo que por un lado forman parte de la primera línea de defensa del organismo en conjunto con las células B de ZM y por otro se les relaciona con fenómenos auto inmunes (Murakami and Honjo 1995).

Aun cuando las células B1 constituyen un bajo porcentaje de las células B del organismo adulto, producen una gran cantidad de las inmunoglobulinas del organismo ya que secretan los anticuerpos naturales del

suero (los anticuerpos que aparecen sin evidencia de inmunización previa. Y son las células precursoras de las células plasmáticas productoras de IgA de la lámina propia intestinal (Murakami and Honjo 1995).

Dentro de las células B1 se distinguen 2 subpoblaciones: linfocitos B1 a que expresan el marcador pan-T y CD5, y los linfocitos B1b que no expresan estos marcadores (Hardy & Hayakawa, 1994; Kantor & Herzenberg, 1993).

En el ratón adulto, los linfocitos B1 se restringen a la cavidad peritoneal, aunque existe una pequeña proporción de estas células en el bazo (Kroese, *et al.*, 1992). Los linfocitos B1 de cavidad peritoneal expresan en forma constitutiva el factor de transcripción STAT-3 fosforilado, mientras que las células B2 y B1 de bazo solo lo expresan cuando se activan (Fischer, *et al.*, 2001). La IL-10 secretada por los propios linfocitos B1 peritoneales, participa en la retención de los mismos en esta cavidad. Se ha visto que moléculas como CXCL-12 (SDF-1) como la IL-10 contribuyen de manera sinérgica al mantenimiento del compartimiento de linfocitos B peritoneales, y particularmente de la subpoblación B1a (Ishida, *et al.*, 1992; Foussat, *et al.*, 2001; Nisitani, *et al.*, 1995; Ishida, *et al.*, 1994).

1.7.3.4 Intervención protectora de la IgAs a diferentes niveles

Algunos estudios sobre la importancia funcional de la IgAs han demostrado que una vez sintetizada, la acción de esta inmunoglobulina esta relacionada de manera esencial con la inmunidad de las mucosas en donde puede actuar a diferentes niveles: evitando la penetración de los antígenos en la pared del intestino, neutralizando la actividad de algunos virus (Renegar & Small, 1991), y/o toxinas (Lycke y col, 1987; Lycke, *et al.*, 1999) dentro de las células epiteliales o fuera de ellas, esto es, intraluminalmente o durante el transporte vía receptor de inmunoglobulina polimérica (plgR) (Burns, *et al.*, 1996). Se presume que este tipo de respuestas locales son las más efectivas para la protección intestinal (Edfors, *et al.*, 1985), pero no son fáciles de medir. A pesar de la complejidad de los factores de defensa que se describieron anteriormente, cuando los microorganismos patógenos superan y prevalecen ante las barreras defensivas no específicas a nivel local (intestinal), se requiere de la activación de mecanismos de la inmunidad específica.

1.8 INMUNIDAD INNATA Y ADAPTATIVA

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa contra la infección, esta inmunidad filogenéticamente es primitiva, por lo que la comparten vegetales y animales (invertebrados y vertebrados, incluyendo mamíferos). Es mediada por monocitos, macrófagos y células dendríticas. Se caracteriza por ser una respuesta rápida, actúa directamente sobre el patógeno sin necesidad de selección o maduración celular, y no tiene memoria. En cambio la respuesta inmune adaptativa ó específica se caracteriza por la selección clonal de linfocitos antígeno-específicos, es tardía, tiene memoria, es de protección prolongada y exclusivamente se presenta en los animales vertebrados (Janeway, 1992; Medzhitov & Janeway, 2000; Fearon & Locksley, 1996).

La función de la inmunidad innata es el reconocimiento de constituyentes microbianos, lo que desencadena una respuesta celular caracterizada por la activación de neutrófilos, células endoteliales, monocitos-macrófagos y la síntesis de citocinas proinflamatorias, lo que tiene como finalidad el control de la infección (Beutler & Poltorak, 2000; Janeway & Medzhitov, 1998).

Muchas de las bacterias que se consideran de mayor importancia en las enfermedades infecciosas humanas, se multiplican en los espacios intra e intercelulares del cuerpo, la respuesta inmunitaria humoral puede resultar en la destrucción de estos microorganismos, y al mismo tiempo previene la propagación de infecciones intracelulares (Janeway, *et al.*, 2000).

Este mecanismo se lleva a cabo por la activación de los linfocitos B y su diferenciación a células secretoras de anticuerpos, que es inducida por el antígeno y requiere la ayuda de células CD4_{T_H-2} (ó células cooperadoras). Estas últimas también controlan el cambio de isotipo y desempeñan un papel importante en la iniciación de la hipermutación somática de los genes de las regiones variables de los anticuerpos, de este modo dirigen la maduración de la afinidad de estos, que se producen durante el curso de una respuesta inmunitaria humoral. Las células CD4_{T_H-2} activan a las células B cuando reconocen en la superficie de las mismas el complejo peptídico MHC II (proteínas del complejo principal de histocompatibilidad de clase dos), esto mediante los receptores de células T (TCR).

Esta unión provoca que las CD4_{T_H-2} sinteticen moléculas efectoras solubles y moléculas ancladas a la membrana, que sinergizan la activación de las células B. Una molécula efectora particularmente importante y con un papel en la dirección de todas las fases de la respuesta de células B es el ligando de CD40 (CD40L) expresado en la superficie de las células T, que se une a la molécula CD40 en la superficie de las células B (Janeway, *et al.*, 2000).

1.9 LA MOLÉCULA CD40L Y SU IMPORTANCIA EN LA RESPUESTA INMUNE

El ligando de CD40 (CD154, gp39 o *TNFSF5*) es una glicoproteína integral de membrana de 32 a 39 kDa, perteneciente a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) cuyo gen esta ubicado en el brazo largo del cromosoma X humano (Aruffo *et al.*, 1993). Es expresado predominantemente en linfocitos CD4_{T_H}-2 activados, pero también se ha reportado su expresión en células TCD8, eosinófilos, mastocitos, basófilos, células NK y células dendríticas (Dallman, *et al.*, 2003; Mackey & Noelle, 1998).

Las interacciones CD40/CD40L son claves en la regulación de numerosos procesos de activación del sistema inmune, la expresión de estas en diversos tejidos así lo confirma. En la inmunidad humoral la interacción de estas moléculas es importante en la respuesta inmune primaria y secundaria a los antígenos timo-dependientes, así como en la generación de células B de memoria y en la generación y mantenimiento de los centros germinales (Foy, *et al.*, 1996; Grewal & Flavell, 1998).

La importancia del CD40L fue reportada por su importante papel en la intercomunicación dinámica entre linfocitos B y T, así como en la activación de macrófagos (Campbell, *et al.*, 1996). La ligación de CD40 en las células B promueve su crecimiento y cambio de isotipo, mientras que en los macrófagos induce la secreción de TNF- α y hace que se vuelvan receptivos a concentraciones mucho mas bajas de INF- γ . Se ha observado que cuando se detecta un defecto en el brazo largo del cromosoma X en la región que codifica para CD40L, se limita su actividad y se producen deficiencias en la respuesta ante antígenos timo-dependientes, en la formación de centros germinales y sobretodo en el cambio de isotipo de inmunoglobulinas (IgM – IgG1 – IgG2 – IgE – IgA) causando el síndrome de hiperinmunoglobulinemia M, ya que los linfocitos B en esta patología no son capaces de cambiar de isotipo, por ende incrementandose las concentraciones excedentes de IgM (Buckley, 1999). La ausencia o baja expresión de CD40L también se le ha relacionado con eventos de respuesta inflamatoria temprana, así como en la activación de células presentadoras de antígenos y en la resistencia a las infecciones (Grewal, *et al.*, 1997).

Sin embargo se desconoce por completo el papel de CD40-CD40L en la respuesta inmune innata, la cual consideramos que en el modelo murino que describimos a continuación es la que juega un papel importante.

2.0 ANTECEDENTES

2.1 RESPUESTA INMUNE CONTRA ETEC

La mayoría de los estudios de la respuesta inmune contra ETEC se han abocado a dilucidar la respuesta inmune sistémica, ya que es más fácil de evaluar. Algunos estudios han evaluado la presencia de la IgAs específica contra determinados antígenos de ETEC, en secreciones como calostro, saliva, lavados intestinales y heces (Stoll, *et al.*, 1986; Estrada-García, *et al.*, 1999). Gracias a estos estudios ha sido posible determinar, al menos algunos de los principales antígenos de estas cepas bacterianas contra los que el huésped responde. Por lo que parece ser que para el caso de ETEC, las repuestas se dirigen principalmente contra su toxina termolábil (LT), los factores de colonización (CFA) y lipopolisacaridos (LPS). Se ha demostrado que algunos antígenos son responsables de la patogénia de estas bacterias y precisamente son los que confieren las características distintivas de este grupo. También se ha demostrado que no hay correlación entre las células secretoras de IgA en sangre periférica y las de duodeno en individuos vacunados (Generas, *et al.*, 1999), poniendo una vez más en evidencia las diferencias entre la respuesta inmune sistémica y local.

Torres-Medina *et al.*, 1984 observaron que la infección por ETEC en becerros gnotobióticos conlleva a un daño necrótico sobre el epitelio asociado al folículo, siendo el único estudio en donde se reporta la presencia de bacterias libres o fagocitadas dentro del domo de los centros germinales de los ganglios linfáticos. Años más tarde, en 1987 Wess & Petro, evaluaron la modulación de inmunoglobulinas que ejercían las placas de Péyer en las cepas C57BL/6 y DBA/2, donde se les infectó con ETEC, los datos que ellos recabaron sugerían que esta bacteria puede inhibir la respuesta inmune de IgA desarrollada en el tejido linfoide intestinal a través de efectos inmunofarmacológicos ocasionados por la enterotoxina termolábil (LT). Estos estudios parecen indicar que este microorganismo entérico no-invasivo puede modular o alterar funciones locales importantes del sistema inmune intestinal, ya sea directamente o a través de algunos de sus productos.

2.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de la importancia epidemiológica de ETEC en el mundo y en nuestro país, aún se desconocen los mecanismos de la respuesta inmune innata y adaptativa que se induce contra este patógeno in vivo e in situ, que permiten o que impiden la infección. Tampoco se conocen cuales son los antígenos bacterianos - además de los CFA's- que son responsables de inducir respuestas protectoras. Esto es debido a la falta de modelos animales con ETEC específica de humanos. En nuestro laboratorio en el 2005, Thompson desarrollo un modelo de infección y persistencia de ETEC H10407 (LT⁺, ST⁺, CFA/I), utilizando la cepa murina C57BL/6J-Tnfsf5^{tm1Imx} KOCD40L, en el cual se inocularon machos de 7 semanas de edad, con una dosis de 1×10^8 unidades formadoras de colonias, logrando una persistencia de al menos 15 días (día en que se sacrificaron), mientras que otras cepas murinas (Balb-C y C57BL/6) inoculadas no fueron permisivas para la infección. Sin embargo no se estableció el tiempo en el cual los ratones KO del CD40L eliminan a la bacteria de manera natural. Dado que la interacción CD40-CD40L es importante para el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas y la IgA de mucosas es uno de los primeros mecanismos de defensa consideramos importante determinar si estos ratones KO CD40L tienen IgA en heces.

3.0 JUSTIFICACIÓN

El desarrollo del modelo murino C57BL/6J-Tnfsf5^{tm1lmx} (KOCD40L) de ETEC permitirá el estudio de los mecanismos locales de la respuesta inmune innata y adaptativa que se induce contra el patógeno in vivo e in situ, que permiten o impiden la infección; así como los antígenos bacterianos que son responsables de inducir respuesta protectora. Por lo que es importante caracterizar adecuadamente dicho modelo.

4.0 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar el modelo murino C57BL/6J-Tnfsf5^{tm1lmx} KOCD40L de infección y persistencia de un aislado clínico de ETEC H 10407 (LT+, ST+, CFA/I) y determinar la presencia de IgA intestinal.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Caracterizar el modelo murino de infección y persistencia de ETEC H10407 en el tracto gastrointestinal:

- a) Genotipificar la cepa murina empleada en el experimento.
- b) Corroborar la dosis de inoculación óptima, para asegurar una persistencia mayor a 4 días.
- c) Determinar el porcentaje de persistencia de la bacteria por unidad de tiempo en el intestino del ratón.
- d) Determinar las UFC de ETEC /g de heces necesarias para mantener la persistencia de la bacteria en el tracto intestinal del ratón.

2.- Determinar cualitativa y cuantitativamente la IgA total en heces.

5.0 MATERIAL Y METODO

5.1 DESCRIPCIÓN DE LAS CEPAS MURINAS

5.1.1 Características inmunológicas de los ratones experimentales C57BL/6

Los ratones C57BL/6 por sus características y diversidad de usos son una excelente herramienta en investigación, siendo una de las doce cepas más empleadas entre más de 300 cepas consanguíneas registradas (Festing, 1985). Diversas líneas de investigación como la neurobiología, embriología, inmunología o la genética utilizan esta cepa, ya que es sencillo inducir o detectar mutaciones espontáneas, lo que conlleva a la producción de cepas carentes de uno o varios genes a partir de poblaciones de C57BL/6 (Festing, 1998).

Respecto a su respuesta inmunológica, esta parece estar más polarizada hacia una respuesta tipo Th-1, debido al patrón de interleucinas como son INF- γ , IL-2 y TNF- α activando algunos tipos celulares como macrófagos, eosinófilos, basófilos y células cebadas (Dong & Flavell, 2000). Estos ratones son el fondo genético de diversos ratones knockout (KO), incluyendo los ratones KOCD40L, que juegan un papel central en nuestro estudio.

5.1.2 La cepa C57BL/6J-Tnfsf5^{tm1lmx} (KOCD40L), como modelo idóneo de infección

La cepa de ratones C57BL/6 Knockout del ligando de CD40 (KOCD40L) ha sido utilizada ampliamente para analizar la respuesta inmune del hospedero al ser infectado con parásitos intracelulares. Esta cepa se ha utilizado como modelo de infección de bacterias como *Salmonella Dublin* (Marriott, *et al.*, 1999) y *Mycobacterium tuberculosis* (Campos-Neto, *et al.*, 1998); por hongos como *Histoplasma capsulatum* (Zhou & Seder, 1998) y parásitos como *Cryptosporidium parvum* (Cosyns, *et al.*, 1998) así como por diferentes especies del género *Leishmania* (Xu, *et al.*, 1994; Campbell, *et al.*, 1996; Soong, *et al.*, 1996; Padigel & Farrel, 2003).

5.2 CEPAS MURINAS UTILIZADAS

Se utilizaron 2 cepas de ratones la C57BL/6 y la cepa C57BL/6J-Tnfsf5^{tm1lmx} (KOCD40L). Se trabajó con ratones machos, de 7-11 semanas de edad. Ambas cepas fueron adquiridas en el bioterio del CINVESTAV, los C57BL/6 fueron crecidos en campana de flujo laminar, mientras que los C57BL/6J-Tnfsf5^{tm1lmx} crecieron en micro aisladores manteniéndose así libres de patógenos. Los pies de cría de ambas cepas fueron adquiridos en la empresa Jackson Mices. Durante toda la fase experimental los ratones fueron mantenidos en jaulas estériles con filtro.

5.3 GENOTIPIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE RATONES EXPERIMENTALES

Los ratones fueron previamente genotipificados, para ello se eligieron por ensayo y al azar 2 individuos de la cepa silvestre C57BL/6 y 2 C57BL/6J-Tnfsf5^{tm1lmx} (KOCD40L).

5.3.1 Extracción del DNA Murino

A cada ratón se le cortó con un bisturí quirúrgico un segmento pequeño de cola, aproximadamente 0.5 cm de longitud (al ratón se le colocó en un dispositivo adaptado de un tubo Falcon de 50 ml, para evitar el movimiento corporal dejando libre la región de la cola para la manipulación), y se colocó la muestra en un tubo para microcentrífuga (Eppendorf), para posteriormente procesar la muestra con un Kit de extracción de DNA (DNeasy® Tissue Kit (50), 69504. QIAGEN). Las muestras obtenidas de DNA se corrieron en un gel de agarosa (Pronadisa) al 2% y se colocó en una cámara de electroforesis (Horizon 58, Gibco Life Technologies) en regulador TAE 1X (Invitrogen), y se corrió a 80 V, 400 mA durante 60 minutos. Para revelar el gel se colocó en una charola con 100ml de agua destilada con 10 µl de bromuro de etidio (10µg/ml GIBCO) durante 15 min. Se observó en un transiluminador de luz ultravioleta y se tomó la fotografía con un equipo automatizado (Image Master VDS-Pharmacia Biotech).

5.3.2 Iniciadores seleccionados para genotipificación por PCR de las cepas murinas

Para amplificar el gen que codifica al ligando de CD40 se utilizaron los iniciadores reportados por By Blair, *et al.*, 2005. Para validar la integridad del DNA extraído y como control positivo del sistema se amplifico con el mismo programa de amplificación el gen constitutivo que codifica para la enzima glucosa-3-fosfato deshidrogenada (G3PDH) utilizando los iniciadores reportados por Ramos-Payan, *et al.*, 2003.

Tabla 1. Iniciadores seleccionados para la amplificación específica del gen CD40L y del gen constitutivo G3PDH

| Gen | Secuencia y Tm de los oligonucleotidos | pb |
|--------------|---|-----|
| <i>cd40l</i> | F: 5'-CCCAAGTGTATGAGCATGTGTGT-3' Tm = 60 °C | 250 |
| | R: 5'-GTTCCCTCCACCTAGTCATTACTC-3' Tm = 60 °C | |
| <i>g3pdh</i> | F: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC -3' Tm = 60 °C | 453 |
| | R: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGT -3' Tm = 60 °C | |

5.3.3 Mezcla de reacción para el ensayo de PCR

El volumen total de la reacción fue de 25 µl, 2µl de DNA murino y 23 µl de una mezcla de reacción con los elementos especificados en la tabla 2:

Tabla 2. Componentes de la mezcla de reacción para el ensayo de PCR para identificar los genes *CD40L* y *G3PDH*

| Cantidad | Reactivos y concentraciones finales en 25 µl |
|----------|---|
| 15.4 µl | Agua Milli Q (estéril y desionizada) |
| 2.5 µl | Regulador para PCR 10X (0.25x, Invitrogen) |
| 1.0 µl | MgCl ₂ (0.5 µM Invitrogen) |
| 2.0 µl | Pool con dATP, dCTP, dGTP y dTTP (concentración individual de 200 µM) |
| 0.1 µl | Taq DNA polimerasa (5 U/ µL) (0.5 u, Invitrogen) |
| 2.0 µl | Iniciadores* gen <i>CD40L</i> o <i>G3PDH</i> : (0.08 µM/ µl) o (8.0 µM/ µl) |

* Se utilizó el mismo protocolo en la mezcla de reacción tanto para el gen *CD40L* como para el gen *G3PDH*.

5.3.4 Programa de amplificación para identificar al gen que codifica para CD40L

Los tubos con la mezcla de reacción, fueron colocados en un termociclador (Icycler-BioRad) con el siguiente programa de amplificación (modificado de By Blair, *et al.*, 1994) : se calentaron a 94°C durante 5 min y posteriormente se sometieron a 35 ciclos (94°C/1 minuto, 60°C/30 s y 72°C/30 s) y por último se le dio una extensión final a 72°C durante 7 minutos.

5.3.5 Detección de los productos amplificados

Se tomaron 4 µl de cada producto de PCR amplificado, se homogenizaron con 1.5 µl de regulador de corrimiento y se colocaron en un gel de agarosa (GIBCO) al 2% y se colocó en una cámara de electroforesis (Horizon 58, Gibco Life Technologies) en regulador TAE 1X (Invitrogen), y se corrieron a 80 V, 400 mAmperes durante 60 minutos. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1 Kb plus (Invitrogen). Para revelar el gel se colocó en una charola con 100ml de agua destilada con 10 µl de bromuro de etidio (10µg/ml GIBCO) durante 15 min. Se observó en un transiluminador de luz ultravioleta y se tomó la fotografía con un equipo automatizado (Image Master VDS-Pharmacia Biotech).

5.4 REPRODUCCIÓN DEL MODELO DE INFECCIÓN Y PERSISTENCIA

5.4.1 Preparación del inóculo bacteriano

La cepa de referencia ETEC H 10407 (LT+, ST+, CFA/I), se sembró por el método de estría cruzada en una placa de agar MacConkey (BD-Bioxon) y se incubó a 37°C durante 18-24 h. Posteriormente se seleccionó una colonia. La mitad de la colonia se resuspendió en 5 ml de caldo soya tripticasa (Dibco) estéril y se incubó a 37°C durante 18-24h, sin agitación. La otra mitad de la colonia se colocó en 1 ml de agua MilliQ (agua desionizada por el método MilliQ) para realizar PCR con los iniciadores específicos para amplificar los genes que codifican para las toxinas LT y ST y así corroborar que efectivamente se está inoculando la cepa con los dos genes. Del cultivo de 24 horas, se homogenizó

y se tomó 1 ml de suspensión bacteriana y se inoculó en 50 ml de caldo soya tripticasa estéril. Se incubó aproximadamente por 4 horas a 37° C con agitación constante de 180 rpm en un agitador digital (Digital Shaker 4530 S/N 17415, Forma Scientific). Se colocó 1 ml de la suspensión bacteriana en tubos eppendorf (homogenizado previamente), se realizaron 3 lavados con solución salina estéril al 0.85%, resuspendiéndose finalmente en 1 ml de solución salina estéril al 0.85%. Se leyó un tubo al azar en el espectrofotómetro a 600nm para determinar la cantidad de concentración bacteriana y poder realizar los cálculos y diluciones necesarios y tener las UFC/50µl deseadas para inocular a cada ratón.

5.4.2 Inoculación de los ratones

A todos los ratones se les neutralizó el pH estomacal con 50µl de una solución de bicarbonato de sodio (Na_2HCO_3) al 0.35 M utilizando una jeringa de insulina y una sonda orogástrica; después de 10 minutos los ratones problema fueron inoculados por vía oral con una dosis de 10^8 UFC/50µl de ETEC en 50 µl de solución salina estéril al 0.85 % y a los controles se les administró 50 µl de solución salina estéril al mismo porcentaje. Los ratones fueron revisados a las 24 horas después de la inoculación y posteriormente tres veces por semana en los ensayos de persistencia y cada 24 horas en los ensayos de IgA intestinal.

5.5 DETERMINACIÓN DE LOS GENES DE PATOGENIA DE ETEC POR PCR MULTIPLEX EN LOS ENSAYOS DE PERSISTENCIA E IgA INTESTINAL

5.5.1 Muestreo de heces

En los ensayos de persistencia e IgA, a todos los ratones se les tomó una muestra de heces antes de inocularlos así como tres veces por semana en los ensayos de persistencia después de la inoculación y cada 24 horas en los ensayos de IgA intestinal. Para esto se colocaron individualmente a los ratones en cajas de plástico estériles hasta que los ratones lograron defecar al menos 0.1gramos. Para checar la persistencia se tomaron aproximadamente 0.02 gramos de heces con pinzas estériles, las cuales fueron colocadas en tubos Eppendorf (previamente pesados) con 1 ml de solución salina estéril. Los tubos fueron homogenizados por medio de agitación utilizando un vortex (Genie 2,

Scientific industries) aproximadamente 5 min. Se tomaron 100 µl de la suspensión para realizar diluciones seriadas de las muestras de (10⁻¹) y (10⁻²), de cada una de las muestras, sin diluir y de las diluciones, se tomaron 10 µl que se sembraron con espátula de vidrio en cajas de Petri con agar MacConkey. Las cajas se incubaron a 37°C por 24 h, entonces se contaron las colonias con morfología similar a *E. coli* y se determino con base a este conteo, la cantidad de bacterias por gramo de heces utilizando la ecuación siguiente:

$$\text{UFC/g} = \text{No. Colonias contadas (100) (Inverso de la dilución)}$$

5.5.2 Lisado bacteriano para obtener DNA

Con base en lo reportado por Murray et al., (1987) se seleccionaron 3 colonias al azar por placa para la obtención del DNA (en los diferentes tiempos de muestreo y así detectar la presencia de este patógeno en los ratones problema durante el experimento). Cada colonia seleccionada se resuspendió en 1 ml de agua milli-Q estéril, se homogenizó perfectamente utilizando un vortex, se hirvió el tubo durante 1 minuto para eliminar DNAsas, lisar las células y liberar el DNA, los tubos fueron colocados inmediatamente en hielo y guardados a -20°C para su posterior uso en la reacción de PCR.

5.5.3 Reacción de PCR múltiplex para identificar ETEC

5.5.3.1 Iniciadores seleccionados

Los iniciadores específicos utilizados, se basaron en lo reportado por los trabajos de Lang et al, 1994 y Stacy-Phipps et al, 1995, donde se amplificaron los genes de patogenia característicos de ETEC. Las secuencias de los iniciadores utilizados se describen en la tabla 3:

Tabla 3. Iniciadores seleccionados para la amplificación específica de los genes codificantes para las enterotoxinas características de ETEC.

| Gen | Secuencia y Tm | pb |
|-----|-------------------------------|----|
| | F: 5'-GGCGACAGATTATACCGTGC-3' | |

| | | |
|------------------|--|------------|
| <i>It</i> | Tm = 62 °C R: 5'-CGGTCTCTATATCCCTGTT-3' Tm = 57 °C | 450 |
| <i>st</i> | F: 5'-ATT TTT CTT TCT GTA TTTGTCTT-3' Tm = 62 °C R: 5'-CAC CCG GTA CAA GCA GGA TT-3' Tm = 56 °C | 190 |

5.5.3.2 Mezcla de reacción para la PCR múltiplex

El volumen total de la reacción fue de 25 µl, 2µl de DNA bacteriano y 23 µl de una mezcla de reacción con los elementos especificados en la tabla 4:

Tabla 4. Componentes de la mezcla de reacción para la PCR Múltiplex de ETEC

| Cantidad | Reactivos y concentraciones finales en 25 µl |
|----------|---|
| 13.4 µl | Agua Milli Q (esteril y desionizada) |
| 2.5 µl | Regulador para PCR 10X (0.25x, Invitrogen) |
| 1.0 µl | MgCl ₂ (0.5 µM Invitrogen) |
| 2.0 µl | Pool con dATP, dCTP, dGTP y dTTP (concentración individual de 200 µM) |
| 0.1 µl | Tac DNA polimerasa (5 U/ µL) (0.5 u, Invitrogen) |
| 2.0 µl | Iniciadores gen <i>st</i> * (concentración: 0.8 µM/ µl) |
| 2.0 µl | Iniciadores gen <i>It</i> * (Concentración: : 0.8 µM/ µl) |
| 2.0 µl | Suspensión con DNA bacteriano |

* Las concentraciones y el protocolo de PCR se basaron en el trabajo efectuado por López-Saucedo *et al* en el 2003.

5.5.3.3 Programa de amplificación para identificar los genes *It* y *st*

Los tubos con la mezcla de reacción fueron colocados en un termociclador (Icycler-BioRad) con el siguiente programa de amplificación: se calentaron a 50°C durante 2 min y a 95°C durante 5 min, posteriormente se sometieron a 40 ciclos (95°C/45 s, 50°C/45 s y 72°C/45 s) y por último se les dio una extensión final a 72°C durante 10 minutos (López-Saucedo, *et al.*, 2003). Para la detección de productos amplificados se utilizó el mismo protocolo descrito en el apartado 5.3.5.

5.6 EXTRACCIÓN DE LA IgA DE HECES

5.6.1 Recolección de heces

La colecta de heces se realizó como se mencionó anteriormente, sólo que la muestra fue colocada en un tubo falcón de 15 ml y guardada a una temperatura de 4 °C para su uso posterior.

5.6.2 Extracción de la IgA total de heces de ratón

Para la extracción de la IgA se adaptó la técnica reportada por Estrada-García *et al* (2002) para heces de humano a heces de ratón, por cada 0.2 g de muestra se le adicionó 1.8 ml de PBS 1X, se homogenizó perfectamente y se adicionó 5µl de aprotinina (Sigma-Aldrich) y 2 ml de 1,2-triclorotrifluoretano (TTE) (Riedel-deHaën-Sigma-Aldrich). La mezcla se homogenizó y centrifugó a 2800 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se alicuotó la fase acuosa, y se guardó a -20°C ó -70°C, hasta que fue utilizada.

5.7 DOT BLOT PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE LA IgA TOTAL

En una caja petrí con regulador Tris-glicina (25mM de Tris y 192mM de glicina a un pH de 8.3) se colocó una membrana de nitrocelulosa (0.45 micrómetros OSMONICS INC), se dejó en el regulador hasta su completa saturación. Posteriormente se colocó la membrana en el Manifold (Bio-Dot, Microfiltration Apparatus Bio-Rad) y se filtraron por vacío 50µl de cada uno de los extractos de IgA obtenidos de las heces de los ratones, al mismo tiempo que se filtraron 50 µl de los controles positivo IgA (purificada de ratón, Cappel ICN, Pharmaceuticals, Inc) y negativo IgM (purificada de ratón, Cappel ICN, Pharmaceuticals, Inc), ambos controles diluidos 1:2000 en PBS 1X. También en el sistema se filtraron solo PBS 1X y solución bloqueadora (Leche descremada Svelty al 2% y BSA al 0.1% en buffer de Tris-NaCl (50mM de Tris y 200mM de NaCl a pH 7.4) como controles del sistema.

Una vez filtrados los extractos, los pozos se lavaron por vacío tres veces con 50µl de buffer Tris-NaCl y posteriormente todos los pozos se bloquearon con 50 µl de la solución de bloqueo descrita con anterioridad, se dejó al vacío durante 1 hora a temperatura ambiente.

Se lavaron nuevamente todos los pozos 3 veces con 50µl de PBS 1X durante 5 minutos con agitación. A los pozos correspondientes se les adiciono 50µl del anticuerpo anti-IgA de ratón con bandera de biotina diluido 1:1000 en BSA al 5% con azida de sodio al 0.01% y se incubó por 2 horas con agitación y a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 3 lavados con 50µl de PBS1X/pozo, durante 5 minutos con agitación. Se adicionaron 50 µl de streptavidina (SAV) con peroxidasa (HRP), diluida 1:2000 en BSA al 5% con azida de sodio al 0.01%. Se incubó por 20 minutos con agitación a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron otros 3 lavados siguiendo el mismo método descrito con anterioridad, y se retiro la membrana de nitrocelulosa del Manifold y se colocó en una bolsa de plástico adaptada al tamaño de la membrana, se coloco enseguida a 4°C para posteriormente revelar la membrana.

5.7.1 Revelado de la membrana de nitrocelulosa

Para el revelado de la membrana se utilizó un kit de quimioluminencia (Santa Cruz Biotechnology) sensible a HRP. Este procedimiento se realizó en un cuarto oscuro con luz roja, se colocaron aproximadamente 200µl del reactivo A del kit, se homogenizó tratando de saturar completamente toda la membrana y posteriormente se aplicaron los otros 200µl complementarios del reactivo B, homogenizando nuevamente a toda la membrana, observándose inmediatamente la reacción fluorescente. La membrana se colocó en un cassette X-Omatic (Kodak) de revelado y sobre la membrana una placa fotográfica sensible a la fluorescencia verde (Kodak), enseguida se cerró el cassette de revelado, se manejaron diferentes tiempos de exposición, de aproximadamente 1, 5 y 15 minutos.

Después del tiempo de exposición se retiro la placa fotográfica y se colocó en solución de revelado (Kodak) hasta observar las muestras positivas, se enjuago dos veces en agua y se colocó en una solución fijadora (KodaK) durante 2 min, se enjuago 2 veces con agua y se dejo secando a temperatura ambiente.

5.8 ESTANDARIZACIÓN DEL ELISA PARA CUANTIFICAR IgA EN LAS HECES DE LOS RATONES

5.8.1 Curva de calibración de la concentración de la IgA de ratón y determinación de IgA en los extractos obtenidos de las heces

La curva de calibración se trabajó por triplicado. La concentración de la IgA de ratón comercial fue de 1 mg/ml, se hicieron los cálculos necesarios para tener 600 µl de una concentración de 0.83 µg/ml en regulador de bicarbonatos, se colocaron 200µl de esta solución en los pozos 2B, 2C y 2D de una microplaca de 96 pozos para ELISA (Corning incorporated costar 3590) . En los pozos del 3-11 de los carriles B, C y D se colocaron 100µl de buffer de bicarbonatos (tabla 5).

Posteriormente se tomaron 100µl del primer pozo y se diluyó 1:2 en los 100µl del buffer de bicarbonatos del pozo 3, continuando de esta manera se realizaron diluciones seriadas hasta el pozo 9. Los pozos 10 y 11 se dejaron como control (blanco de lectura). En la misma placa se colocaron 50 µl del regulador de bicarbonatos y 50 µl de cada uno de los extractos de IgA obtenidos de las heces de los ratones antes de inocular (tiempo cero) y de los extractos de las heces obtenidas 30 días post-reto (tabla 5). Como control negativo utilizamos IgM pura de ratón y BSA al 1% en PBS-Tween (0.5%). En los pozos de las orillas se colocó PBS 1X para evitar que se seque la placa durante los periodos de incubación. La placa se incubó toda la noche a 4°C para que se precipite el antígeno y se fije a la pared inferior del pozo. Se lavó 3 veces agregando 200µl por pozo de PBS-Tween (0.05%) y se decantó inmediatamente. Se bloqueó la placa con 150µl por pozo de BSA al 1% en PBS-Tween (0.5%) durante una hora incubándose a 37°C. Posteriormente fueron colocados 100µl por pozo del primer anticuerpo, anti-IgA biotinilado a una dilución de 1:1000 durante 1 hora a 37°C. Se realizaron 8 lavados con PBS-Tween (0.05%), como se ha descrito, y después a todos los pozos, se les colocó 50 µl de streptavidina peroxidada diluida 1:2000, incubándose 45 min a temperatura ambiente. Después de este tiempo de incubación, se lavó 10 veces con 200µl por pozo de PBS-Tween, se dejó la solución del último lavado en los pozos mientras se preparó la solución de revelado. Se tomaron 600 µl de regulador de citratos 10X y se adicionaron a 5400 µl de agua desionizada, 10mg de ortofenilendiamina y 50µl de H₂O₂. Se adicionaron 50µl de esta mezcla de reacción por pozo, y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente hasta observar el cambio de color (si después de 3 minutos el cambio de color en los problemas empieza a ser muy intenso y no se observa cambio de color en los controles o bien si hay cambio de color intenso en los controles, se debe parar la reacción

inmediatamente). La reacción se detuvo adicionando a cada pozo 30 µl de H₂SO₄ 2 N y se leyó en un espectrofotómetro a 490nm.

Tabla 5. ELISA para determinar la concentración de IgA en heces. Distribución de las diferentes concentraciones de IgA de la curva de calibración, de controles y de los extractos de heces en la microplaca de ELISA.

Curva de calibración de la IgA de ratón

| | µg/ml | | | | | | | | | | | |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Pozos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | PBS 1X |
| B | PBS 1X | 0.83 | 0.415 | 0.207 | 0.103 | 0.051 | 0.025 | 0.012 | 0.006 | B | B | PBS 1X |
| C | PBS 1X | 0.83 | 0.415 | 0.207 | 0.103 | 0.051 | 0.025 | 0.012 | 0.006 | B | B | PBS 1X |
| D | PBS 1X | 0.83 | 0.415 | 0.207 | 0.103 | 0.051 | 0.025 | 0.012 | 0.006 | B | B | PBS 1X |
| E | PBS 1X | C3 | P6 | P7 | P8 | C3 | P6 | P7 | P8 | IgM | BSA | PBS 1X |
| F | PBS 1X | C3 | P6 | P7 | P8 | C3 | P6 | P7 | P8 | IgM | BSA | PBS 1X |
| G | PBS 1X | C3 | P6 | P7 | P8 | C3 | P6 | P7 | P8 | IgM | BSA | PBS 1X |
| H | PBS 1X |

Extractos de IgA del T-0
Extractos de IgA del T-30

6.0 RESULTADOS

6.1 DEFINICIONES OPERACIONALES

Considerando la definición de infección propuesta por Madigan, *et al.*, en 1999, como el crecimiento de un organismo en un hospedero, y que dicho concepto no es sinónimo de enfermedad. Dado que los ratones KOCD40L no presentan crecimiento de microorganismos Gram (-) en agar Mac Conkey; se considero por lo tanto para este trabajo que la infección por ETEC es la presencia de este patógeno, en las heces de los animales inoculados, por un periodo ≥ 4 días.

6.2 GENOTIPIFICACIÓN DE LOS RATONES SILVESTRES C57BL/6 Y KOCD40L

De los fragmentos de cola obtenidos de ambas cepas de nuestros ratones se realizó la extracción del DNA total por el método descrito, y las muestras fueron corridas por electroforesis en un gel de agarosa al 2%. En la figura 8 podemos observar que el DNA obtenido esta integro y en buena cantidad.

Para identificar la presencia del gen que codifica para la proteína transmembranal CD40L, se realizo un ensayo de PCR con el DNA murino obtenido previamente. Se utilizaron iniciadores reportados por By Blair et al, 1994 y se modifico el programa de amplificación que reportan. Paralelamente con el mismo programa de amplificación se realizó otra reacción para amplificar el gen constitutivo codificante de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH o GAPDH), molécula que participa en la glucólisis), la cual nos sirve de control positivo tanto del sistema, como para corroborar la integridad del DNA extraído de las biopsias de los ratones, los iniciadores utilizados fueron tomados de Ramos-Payan, et al., 2003. Se obtuvieron los productos de amplificación reportados en la bibliografía (figura 9).

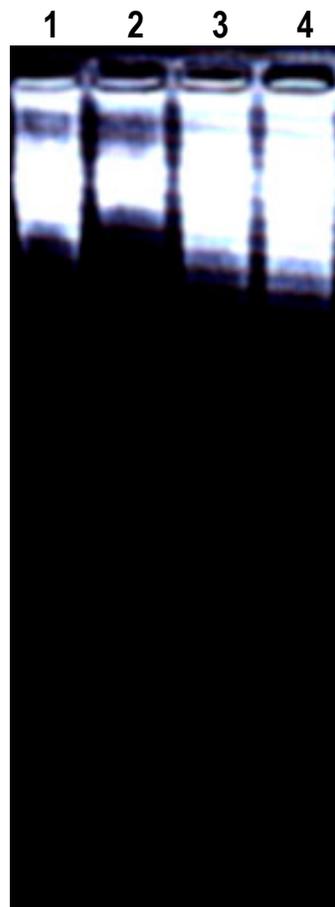


Figura 8. DNA total aislado de las cepas murinas para la genotipificación. Gel de agarosa al 2% con DNA extraído a partir de los fragmentos de las colas de los ratones experimentales. Carril 1y 2: Muestra de DNA total de ratón C57BL/6. Carril 3 y 4: DNA de ratón C57BL/6J-Tnfsf5^{tm1mx} (KOCD40L).

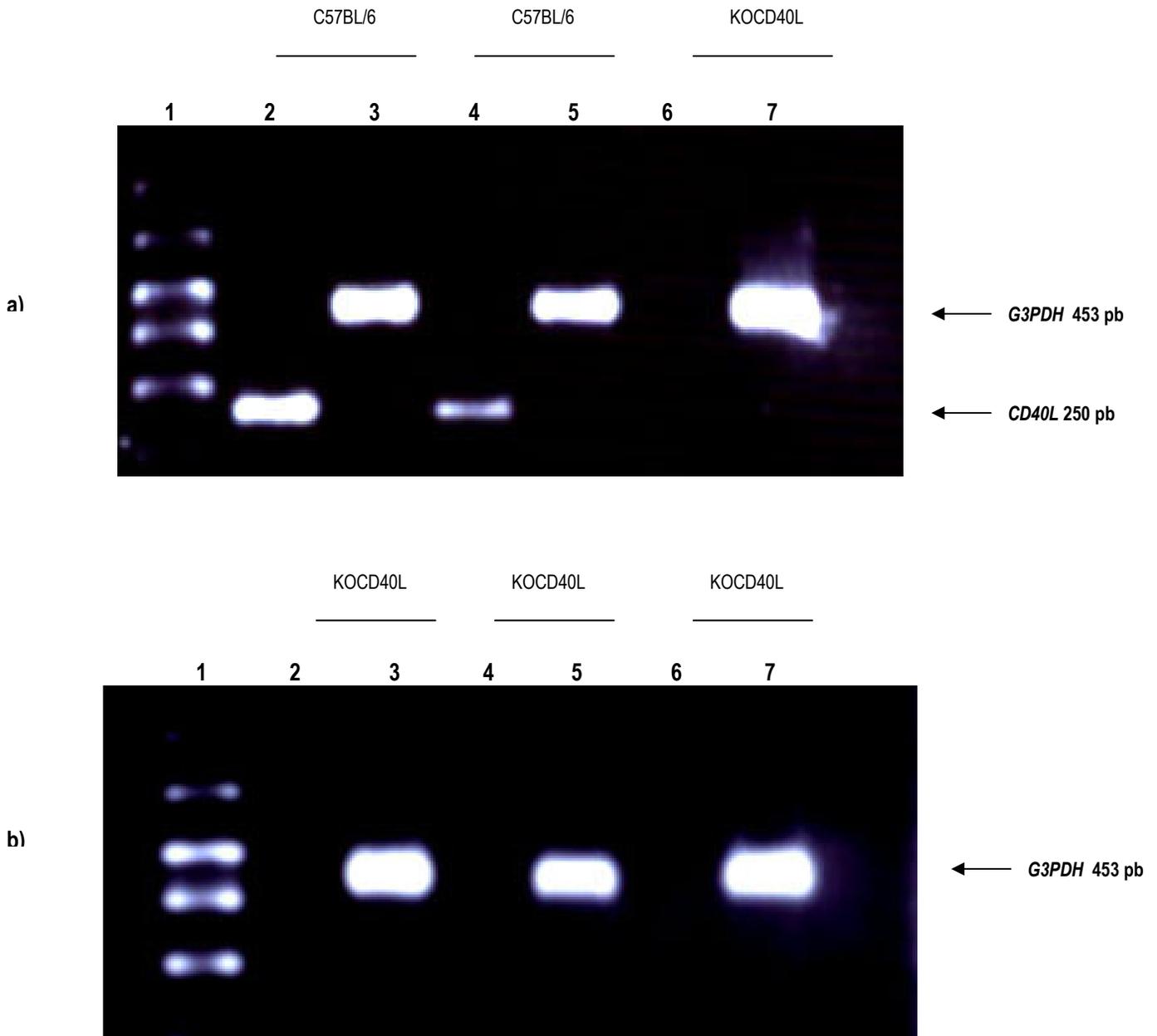


Figura 9. Productos de amplificación del gen *CD40L* y *G3PDH*. Geles de agarosa con los productos de amplificación por PCR tanto del gen *CD40L* (con un peso de 250 pb), como del gen constitutivo *G3PDH* (con un peso de 453 pb). **a)** Carril 1: marcador de peso molecular de 1 Kb plus. Carril 2 y 4: amplificación del gen codificante para el *CD40L* a partir del DNA del ratón C57BL/6. Carril 3 y 5: producto de amplificación del gen *G3PDH* a partir del DNA del ratón C57BL/6. Carril 6: ningún producto con los iniciadores específicos para el gen *CD40L*, a partir del DNA del ratón C57BL/6J-Tnfsf5^{tm1Imx} (KOCD40L). Carril 7: amplificación del gen *G3PDH* a partir del DNA total del ratón C57BL/6J-Tnfsf5^{tm1Imx} (KOCD40L). **b)** Gel de agarosa con los mismos productos de amplificación por PCR descritos en la figura anterior. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 Kb plus. Carril 2, 4 y 6: no hay amplificación del gen codificante para el *CD40L* a partir del DNA del ratón C57BL/6J-Tnfsf5^{tm1Imx} (KOCD40L). Carril 3, 5 y 7: producto de amplificación del gen *G3PDH* a partir del DNA del ratón C57BL/6J-Tnfsf5^{tm1Imx} (KOCD40L).

6.3 IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES *It* Y *st*

Para la identificación de los genes de patogenia de ETEC, se lisaron las colonias seleccionadas y se realizó un ensayo de PCR múltiplex para identificar los genes *It* y *st* basado en lo reportado por López-Saucedo, *et al.*, 2003; se obtuvieron los productos de amplificación para los genes de patogenia (Figura 10).

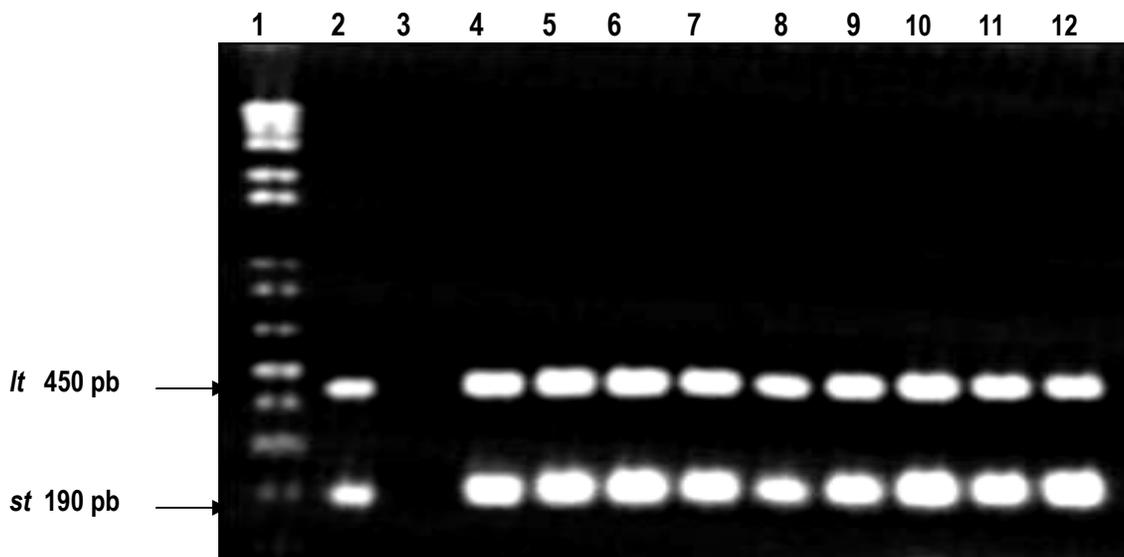


Figura 10. Productos de amplificación del gen *It* y *st*. Gel de agarosa al 2% con los productos de amplificación de los genes de patogenia de la cepa bacteriana (ETEC H10407 CFA/I LT⁺, ST⁺) que se empleó en el experimento para la reproducción del modelo de infección y persistencia de Thompson. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 Kb plus. Carril 2: Control (+). Productos de la cepa de referencia ETEC H10407, con sus dos productos de amplificación de 450 pb para *It* y 190 pb para *st*. Carril 3: Control negativo del sistema (mezcla de reacción sin DNA bacteriano). Carril 4 - 12: Productos de amplificación de las ETEC aisladas de heces de la cepa C57BL/6J-Tnfsf5^{tm1Imx} (KOCD40L).

6.4 PERSISTENCIA DE ETEC EN RATONES KOCD40L DE 7 SEMANAS DE EDAD CON UNA DOSIS BACTERIANA DE 1×10^8

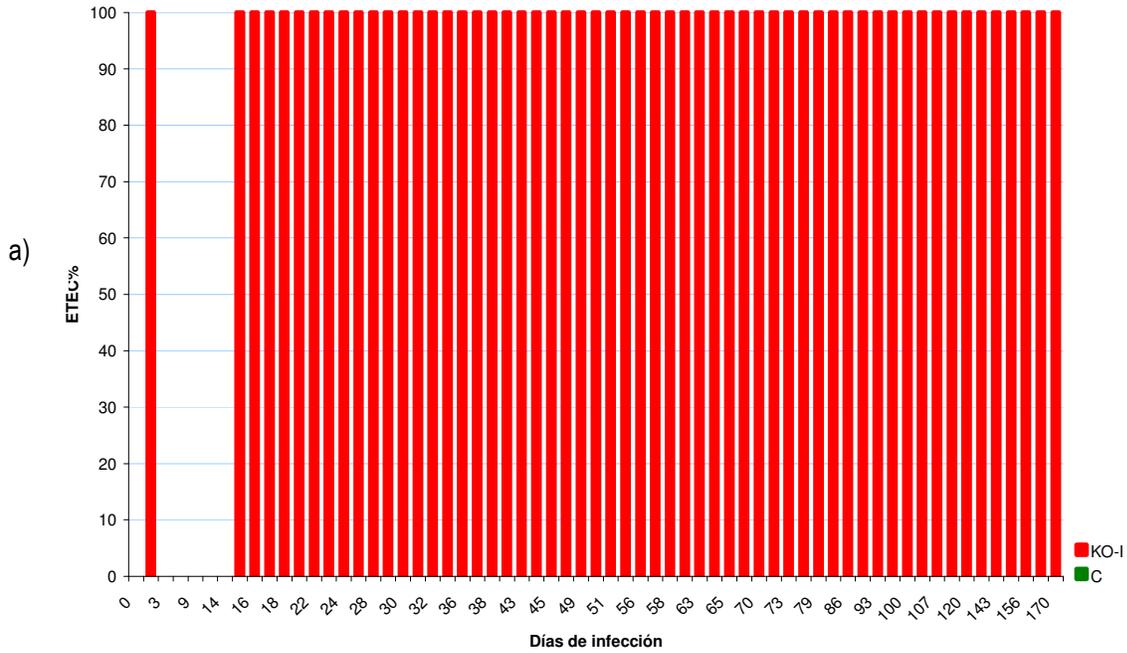
El modelo murino de infección y persistencia desarrollado por Thompson, 2005 demostró dos aspectos fundamentales: 1) que los ratones machos $Tnfsf5^{tm1lmx}$ (KOCD40L) inoculados oralmente con una dosis de 1×10^8 de ETEC aislada de humano pueden ser colonizados por esta bacteria y 2) que ETEC puede persistir al 100 % hasta por 15 días (ya que los animales se sacrificaron el día 16). Por lo que en el presente trabajo, se realizó un primer experimento bajo los parámetros ya descritos por Thompson, esto es con 3 ratones machos de aproximadamente 7 semanas de edad e inoculados con una dosis de 1×10^8 UFC de ETEC H10407 (LT+, ST+, CFA/I) y un ratón control. Para reproducir el modelo los animales se numeraron en función del orden en que fueron inoculados.

Los 3 ratones presentaron un comportamiento diferente en relación a la persistencia de ETEC en heces: el ratón 2 (KO-2) permaneció colonizado al 100 % hasta el día 14 (día en el que se les administro una segunda dosis bacteriana a los tres ratones problema) (gráfico 2a), el ratón 3 (KO-3) en el día 7 ya no se detecto la presencia de ETEC (gráfico 3a) y el ratón 1 (KO-1) ya no se encontró ETECs en heces desde el día 3 (gráfico 1a). Con respecto a las UFC de ETEC en las heces a las 24 h observamos: 4.2×10^5 , 9.1×10^5 y 6.1×10^5 UFC/g para los ratones KO-1, KO-2 y KO-3 respectivamente (tabla 6 y gráficos 1b, 2b y 3b). El número de CFU/g en las heces de los ratones correlaciona con el tiempo de persistencia para cada uno de ellos; es decir el ratón que mostró persistencia hasta el día 14 presentó el mayor número de CFU/g en heces a las 24 h. Estos resultados sugieren que lo más probable es que: 1) los ratones no recibieron la misma dosis y 2) la dosis debía de incrementarse. Por tal motivo se decidió dar a nuestro grupo de ratones problema un segundo inculo de 1×10^8 UFC de ETEC el día 14 post-inoculación.

Después de la segunda inoculación, a las 24 h observamos la presencia de ETEC en los tres ratones en un 100%, el cual se mantiene hasta el día 170 para KO-1 (gráfico 1a), hasta el día 143 para KO-2 (gráfico 2a) y solamente el ratón KO-3 presentó un comportamiento diferente en el cual se ven fluctuaciones que indican que intenta resolver la infección (gráfico 3a). Las UFC/g observadas a las 24 h después de esta segunda inoculación fueron de: 4.6×10^9 , 1.6×10^6 y 1.1×10^5 para KO-1, KO-2 y KO-3 respectivamente y al igual que en el experimento anterior el ratón que permanece por más tiempo colonizado es el que presentó el mayor número de CFU/g en heces a las 24 h (tabla 6 y gráficos 1b, 2b y 3b). Para determinar la concentración bacteriana que debía ser la mínima que nos

asegure una buena persistencia en el modelo calculamos la media geométrica (MG) en base a las UFC detectadas a partir del cuarto día post- inoculación (que fue el rango donde se mostraba homogeneidad en las cantidades de UFC). En el KO-1 la MG fue de 1.0×10^6 , de 4.7×10^5 para el KO-2 y de 9.2×10^4 para KO-3 y el promedio de los 3 ratones fue de 5.2×10^5 (gráfico 4). Al igual que Thompson, *et al.*, 2005 no se identificaron colonias de *E. coli*-like en las heces del ratón control pero si observamos la presencia de colonias lactosa-negativas (Lac-) a partir del día 128, el ratón KO-2 presento Lac- a partir del día 143 y posteriormente ya no se detecto la presencia de ETEC. Para el día 170, los ratones KO-1 y KO-3 presentaron gran cantidad de Lac- y tan solo el KO-1 presento en la placa directa (dilución⁰) 12 colonias de ETEC. Los ratones fueron sacrificados el día 171.

Persistencia de ETEC en KO-1



UFC de ETEC en KO-1

*MG= 1.0X10⁶

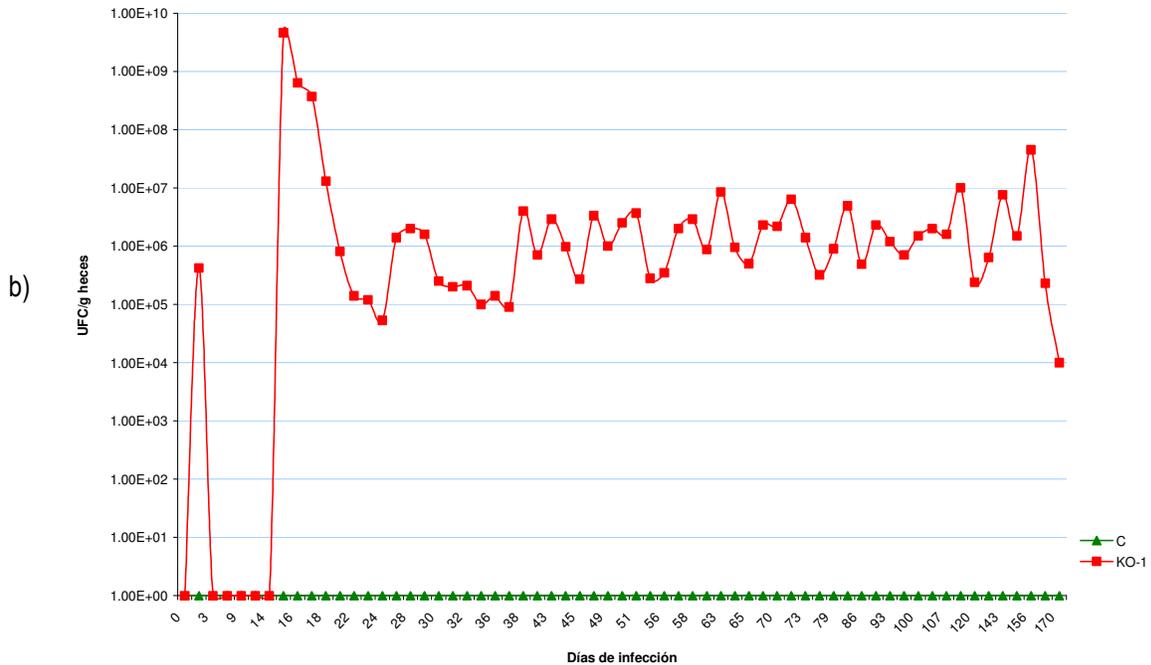


Gráfico 1. a) Porcentaje de persistencia de ETEC en el intestino del ratón C57BL/6 *Tnfs5^{l/mnt}* (KOCD40L) problema 1, macho de 7 semanas de edad, inoculado con una primera dosis de 1.0×10^8 UFC de ETEC H10407 (LT+, ST+, CFA/I) y posteriormente a los 14 días. Claramente se observa un incremento al 100 % de la presencia de ETEC en las heces de los ratones un día después del segundo inoculo y es mantenido hasta el día 170. **b)** Unidades Formadoras de Colonias de ETEC por gramo de heces (UFC/g) del KO-1. *MG= igual a la media geométrica y **C** es el ratón control.

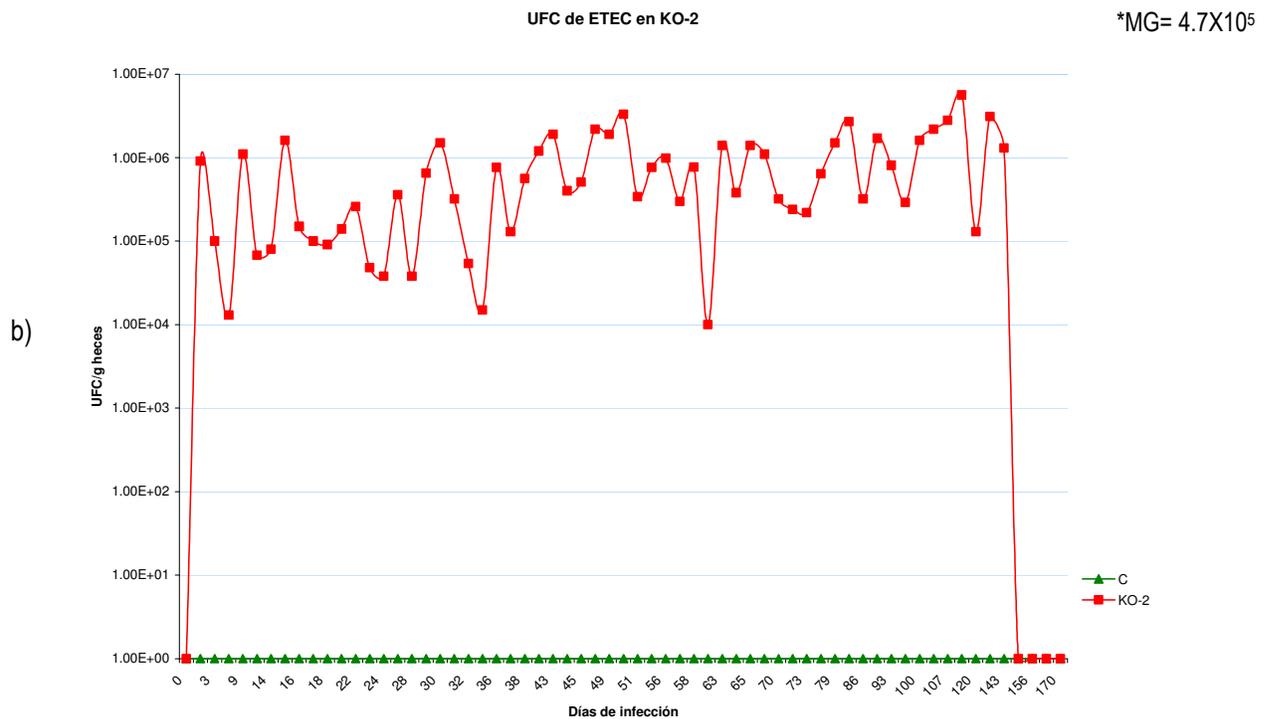
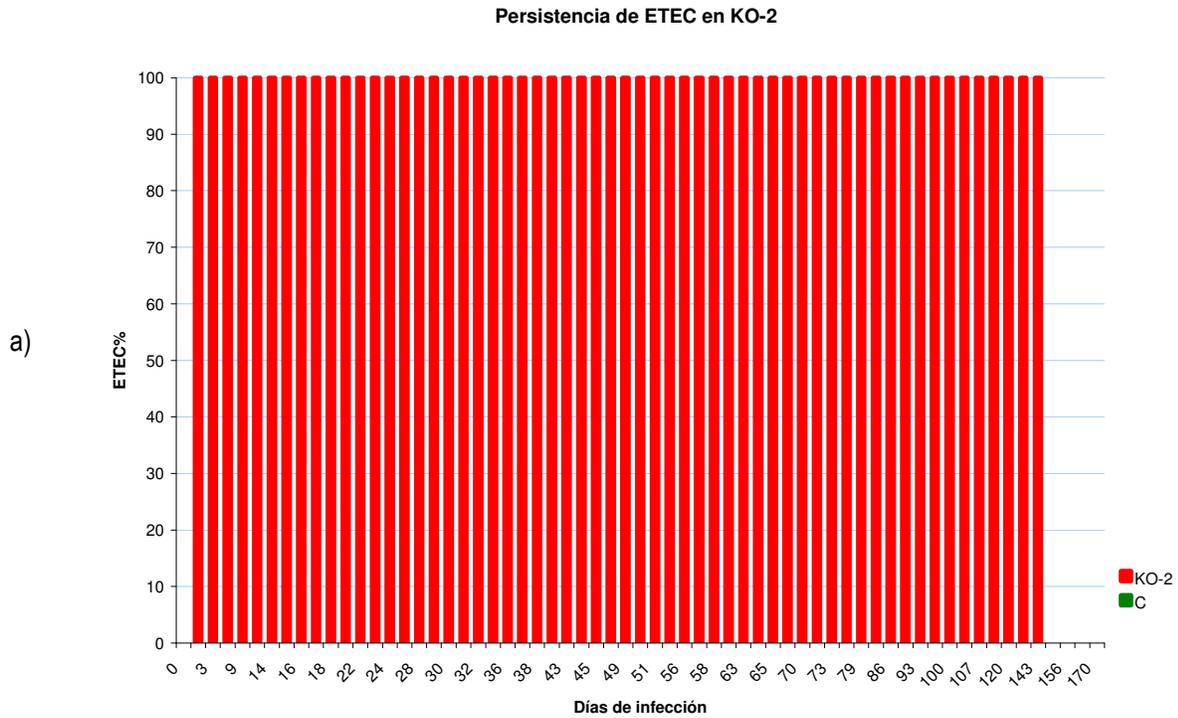


Gráfico 2. a) Porcentaje de persistencia de ETEC en el intestino del ratón C57BL/6 Tnfs5^{llmnt} (KOCD40L) problema 2, macho de 7 semanas de edad, inoculado con una primera dosis de 1.0X10⁸ UFC de ETEC H10407 (LT+, ST+, CFA/I) y posteriormente a los 14 días inoculado con la misma dosis. Se sigue observando la presencia de ETEC al 100% en las heces de los ratones un día después del segundo inóculo y es mantenido hasta el día 170. **b)** Unidades Formadoras de Colonias de ETEC por gramo de heces (UFC/g) del KO-2. *MG es igual a la media geométrica y **C** es el ratón control.

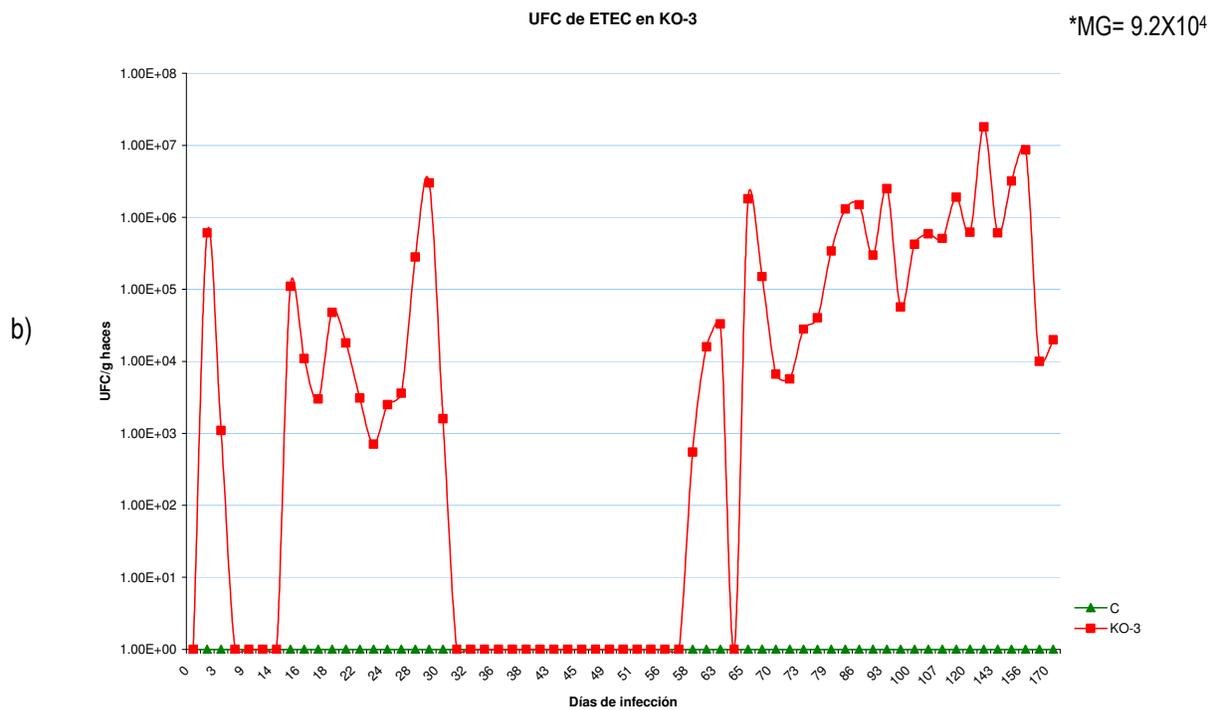
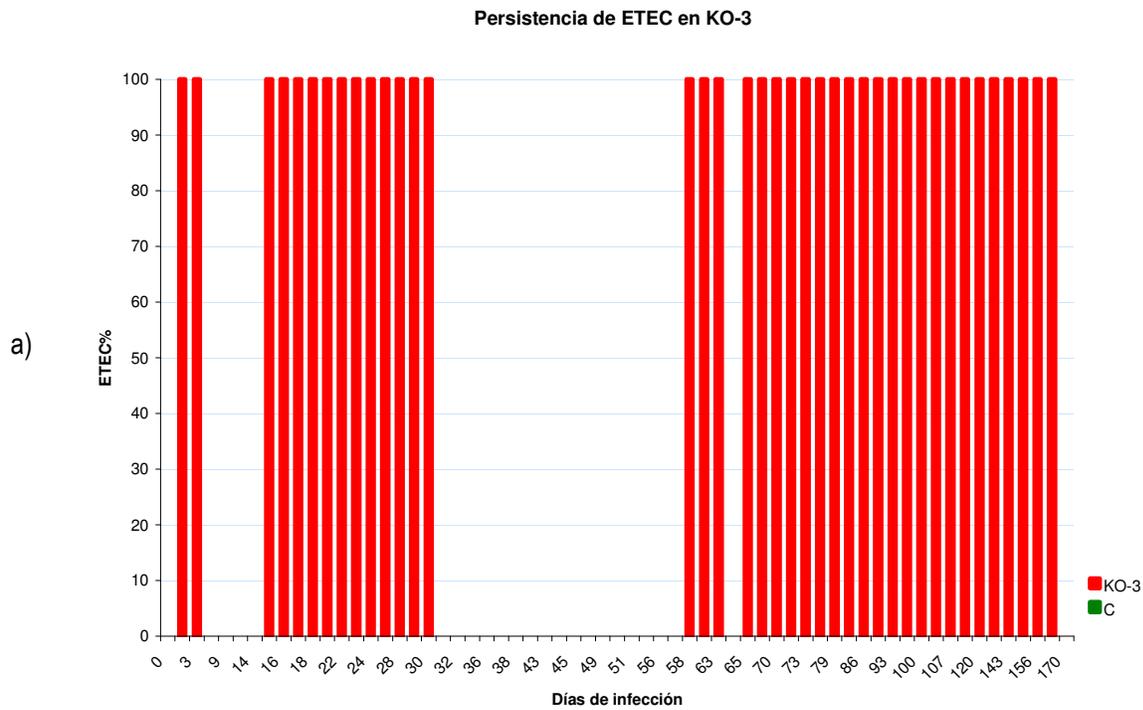


Gráfico 3. a) Porcentaje de persistencia de ETEC en el intestino del ratón C57BL/6 Tnfs5^{lmmnt} (KOCD40L) problema 3, macho de 7 semanas de edad, inoculado con una primera dosis de 1.0×10^8 UFC de ETEC H10407 (LT+, ST+, CFA/I) y posteriormente a los 14 días inoculado con la misma dosis. Existe un incremento al 100 % de la presencia de ETEC en las heces de los ratones un día después del segundo inoculo y es mantenido hasta el día 30, posteriormente se observan fluctuaciones que pareciera que el ratón intenta resolver la infección. **b)** Unidades Formadoras de Colonias de ETEC, por gramo de heces (UFC/g) del KO-3. *MG es igual a la media geométrica y **C** es el ratón control.

Tabla 6. Unidades Formadoras de Colonias de ETEC por gramo de heces (UFC/g) identificadas los ratones control y problemas durante los 170 días que se registraron.

| Días de infección | Control | KO-1 | KO-2 | KO-3 | Días de infección | Control | KO-1 | KO-2 | KO-3 |
|-------------------|---------|----------|----------|----------|-------------------|---------|----------|----------|----------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 51 | 0 | 3.70E+06 | 3.40E+05 | 0 |
| 1 | 0 | 4.20E+05 | 9.10E+05 | 6.10E+05 | 52 | 0 | 2.80E+05 | 7.60E+05 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 1.00E+05 | 1.10E+03 | 56 | 0 | 3.50E+05 | 9.80E+05 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | 1.30E+04 | 0 | 57 | 0 | 2.00E+06 | 3.00E+05 | 0 |
| 9 | 0 | 0 | 1.10E+06 | 0 | 58 | 0 | 2.90E+06 | 7.70E+05 | 5.50E+02 |
| 11 | 0 | 0 | 6.80E+04 | 0 | 59 | 0 | 8.70E+05 | 1.00E+04 | 1.60E+04 |
| 14 | 0 | 0 | 8.00E+04 | 0 | 63 | 0 | 8.50E+06 | 1.40E+06 | 3.30E+04 |
| 15 | 0 | 4.60E+09 | 1.60E+06 | 1.10E+05 | 64 | 0 | 9.50E+05 | 3.80E+05 | 0 |
| 16 | 0 | 6.40E+08 | 1.50E+05 | 1.10E+04 | 65 | 0 | 5.00E+05 | 1.40E+06 | 1.80E+06 |
| 17 | 0 | 3.70E+08 | 1.00E+05 | 3.00E+03 | 66 | 0 | 2.30E+06 | 1.10E+06 | 1.50E+05 |
| 18 | 0 | 1.30E+07 | 9.10E+04 | 4.80E+04 | 70 | 0 | 2.20E+06 | 3.20E+05 | 6.60E+03 |
| 21 | 0 | 8.10E+05 | 1.40E+05 | 1.80E+04 | 71 | 0 | 6.40E+06 | 2.40E+05 | 5.70E+03 |
| 22 | 0 | 1.40E+05 | 2.60E+05 | 3.10E+03 | 73 | 0 | 1.40E+06 | 2.20E+05 | 2.80E+04 |
| 23 | 0 | 1.20E+05 | 4.80E+04 | 7.10E+02 | 77 | 0 | 3.20E+05 | 6.40E+05 | 4.00E+04 |
| 24 | 0 | 5.30E+04 | 3.80E+04 | 2.50E+03 | 79 | 0 | 9.00E+05 | 1.50E+06 | 3.40E+05 |
| 25 | 0 | 1.40E+06 | 3.60E+05 | 3.60E+03 | 84 | 0 | 4.90E+06 | 2.70E+06 | 1.30E+06 |
| 28 | 0 | 2.00E+06 | 3.80E+04 | 2.80E+05 | 86 | 0 | 4.90E+05 | 3.20E+05 | 1.50E+06 |
| 29 | 0 | 1.60E+06 | 6.50E+05 | 3.00E+06 | 91 | 0 | 2.30E+06 | 1.70E+06 | 3.00E+05 |
| 30 | 0 | 2.50E+05 | 1.50E+06 | 1.60E+03 | 93 | 0 | 1.20E+06 | 8.10E+05 | 2.50E+06 |
| 31 | 0 | 2.00E+05 | 3.20E+05 | 0 | 98 | 0 | 7.00E+05 | 2.90E+05 | 5.70E+04 |
| 32 | 0 | 2.10E+05 | 5.40E+04 | 0 | 100 | 0 | 1.50E+06 | 1.60E+06 | 4.20E+05 |
| 35 | 0 | 1.00E+05 | 1.50E+04 | 0 | 105 | 0 | 2.00E+06 | 2.20E+06 | 5.90E+05 |
| 36 | 0 | 1.40E+05 | 7.60E+05 | 0 | 107 | 0 | 1.60E+06 | 2.80E+06 | 5.10E+05 |
| 37 | 0 | 9.00E+04 | 1.30E+05 | 0 | 113 | 0 | 1.00E+07 | 5.60E+06 | 1.90E+06 |
| 38 | 0 | 4.00E+06 | 5.60E+05 | 0 | 120 | 0 | 2.40E+05 | 1.30E+05 | 6.20E+05 |
| 42 | 0 | 7.10E+05 | 1.20E+06 | 0 | 128 | 0 | 6.40E+05 | 3.10E+06 | 1.80E+07 |
| 43 | 0 | 2.90E+06 | 1.90E+06 | 0 | 143 | 0 | 7.60E+06 | 1.30E+06 | 6.10E+05 |
| 44 | 0 | 9.80E+05 | 4.00E+05 | 0 | 150 | 0 | 1.50E+06 | 0 | 3.20E+06 |
| 45 | 0 | 2.70E+05 | 5.10E+05 | 0 | 156 | 0 | 4.50E+07 | 0 | 8.70E+06 |
| 46 | 0 | 3.33E+06 | 2.20E+06 | 0 | 164 | 0 | 2.30E+05 | 0 | 1.00E+04 |
| 49 | 0 | 1.00E+06 | 1.90E+06 | 0 | 170 | 0 | 1.00E+04 | 0 | 2.00E+04 |
| 50 | 0 | 2.50E+06 | 3.30E+06 | 0 | | | | | |

6.4.1 Comportamiento de los plásmidos LT y ST en el modelo de infección y persistencia de ETEC

Durante la infección por ETEC se observó que durante los 2 primeros meses de persistencia bacteriana en todas las colonias aisladas de heces se identificaron los genes *lt* y *st* que codifican para las toxinas termolábil y termoestable. Sin embargo a partir del día 65 post-inoculación se observó que “in vivo” algunas colonias aisladas de heces pierden el plásmido donde se localiza el gen *st* (figura 11), a medida que el tiempo fue transcurriendo el número de colonias sin el plásmido ST también fue aumentando (tabla 7).

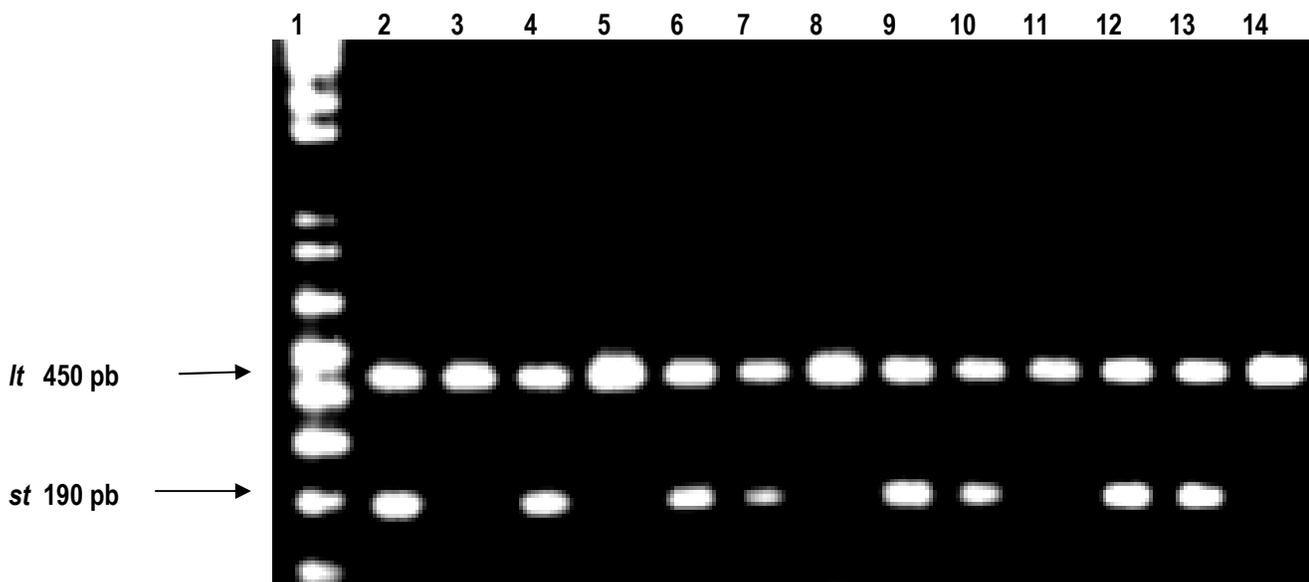


Figura 11. Productos de amplificación del gen *lt* y pérdida del plásmido *st*. Gel de agarosa al 2 % con los productos de amplificación de los genes de patogenia de ETEC (H10407 CFA/I LT⁺, ST⁺), durante la infección de la cepa C57BL/6J-Tnfsf5^{tm1Imx} (KOCD40L) Carril 1: marcador de peso molecular de 1 Kb plus. Carril 2: Control (+). Productos de la cepa de referencia ETEC H10407, con sus dos productos de 450 pb para *lt* y de 190 pb para *st*. Carril 3- 14: Productos de amplificación de las ETEC aisladas de las heces. Algunas colonias de ETEC H10407 CFA/I LT⁺, ST⁺ aisladas de heces perdieron el gen *st*, como se muestra en los carriles 3, 5, 8, 11 y 14.

Tabla 7. Numero de colonias aisladas de ETEC H10407 que perdieron el plásmido que codifica para la toxina ST (st) durante los últimos días de la infección (a partir del día 65 se detecto este comportamiento).

| Días de infección | KO-1 <i>st</i> -/ <i>lt</i> ⁺ | KO-2 <i>s t</i> -/ <i>lt</i> ⁺ | KO-3 <i>st</i> -/ <i>lt</i> ⁺ |
|-------------------|---|--|---|
| 65 | 2/3 | 0 | 0 |
| 66 | 1/3 | 0 | 2/3 |
| 70 | 1/3 | 0 | 0 |
| 71 | 0 | 0 | 1/3 |
| 77 | 1/3 | 0 | 0 |
| 79 | 0 | 0 | 2/3 |
| 86 | 2/3 | 0 | 0 |
| 91 | 1/3 | 0 | 0 |
| 93 | 2/3 | 0 | 0 |
| 98 | 0 | 0 | 1/3 |
| 100 | 3/3 | 0 | 0 |
| 107 | 2/3 | 0 | 0 |
| 113 | 1/3 | 1/3 | 1/3 |
| 128 | 0 | 0 | 1/3 |
| 143 | 3/3 | 0 | 3/3 |
| 150 | 3/3 | 0 | 2/3 |
| 156 | 3/3 | 3/3 | 0 |
| 164 | 0 | 0 | 3/3 |
| 170 | 1/3 | 0 | 0 |

6.5 PERSISTENCIA DE ETEC EN RATONES KOCD40L DE 11 SEMANAS DE EDAD CON UNA DOSIS BACTERIANA DE 1.5×10^8

Debido a que era importante determinar los valores reales de UFC/g a las 24 h post-inoculación que nos aseguren la persistencia de ETEC en el intestino de los ratones; decidimos inocular a otro grupo de ratones de la misma camada que los ratones del primer ensayo. Se inocularon el mismo día que se administro el segundo inoculo al primer grupo, con una dosis más alta para asegurar la ingesta de la dosis adecuada. Se trabajaron 3 ratones problema y un control, de 11 semanas de edad a la fecha de inoculación; los ratones problema se inocularon con una dosis de 1.5×10^8 UFC de ETEC H10407 (LT+, ST+, CFA/I) en 50 μ l y el control con 50 μ l de solución salina estéril. Nuevamente los ratones fueron numerados en función al orden de inoculación.

En este segundo experimento observamos una persistencia del 100 % de ETEC en las heces de los ratones KO-1 Y KO-3 durante los 42 días que se registraron (grafico 5a y 7a), el ratón KO-2 prácticamente también presento el 100 % de persistencia excepto por que en el día 30 post-inoculación que no se identificaron colonias de ETEC (gráfico 5a y tabla 8). Las UFC/g de heces observadas a las 24 h fueron: más de 1×10^7 , de 1.09×10^7 y de 2.36×10^6 para los ratones KO-1, KO-2 y KO-3 respectivamente (tabla 8 y gráficos 5b, 6b y 7b). A pesar de que las UFC/g descendieron notablemente al tercer día, todavía existían suficientes UFC/g para mantener la persistencia durante todos los días registrados (tabla 8).

En este grupo experimental no observamos colonias Lac⁻, ni tampoco la ausencia del gen ST en los aislados que se les realizo PCR. La media geométrica para el ratón KO-1 fue de 6.0×10^5 , de 9.1×10^3 en KO-2 y 5.1×10^5 para KO-3, y el promedio de las medias geométricas fue 3.7×10^5 (gráfico 8).

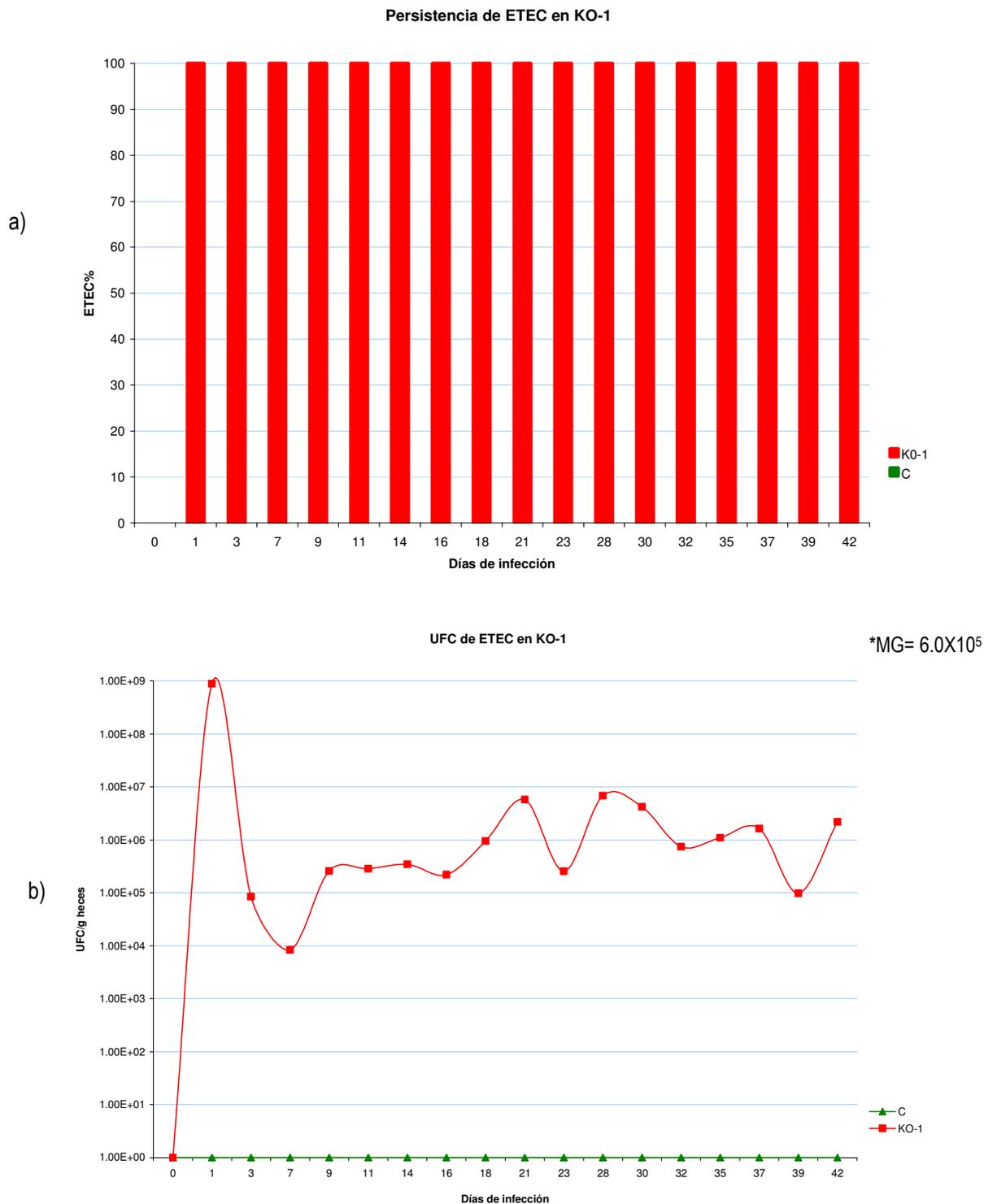


Gráfico 4. a) Porcentaje de persistencia de ETEC en el intestino del ratón C57BL/6 Tnfs5^{llmnt} (KOCD40L) problema 1, macho de 11 semanas de edad, inoculado con una única dosis de 1.5×10^8 UFC de ETEC H10407 (LT+, ST+, CFA/I). Se observa una persistencia de ETEC del 100 % durante los 42 días que se registraron. **b)** Unidades Formadoras de Colonias de ETEC por gramo de heces (UFC/g); observamos que el KO-1 al día 1 post-infección tiene 1.4×10^8 UFC/g de heces y a pesar de que este valor desciende al tercer día, fue suficiente para que el ratón permanezca colonizado. *MG es igual a la media geométrica y **C** es el ratón control.

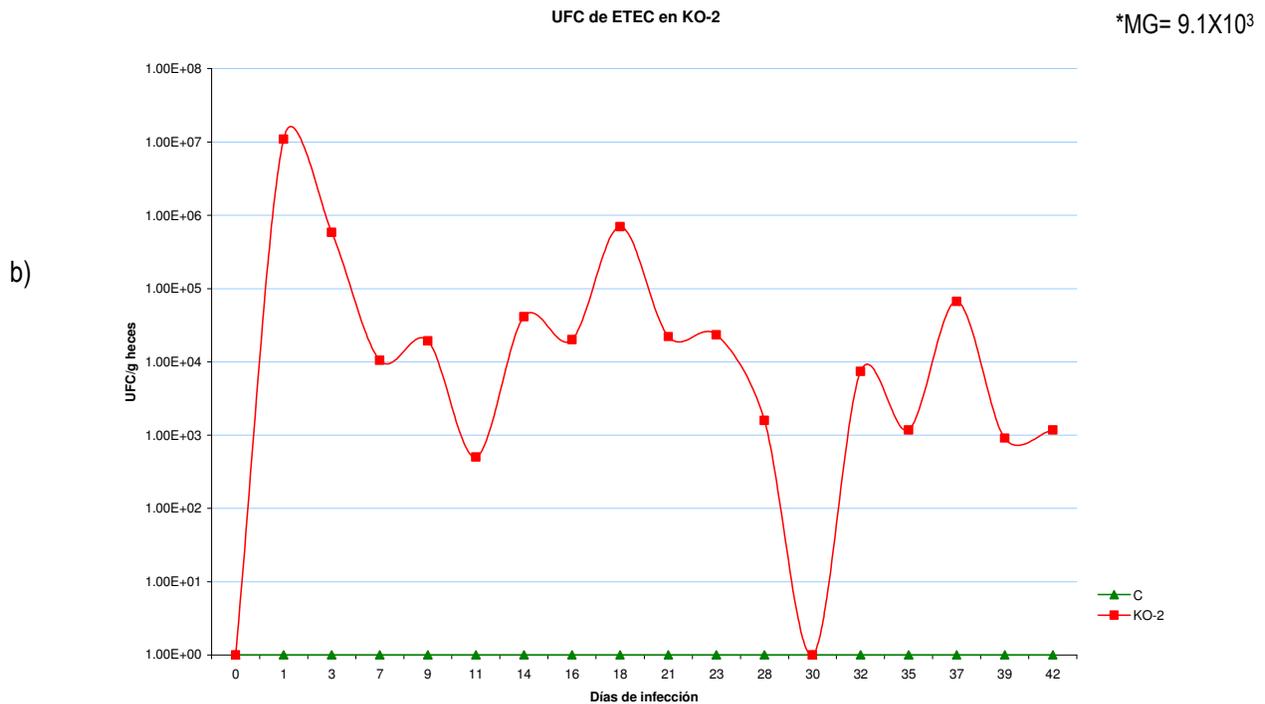
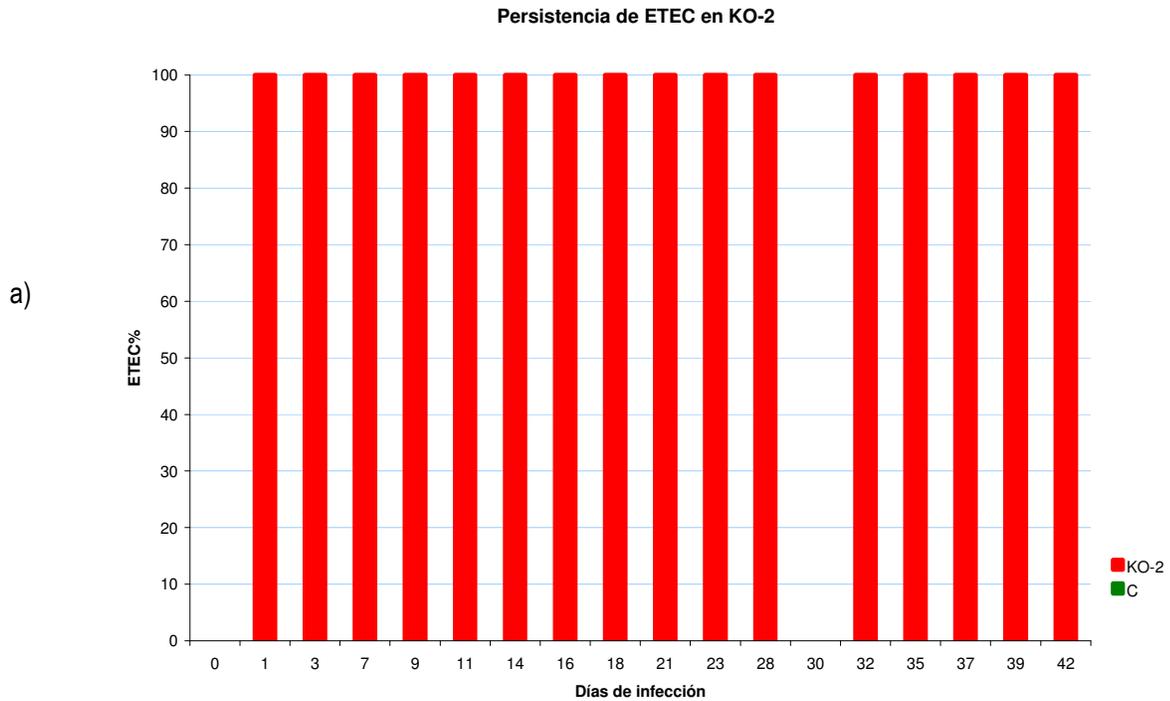


Gráfico 5. a) Porcentaje de persistencia de ETEC en el intestino del ratón C57BL/6 Tnfs5^{l/mnt} (KOCD40L) problema 2, macho de 11 semanas de edad, inoculado con una única dosis de 1.5×10^8 UFC de ETEC H10407 (LT+, ST+, CFA/I). Se observa una persistencia de ETEC del 100 % casi durante los 42 días que se registraron, excepto el día 30, donde no se detectó a ETEC. **b)** Unidades Formadoras de Colonias de ETEC por gramo de heces (UFC/g); observamos que el KO-2 al día 1 post-infección tiene 1.09×10^7 UFC/g de heces, manteniéndose este valor más o menos constante y suficiente para que el ratón permanezca colonizado. *MG es igual a la media geométrica y **C** es el ratón control.

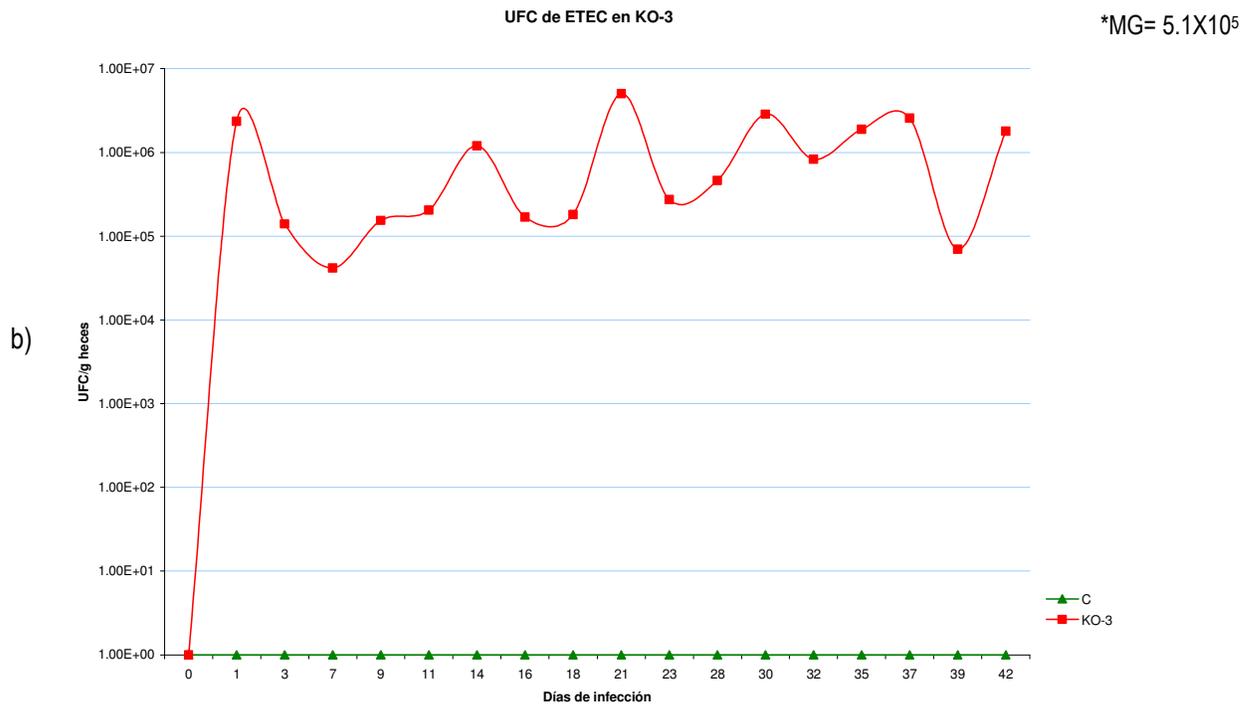
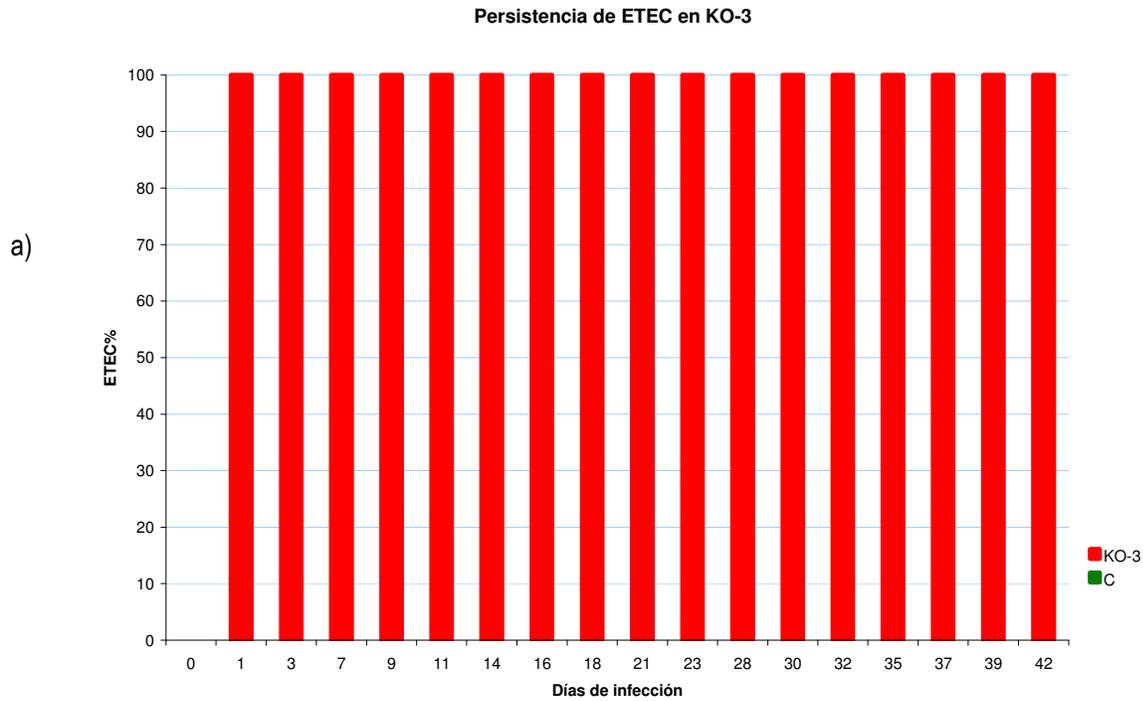


Gráfico 6. a) Porcentaje de persistencia de ETEC en el intestino del ratón C57BL/6 Tnfs5^{l/mnt} (KOCD40L) problema 3, macho de 11 semanas de edad, inoculado con una única dosis de 1.5×10^8 UFC de ETEC H10407 (LT+, ST+, CFA/I). Se observa una persistencia de ETEC del 100 % durante los 42 días que se registraron. **b)** Unidades Formadoras de Colonias de ETEC por gramo de heces (UFC/g); observamos que el KO-3 al día 1 post-infección tiene 2.3×10^6 UFC/g de heces, todos los días de la infección demuestra un comportamiento heterogéneo pero suficiente para que el ratón permanezca colonizado. *MG es igual a la media geométrica y C es el ratón control.

Tabla 8. Unidades Formadoras de Colonias de ETEC por gramo de heces (UFC/g) identificadas en las heces de los ratones control y problemas durante los 42 días que se registraron.

| Días de Infección | Control | KP1 | KP2 | KP3 |
|-------------------|---------|----------|----------|----------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 0 | 1.40E+08 | 1.09E+07 | 2.36E+06 |
| 3 | 0 | 8.47E+04 | 5.83E+05 | 1.40E+05 |
| 7 | 0 | 8.33E+03 | 1.05E+04 | 4.18E+04 |
| 9 | 0 | 2.58E+05 | 1.93E+04 | 1.54E+05 |
| 11 | 0 | 2.85E+05 | 5.00E+02 | 2.05E+05 |
| 14 | 0 | 3.45E+05 | 4.13E+04 | 1.20E+06 |
| 16 | 0 | 2.21E+05 | 2.00E+04 | 1.70E+05 |
| 18 | 0 | 9.50E+05 | 7.00E+05 | 1.82E+05 |
| 21 | 0 | 5.75E+06 | 2.21E+04 | 5.04E+06 |
| 23 | 0 | 2.57E+05 | 2.33E+04 | 2.75E+05 |
| 28 | 0 | 6.83E+06 | 1.58E+03 | 4.63E+05 |
| 30 | 0 | 4.20E+06 | 0.00E+00 | 2.87E+06 |
| 32 | 0 | 7.45E+05 | 7.37E+03 | 8.32E+05 |
| 35 | 0 | 1.10E+06 | 1.18E+03 | 1.89E+06 |
| 37 | 0 | 1.64E+06 | 6.63E+04 | 2.56E+06 |
| 39 | 0 | 9.83E+04 | 9.09E+02 | 7.00E+04 |
| 42 | 0 | 2.19E+06 | 1.18E+03 | 1.79E+06 |

6.6 DETERMINACIÓN POR DOT BLOT DE LA IgA TOTAL EN HECES DE LOS RATONES KOCD40L Y EN LA CEPA SILVESTRE C57BL/6 DE 7 SEMANAS DE EDAD

Otro de los objetivos del presente trabajo era determinar cualitativamente la presencia de IgA total en las heces de los ratones KOCD40L (en este ensayo no se administro dosis bacteriana), para llevar a cabo este punto se usaron como controles positivos extractos de heces de ratones de la cepa silvestre C57BL/6. Se utilizaron ratones machos de 7 semanas de edad (5 ratones KOCD40L y 5 ratones de la cepa silvestre C57BL/6). Se identificó IgA por Dot blot en los extractos obtenidos de las heces de los 10 ratones (Figura 12).

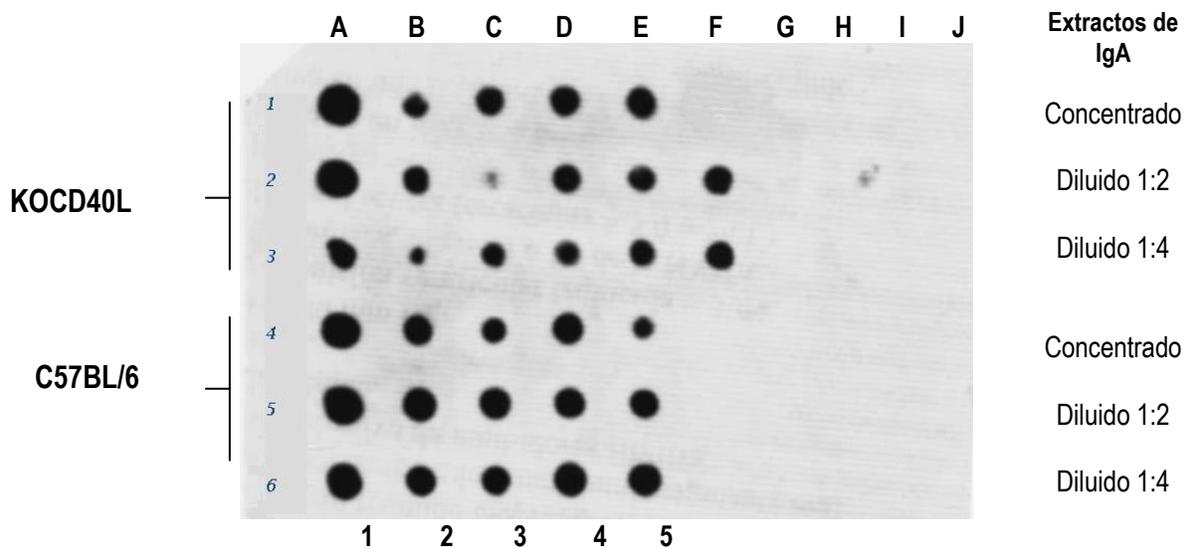


Figura 12. Identificación por Dot blot de IgA total en los extractos de las heces de los 5 ratones C57BL/6 *Tnfs5^{lmt}* (KOCD40L) y los 5 ratones C57BL/6 silvestres. Todos los ratones en ambas cepas dieron positivo para la IgA total en los extractos concentrados y en las 2 diluciones de los mismos (1:2 y 1:4). La descripción del reparto de los controles ubicados en los pozos se describe a continuación: **F2** y **F3**: Control positivo correspondiente a IgA pura de ratón. **G2** y **G3**: Control negativo del sistema correspondiente a IgM pura de ratón. **H2** y **H3**: PBS 1X con anti-IgA (αIgA) y streptavidina (SAV). **I2** y **I3**: Bloqueador, αIgA y SAV. **J2** y **J3**: PBS y αIgA. **F4** y **F5**: Bloqueador y αIgA. **G4** y **G5**: PBS y SAV **H4** y **H5**: Bloqueador y SAV. **I4** e **I5**: PBS. **J4** y **J5**: Bloqueador.

6.7 CUANTIFICACION POR ELISA DE LA IgA TOTAL EN HECES DE LOS RATONES KOCD40L EN CONDICIONES BASALES Y A 30 DÍAS POST-RETO

Para este último ensayo se usaron solo ratones C57BL/6 Tnfs5^{fl/mnt} KOCD40L, machos de 7 semanas de edad. Se trabajaron 3 ratones problema y un control; los ratones problema se inocularon con una dosis de 2×10^8 UFC de ETEC H10407 (LT+, ST+, CFA/I) en 50 μ l y el control con 50 μ l de solución salina estéril. Nuevamente los ratones fueron numerados en función al orden de inoculación. A los 20 días los ratones problemas se retaron con la misma dosis y 30 días después de este reto se colectaron las heces para medir la cantidad de IgA.

Para medir la cantidad de IgA total detectada en las heces de los ratones KOCD40L infectados con ETEC, se monto un ensayo de ELISA con los extractos obtenidos de las heces de los ratones antes de inocularlos (tiempo 0) y de las heces del día 30 post-reto (tiempo 30). Con las diferentes concentraciones de IgA y con sus respectivos valores de densidad óptica (D.O.) obtenidos, se construyó la curva de calibración. Se determino la ecuación de la recta, la cual se uso para determinar las concentraciones de IgA en nuestros extractos. Nuestros resultados demuestran que hay un incremento un poco más del doble en los ratones retados con respecto al control (tabla 9 y grafico 7).

Tabla 9. Concentraciones de IgA $\mu\text{g/g}$ de heces de ratones KOCD40L al tiempo 0, y 30 días después de haber sido retados con ETEC.

| Ratón | IgA $\mu\text{g/g}$ de heces Tiempo 0 | IgA $\mu\text{g/g}$ de heces Tiempo 30 |
|--------------|--|---|
| Control-KO | 38.8 | 39.01 |
| Problemas-KO | 31.13 | 78.33 |
| Desv-Standar | 6.04 | 8.81 |

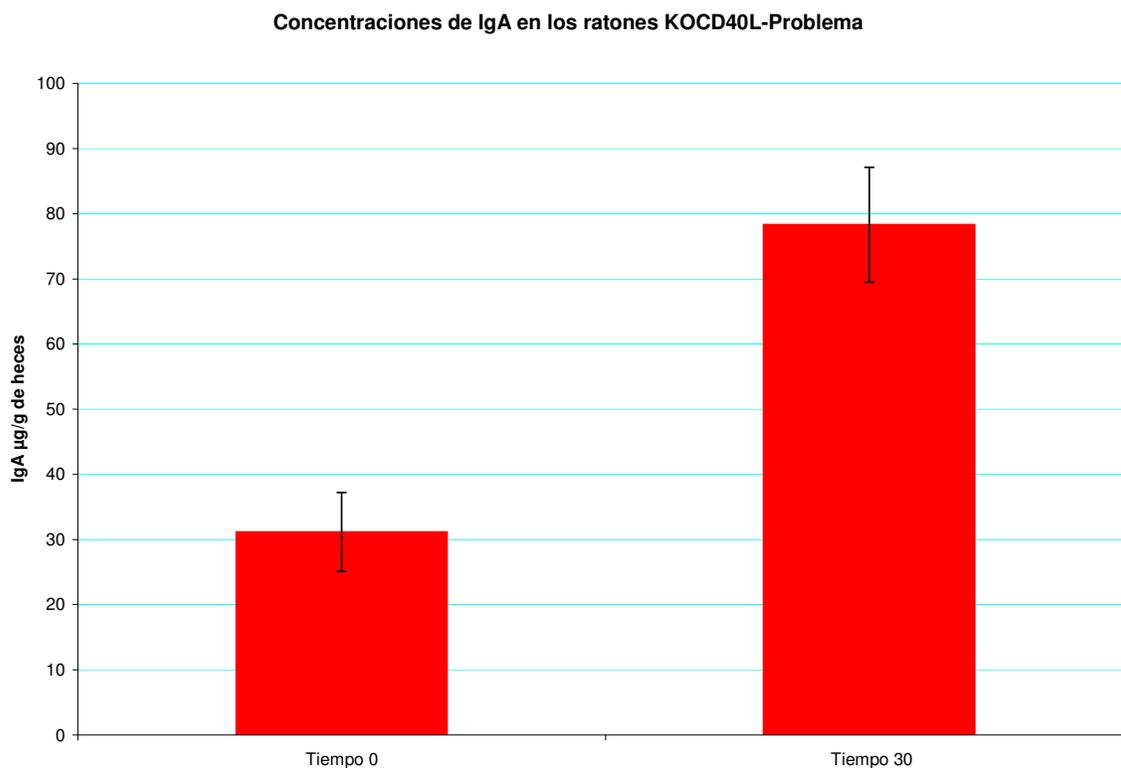


Gráfico 7. Concentraciones de IgA detectadas por ELISA en el tiempo basal y 30 días post-reto con ETEC en los 3 ratones C57BL/6 $Tnfs5^{\text{lmnt}}$ (KOCD40L), machos de 7 semanas de edad.

7.0 DISCUSIÓN

La ausencia de un modelo animal de infección de ETEC aislada de humano representa una gran desventaja para el estudio de la patogénesis de la infección de ETEC, para el conocimiento de los mecanismos locales de la respuesta inmune innata y adaptativa que induce esta bacteria *in vivo* e *in situ*, que permiten o que impiden la infección por esta bacteria y para el conocimiento de los antígenos bacterianos, además de los CFAs, responsables de inducir respuesta protectoras.

Byrd & Cassels (2006) desarrollaron un modelo murino para poder estudiar la antigenicidad, inmunogénicidad y eficacia de potenciales vacunas para ETEC, que se caracterizan por usar una vía de administración intranasal. Por lo tanto la información obtenida de este modelo quizás no represente lo que realmente ocurre en la infección por ETEC. Por esta razón nuestro grupo de investigación desarrollo un modelo murino de infección y persistencia con una ETEC aislada de humanos (H10407) utilizando ratones KO del CD40L con fondo genético C57BL/6 inoculados por vía oral (vía de entrada natural de ETEC) con una dosis de 1×10^8 ETEC/50 μ l; trabajaron con ratones machos de 7 semanas de edad y lograron obtener una colonización hasta los 15 días, tiempo en que se sacrificaron (Thompson; 2005).

Recientemente se ha reportado en la literatura un modelo murino para la misma cepa de ETEC que nosotros utilizamos (Allen, *et al.*, 2006). Allen *et al.*, usaron la cepa de ratones CD-1 genéticamente heterogénea, hembras inmunocompetentes de 5 a 8 semanas de edad, inoculadas por vía oral con una dosis de 1×10^8 ETEC H10407 (misma que propone Thompson). Sin embargo, cabe mencionar que evaden las condiciones naturales de infección de este patógeno, al eliminar la flora comensal del tubo digestivo con la administración de estreptomina previo a la inoculación, además no demuestran una persistencia bacteriana de más de tres días, puesto que hacen dos grupos de ratones unos que inoculan con la cepa prototipo y los sacrifican a las 24 hrs y otro en el que inoculan a los ratones con una cepa H10407 resistente a estreptomina y los sacrifican a las 72 hrs. Por ende seguimos pensando que el modelo propuesto por Thompson 2005 en efecto es un modelo de infección y persistencia.

Nuestros resultados dejan claro que la dosis empleada en el modelo de ETEC es determinante para colonizar y lograr la persistencia del patógeno. Observamos que si las UFCs/g de heces determinadas a las 24 h eran $\geq 1 \times 10^6$ los animales no solo mostraban colonización sino también persistencias prolongadas (tabla 6 y 8 y gráficos 1-6). Como todo modelo biológico los ratones se comportan de manera diferente, esto lo podemos ver en los resultados de nuestro primer ensayo de persistencia (gráficos 1-3), en donde cada ratón como individuo intenta resolver la infección, de tal manera que el ratón KO-P2 permanece colonizado los primeros 14 días como lo reportado por Thompson 2005, el KO-P1 solo hasta el día 7, aún así se considera que realmente estuvo colonizado puesto que no elimina a la bacteria en las primeras 72 h (3 días), tiempo en el que Thompson 2005 reporto que la cepa silvestre elimina a este patógeno y por último el KO-P3 resuelve la infección al tercer día. Los resultados anteriores sugieren que probablemente el problema era de dosis y por lo tanto no se administro adecuadamente la dosis de 1×10^8 ETECs en los tres ratones. Por tal motivo se le administro un segundo inóculo bacteriano de 1×10^8 ETECs, en donde obtuvimos colonización hasta por 170 días con un 100% de persistencia (gráficos 1-3). La UFCs/g de heces determinadas a las 24 h después de esta segunda inoculación (tabla 2) nos indica que nuevamente los tres ratones no recibieron la misma cantidad de bacterias, pero aun así, los dos ratones (KO-P1 y KO-P2) que tiene más de 1×10^6 UFC/g a las 24 h son los que presentan un comportamiento más homogéneo. Para que ETEC pueda colonizar al ratón KO CD40L observamos que se deben de tener $\geq 1 \times 10^6$ UFC/g de heces a las 24 h y que para poder persistir en el intestino del ratón KO CD40L por tiempo prolongado se debe de tener un promedio de 5.2×10^5 UFC de ETECs/g de heces, promedio calculado a partir UFC /g del 4 día (tiempo más que suficiente en el cual la cepa silvestre elimina a ETEC) hasta el día en que el ratón elimina completamente a la bacteria.

Los resultados del segundo ensayo de persistencia nos indicó que efectivamente habíamos tenido un problema de dosis, puesto que al administrar una dosis más alta (1.5×10^8 UFC) aseguramos que los ratones quedaran colonizados. Las UFC de ETEC/g de heces determinadas a las 24 h (tabla 3) nos indican que los ratones se inocularon adecuadamente y que los 3 ratones recibieron casi la misma cantidad de bacteria y por ende a pesar de que se trabajó con sistemas biológicos y cada ratón se comporta diferente (gráficos 4-6); este segundo experimento no solo reprodujo el 100% de persistencia durante 15 días que ya había reportado Thompson 2005, si no que observamos esta persistencia del 100 % durante los 42 días que se muestrearon los ratones (gráficos 4a-6a); no

sabemos hasta cuando hubiéramos identificado a la bacteria en las heces de estos ratones porque después de los 42 días se sacrificaron. Cabe mencionar que se calculo un promedio de 3.7×10^5 UFC de ETECs/g de heces durante el periodo ya de infección (valor calculado de la misma manera como en el primer ensayo), valor muy cercano al calculado en el primer ensayo, lo cual nos indica que para que ETEC persista en el intestino del ratón por un tiempo prolongado debe de estar presente en un orden de magnitud de 10^5 UFC/g.

Otros autores también han determinado que la concentración del inóculo es un factor que determina la aparición de infección en el huésped. Bergamini, *et al.*, en 1984 utilizaron un inóculo de 1.5×10^8 de UFC de *Staphylococcus aureus* en un modelo experimental de herida infectada. Posteriormente, Valle, *et al.*, en el 2005 establecieron un modelo biológico en cobayos para reproducir una infección en heridas quirúrgicas por *Staphylococcus aureus* utilizando un inóculo de 2×10^9 UFC. Urzúa, *et al.*, 2004 observaron diferencia significativa entre ratones machos inoculados con 200 y 2000 parásitos de *Trypanosoma cruzi*, observaron que con ambas dosis los animales eran susceptibles a la infección, pero los animales inoculados con una dosis menor sobreviven un tiempo más prolongado. Otro dato importante que observamos es la pérdida *in vivo* del plásmido que codifica para la toxina ST (fig 11), en estudios previos han observado, después de varios pases subsecuentes de aislados de ETEC, la pérdida del plásmido que codifica para la toxina termoestable asociado con la pérdida del CFA/I y la incapacidad de producir la toxina (Murray, *et al.*, 1983, Levine, *et al.*, 1983). En algunos casos también han asociado la pérdida de CFA/II con la incapacidad de producir LT y ST (Levine, *et al.*, 1983). Las cepas de ETEC que producen la toxina ST son las que principalmente se han asociado a brotes (Nataro & Kaper, 1998), por lo tanto el hecho de que la cepa inoculada originalmente este perdiendo el plásmido *st* nos indica que esta perdiendo virulencia. Por otro lado también observamos que las bacterias sin plásmido se están replicando y el aumento de estas en el intestino van desplazando por competencia de nichos a las bacterias que presentan ambas toxinas (tabla 7), este mismo desplazamiento lo observamos cuando empiezan a aparecer las colonias lactosas negativas, aumenta el número de estas y disminuye el número de ETEC hasta ser eliminadas completamente.

El trabajo de Thompson en el 2005 puso en evidencia que la interacción CD40-CD40L es fundamental para la rápida eliminación de ETEC (menos de 72 h) en la cepa silvestre C57BL/6, y por ende el ratón KO de CD40L permite no sólo el establecimiento de la infección sino también su

persistencia, por lo que los autores sugieren que la interacción CD40-CD40L en el caso de microorganismos intestinales no intracelulares, participa de manera importante en el impedimento de la colonización del tracto intestinal. Esto nos indica que la infección debe de estarse resolviendo a nivel de lumen intestinal.

Se sabe que al menos para algunas infecciones con organismos intracelulares, como *Cryptosporidium parvum* (McGowan, *et al.*, 1993) la integridad de la interacción CD40L-CD40 es fundamental para lograr respuestas protectoras óptimas contra estos organismos. Se ha visto que los animales KO del CD40L inoculados con *C parvum* son incapaces de eliminar la infección en comparación con los ratones silvestres. Sin embargo, hasta ahora sólo existe un estudio en donde evalúan la importancia la interacción CD40L-CD40 para la eliminación de una bacteria que produce infección gastrointestinal, como lo es *Salmonella dublín* (Marriott, *et al.*, 1999). Los autores demostraron que, cuando trataban ratones BALB/c con un agonista de CD40 exógeno, incrementaban la resistencia contra una dosis letal administrada oralmente de *S. dublín*. Por el contrario, cuando utilizaban un anticuerpo contra el ligando de CD40, para bloquear precisamente la interacción CD40L-CD40, observaban una clara disminución en la resistencia a la salmonelosis.

Se ha estudiado la respuesta inmune humoral en ratones deficientes del ligando de CD40 (Xu, *et a.*, 1994; By Blair, *et al.*, 1994), y se ha visto que estos ratones no desarrollan centros germinales en respuesta a un antígeno timo dependiente sugiriendo una inhabilidad de desarrollar células B de memoria. Pero aun son capaces de responder normalmente a antígenos timo independientes; ya que se ha demostrado su capacidad de generar inmunoglobulinas antígeno-específicas de todos los isótipos excepto IgE en suero. Sin embargo hasta el momento ningún estudio había evaluado la presencia de IgA en las heces de estos ratones KOCD40L.

Se conoce que una de las principales barreras de defensa en el lumen intestinal es la presencia de la IgAs (Michetti, *et al.*, 1992, Renegar, *et al.*, 2001) y que la interacción de las moléculas CD40-CD40L es importante para el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas (Buckley, 1999). Debido a esto fue importante buscar IgA en las heces de estos ratones KO de CD40L. Nuestros resultados de dot blot (fig 12) demuestran que si hay IgA en las heces de los ratones KO de CD40L.

El hecho de que demostramos la presencia de IgA en las heces de estos ratones nos indica que existe una ruta de síntesis de la inmunoglobulina que no depende de la comunicación de CD40-CD40L, lo cual concuerda con estudios previos que evidencian que la síntesis de IgA intestinal puede

estarse llevando a cabo por un mecanismo independiente de las células T (Gardby, *et al.*, 1998; Hörnquist, *et al.*, 1995; Lane *et al.*, 1994). Macpherson, *et al.*, 2000, utilizando ratones deficientes tanto de células T como en la formación de centros germinales demostraron la presencia de IgA específica contra varias proteínas de la pared celular de *Enterobacter cloacae*. También determinaron la IgA intestinal y sérica y observaron que la cantidad de IgA secretada disminuyó aproximadamente a un cuarto con respecto al animal silvestre, pero aún se siguió detectando la especificidad de la inmunoglobulina contra los antígenos bacterianos. Snider, *et al.*, 1999 observaron en ratones deficientes de MHC clase II (C2d) cantidades normales de IgA sérica, IgAs intestinal y un valor normal de células plasmáticas intestinales productoras de IgA comparado con el silvestre; en este mismo trabajo los investigadores realizaron cruces de ratones C2d con ratones que expresan el gen *Xid* que confiere deficiencia en células B1a, observaron que la progenie de ratones doblemente deficiente (C2d-*Xid*) presentaron 10 veces menos IgA sérica y secretora comparando con los otros ratones de la misma camada que no eran doblemente deficientes, con esto concluyeron que las células B1a juegan un papel esencial para la síntesis de la mayor parte de IgA en ratones C2d. Por tal motivo pensamos que la IgA detectada en nuestros animales es proveniente de células B1 y no de B2. La respuesta IgA T-independiente también ha sido observada en inmunizaciones con rotavirus encontrando una respuesta inmune específica (Franco & Greenberg, 1997). Se ha demostrado que esta IgA timo-independiente es derivada de los linfocitos B1 que se forman en el compartimiento peritoneal (Cróese, *et al.*, 1989; Bos, *et al.*, 1988; Snider, *et al.*, 1999) y es difundida en la lámina propia intestinal. A diferencia de la IgA timo dependiente que proviene de los linfocitos B2 que se originan en médula ósea (Fagarasan & Honjo., 2000). En el 2006 Bergqvist *et al.*, observan en ratones knockout de CD40 que el cambio de isotipo a IgA puede ser independiente de la señalización de esta molécula y de la formación de centros germinales y no ocurre en la lamina propia intestinal, argumentando sitios inductivos alternativos para el cambio de isotipo hacia IgA intestinal contra antígenos independientes de células T fuera del GALT y la lamina propia.

Los resultados obtenidos en el ensayo de reto observamos que si hay un incremento de la concentración de IgA intestinal casi del doble en los ratones inoculados (tabla 9), lo cual nos está indicando que están respondiendo ante el estímulo. No sabemos contra que componente bacteriano va dirigida la respuesta, ni como es el mecanismo de producción de IgA., estas preguntas se intentarán responder en estudios subsecuentes.

8.0 CONCLUSIONES

- 1.- Para reproducir el modelo murino de ETEC recomendamos administrar mínimo una dosis de 1.5×10^8 .
- 2.- Se determinó que las UFC de ETEC/g de heces a las 24 h que nos indiquen que el ratón ha recibido la cantidad de bacterias adecuada para poder ser colonizado debe de ser $\geq 1 \times 10^6$.
- 3.- Determinamos que las UFC de ETEC/g de heces, en este modelo durante la infección es en promedio de 10^5 .
- 4.- Logramos persistencias de casi 6 meses.
- 5.- Se demostró la presencia de IgA intestinal en ratones KO del CD40L.
- 6.- Los ratones KO del CD40L son capaces de incrementar sus niveles de IgA intestinal como respuesta a un reto con ETEC.

PERSPECTIVAS

Se determinará por ELISA o Western blot la especificidad de la IgA identificada en las heces de estos ratones. Así como también trataremos de determinar si la respuesta es de linfocitos B1 o de B2.

9.0 BIBLIOGRAFÍA

- Abrahao T.B., E. Freymuller, R.A. Mortara, J.D. Lopes, M. Mariano. 2003. Morphological characterization of mouse B1 cells. *Immunobiology*. 208: 401-11.
- Adachi J.A., L. Ostrosky-Zeichner, C. D. Ericsson & H.L. DuPont. 2000. Empirical antimicrobial therapy for traveler's diarrhea. *Glin. Infect. Dis.* 2000; 31:1079-1083.
- Aldred M.J., W.G. Wade, D.R. Llewelyn & D.M. Walker. 1986. Class-specific antibodies to *Streptococcus mutans* in human serum, saliva and breast milk. *J immunol Methods*; 87(1): 103-108.
- Allen K.P., M.M. Randolph & J.M. Fleckenstein. 2006. Importance of Heat-Labile enterotoxin in colonization of the Adult mouse small intestine by Human Enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Infection and Immunity*. 74: 869-875.
- Al-Majali A.M., P. Robinson, E.K. Asem, C. Lamar, M.J. Freeman & A.M. Saeed. 1999. Used of flow cytometry to measure the interaction between *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin and its intestinal receptor in mice. *J. Immunol. Methods*. 222:65-72.
- Aruffo A., M. Farrington & D. Hollenbaugh. 1993. The CD40 ligand, gp 39, is defective in activated T cells from patient with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell*; 72:291-300.
- Berland R. & H.H. Wortis. 2002. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol*. 20: 253-300.
- Bergqvist P., E. Gärdby, A. Stensson, M. Bemark & N.Y. Lycke. 2006. Gut IgA class switch recombination in the absence of CD40 does not occur in the lamina propria and is independent of germinal centers. *The Journal of Immunology*. 177:7772-7783.
- Bern C., J. Martínez, I. De Soya & R.I. Glass. 1992. The magnitude of the global problem of diarrheal disease: a ten year update. *Bull WHO*. 70:704-14.
- Blanco M., J.E. Blanco, E.A. González, A. Mora, W. Jansen, T.A. Gomes, L.F. Zerbini, T. Yano, A.F. Pestana de Castro, & J. Blanco. 1997. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes. Relationship with toxic phenotypes. *Journal of clinical microbiology*. 35:2956-2963.
- Beutler B. & A. Poltorak. 2000. Sepsis and evolution of the innate immune response. *Crit Care Med*. 2000; 29:52-57.
- Bergamini T.M., P.M. Lamont, W.G. Cheadle & H.C. Polk. 1984. Combined topical and systemic antibiotic prophylaxis in experimental wound infection. *Am J Surg*. 147 (6):753-6.

- Blanco J., M. Blanco, J.E. Blanco, A. Mora, M.P. Alonso, E.A. González & M.I. Bernardez. 2001. Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia*. Manual de microbiología. McGraw-Hill Interamericana. Madrid. pp. 301-325.
- Buckley R.H. 1999. Primary Immunodeficiency Diseases. In: Paul WE, Ed. Fundamental Immunology. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1427-53.
- Burns J.W. 1996. Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity [see coments]. Science. 272: 104-107.
- By Blair R, Renshaw, William C. Fanslow, Richard J. Armitage, Kim A. Campbell, Denny Liggitt, Barbara Wright, Barry L. Davidson, Charles R. Maliszewski. 1994. Humoral immune responses in CD40 ligand-deficients mice. J. Exp Med 180:1889-1900.
- Byrd W., & F.J. Cassels. 2006. The encapsulation of enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factor CS3 in biodegradable microspheres enhances the murine antibody response following intranasal administration. Microbiology. 152: 779–786.
- Calamade K.L., K.I. Lin & C. Tunyaplin. 2003. Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. Annu Rev Immunol. 21: 205-30.
- Campbell K.A., P.J. Owendale, M.K. Kennedy, W.C. Fanslow, S.G. Reed & C.R. Maliszewski. 1996. CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to *Leishmania major*. Immunity. 4:283-289.
- Campos-Neto A., P. J. Owendale, T. Bement, T.A. Koppi, W.C. Fanslow, M.A. Rossi & M.R. Alderson. 1998. CD40 ligand is not essential for the development of cell-mediated immunity and resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Immunology 160: 2037-2041.
- Carlson B. & L.A. Hanson. 1994. Immunologic effects of breast-feeding on the infant. In Ogra P., M.E. Lamm, W. Stroberg, J.R. McGhee, J. Bienestock , eds. Handbook of mucosal immunology. London Academic Press, 1994:653-666.
- Carrithers S.L., S.J. Parkinson, S.D. Goldstein, P. Park, D.C. Robertson & S.A. Waldman. 1994. Gastroenterology 107, 1653-1661.
- Carrithers S.L. 2003. Diarrhea or colorectal cancer: Can bacterial toxins serve as a treatment for colon cancer? PNAS. 100 (6): 3018-3020.
- Carsetti R., M.M. Rosado & H. Wardmann. 2004. Peripheral development of B cell in mouse and man. Immunol Rev. 197: 179-91.
- Cassels F.J., & M.K. Wolf. 1995. Colonization factors of diarrheagenic *E. coli* and their intestinal receptors. J Ind Microbiol. 15:214-226.

- Cosyns M., S. Tsirkin, M. Jones, R. Flavell, H. Kikutani & A.R. Hayward. 1998. Requirement of CD40-CD40 ligand interaction for elimination of *Cryptosporidium parvum* from mice. *Infection and immunity* 66: 603-607.
- Dallman C.P., W.M. Jonson & G. Packham. 2003. Differential regulation of cells survival by CD40. *Apoptosis* 8:45-53.
- DuPont H.L., S.B. Formal, R.B. Hornick, M.J. Snyder, J.P. Libonati, D.G. Sheahan, E.H. LaBreck & J.P. Kalas. 1971. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *N. Engl. J. Med.* 285: 1-9.
- Dirección General de Epidemiología. 2002. Boletín semanal de epidemiología. 52:12.
- Dong C. & R.A. Flavell. 2000. Cell fate decision: T-helper 1 and 2 subsets in immune responses. *Arthritis Research.* 2: 179-188.
- Edfors-Lilja A., I. Inger, B. Gahne & H. Peterson. 1985. Genetic influence on antibody response to two *Escherichia coli* antigens in pigs.II. Diference in response between paternal half-sibs. Swedish University of Agricultural Science. Dept. of Animal Breeding and Genetics.
- Edwards P.A.W. 1978. Is mucus a selective barrier for macromolecules? *Br Med Bull* 1978; 34:55-6.
- Eslava C., J. Mateo & A. Cravioto. 1994. Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. En: diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Giono S, Escobar A, Valdespino JL. Secretaria de Salud. México,; 251.
- Estrada-García M.T., Z.D. Jiang, J. Adachi, J.J. Mathewson & H.L. DuPont. 1999. Traveler's intestinal IgA response to naturally acquired enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), while in an endemic area. In preparation
- Estrada-García M.T., Z.D. Jiang, J. Adachi, J.J. Mathewson & H.L. DuPont. 2002. Intestinal immunoglobulin A response to naturally acquired enterotoxigénic *Escherichia coli* in US travelers to an endemic area of México. *J Travel Med* 2002; 9:247-250.
- Evans D.J., L.C. Chen, G.T. Curlin & D.G. Evans. 1972. Stimulation of adenyl cyclase by *Escherichia coli* enterotoxin. *Nat New Biol.* 1972 Apr 5;236(66):137-138.
- Fagarasan S. & T. Honjo. 2000. T-independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science.* 290: 89-92.
- Fagarasan, S. & T. Honjo. 2003. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 63-72.
- Fagarasan S. & T. Honjo. 2004. Regulation of IgA síntesis at mucosal surfaces. *Curr Opin Immunol.* 16: 277-283.

- Fearon D.T. & R.M. Locksley. 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*. 1996. 272:50-53.
- Festing M.F. 1985. *Index international of the laboratory animals. Manufactured in the United States of America*. Varick Streed. New York.
- Festing, M.F.W. 1998. Inbred Strain of mice: C57, Mouse Strain Characteristic, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine. World Wide Web
- Fischer G.M., L.A. Solt & M. Hastings. 2001. Splenic and peritoneal B-1 cells differ in terms of transcriptional and proliferative features that separate peritoneal B-1 from splenic B-2 cell. *Cell Immunol*. 213: 62-71.
- Foussat A., K., C. Balabanian & A. Amara. 2001. Production of stromal cell-derived factor 1 by mesothelial cells and effects of this chemokine on peritoneal B lymphocytes. *Eur J Immunol*. 31: 350-9.
- Foy T.M., A. Aruffo, J. Bajorath, J.E. Buhlmann & R.J. Noelle. 1996. Immune Regulation by CD40 and its Ligand GP39. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:591-617.
- Flores-Abuxapquí J.J., G.J. Suárez-Itoil, M.R. Heredia-Navarrete, M.A. Puc-Franco & J. Franco-Monsreal. 1994. Frequency of enterotoxigenic *Escherichia coli* in infants during the first three months of life. *Arch Med Res*. 25:303-307.
- Franco M.A., C. Tin, L. Rott, J.L. VanCott, J.R. McGhee & H.B. Greenberg. 1997. Evidence for CD81 T cell immunity to murine rotavirus in the absence of perforin, fas and gamma interferon. *J Virol*. 71:479-86.
- Freter R., P.C.M. O'Brien & S.A. Halstead. 1978. Adhesion and chemotaxis as determinants of bacterial association with mucosal surfaces. *Adv Exp Med Biol* 1978; 107:429-37.
- Gardby E., P. Lane & N. Lycke. 1998. Requirements for B7-CD28 Costimulation in Mucosal IgA Responses: Paradoxes observed in CTLA4-Hy1 Transgenic Mice. *Journal of Immunology*. 161: 49-59.
- Garrido F., G. Borges, V. Cárdenas, J.L. Bobadilla, J. Ibarra & C. Ruiz-Matus. 1990. Mortalidad postneonatal por diarreas: un estudio de casos y controles. *Salud Pública de México*. 32:261-268.
- Gorbach S.L. 1971. Intestinal microflora. *Gastroenterology* 1971; 60:1110-29.
- Gyles C., M. So & S. Falkow. 1974. The enterotoxin plasmids of *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1974 Jul; 130(1):40-49.

- Gyles C.L. 1994. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Wallingford, U.K.
- González P., A. Sánchez, P. Rivera, C. Jiménez & F. Hernández. 1997. Rotavirus and corona virus outbreak, etiology of annual diarrhea in Costa Rican children. *Rev. Biol. Trop.* 1997. 45:989-991.
- Grewal I.S., P. Borrow, E.G. Parmer, M.B. Oldstone & R.A. Flavell. 1997. The CD40-CD154 system in anti-infective host defense. *Current Opinion in Immunology*. 9: 491-497.
- Grewal I.S. & A.L. Flavell. 1998. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 1998;16: 111-135.
- Hao Z. & K. Rajewsky. 2001. Homeostasis of peripheral B cells in the absence of B cell influx from the Bone Marrow. *J Exp Med*. 194: 1151-1164.
- Hardy R.R. & K. Hayakawa. 1994. CD5 B cell, a fetal B cell lineage. *Adv Immunol*. 55: 297-339.
- Hardy R.R. & K. Hayakawa. 2001. B cell development pathways. *Annu Rev Immunol*; 19: 595-621.
- Hayakawa K. & R.R. Hardy. 2000. Development and function of B-1 cells: Commentary. *Current Opinion in Immunology*. 12: 346-354.
- Herzenberg L.A. 2000. B-1 cells: the lineage question revisited. *Immunological Reviews*. 175: 9-22.
- Hörnquist E., L. Ekman, D. Grdic, K. Schon, & N. Lycke. 1995. Paradoxical IgA Immunity in CD4-deficient mice: lack of cholera toxin specific protective immunity despite normal gut mucosal IgA differentiation. *J Immunol*. 155: 28 77.
- Horstman, A.L., & M.J. Kuehn. 2000. Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **275**: 12489–12496.
- Hunt P.D. and S.J. Hardy. 1991. Heat-labile enterotoxin can be released from *Escherichia coli* cells by host intestinal factors. *Infect Immun*. 59, 168-171, PubMed ID: 91099956.
- Ishida H., R. Hastings, J. Kearney & M. Howard. 1992. Continuous anti-interleukin 10 antibody administration depletes mice of Ly-1 B cells but not conventional B cells. *J Exp Med*. 175: 1213-20.
- Ishida H., T. Muchamuel, S. Sakaguchi, S. Andrade, S. Menon & M. Howard. 1994. Continuous administration of anti-interleukin 10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/W F1 mice. *J Exp Med*. 179: 305-10.

- Janeway J.C.A. 1992. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunology Today*. 1992. 13:11-16.
- Janeway J.C.A. & R. Medzhitov. 1998. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive innate response. *Semin. Immunol.* 1998. 10:344-350.
- Janeway J.C.A., P. Travers, M. Walport & J.D. Capra. 2000. *Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 1ª Edición.* Masson. Barcelona. pp. 292-328.
- Janeway C.A., P. Travers, M. Walport & M.J. Shlomchik. 2003. *Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 2ª Edición.* Masson. Barcelona.
- Kantor A.B. & L.A. Herzenberg. 1993. Origin of murine B cell lineages. *Annu Rev Immunol.* 11: 501-38.
- Kaper J.B. & M. O'Brien. 1998. *Escherichia coli*. 0157:H7 and other shiga toxin-producing *E.coli* strains. ASM Press, Washintong.
- Kroese F.G., E.C. Butcher, A.M. Stall, P.A. Lalor, S. Adams & L.A. Herzenberg. 1989. Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self-replenishing pre-cursors in the peritoneal cavity. *Int Immunol.* 1: 75-84.
- Kroese F.G., W.A. Ammerlaan & G.J. Deenen. 1992. Location and function of B-cell lineages. *Ann N Y Acad Sci.* 651: 44-58.
- Kupersztoch, Y. M., K. Tachias, C. R. Moomaw, L. A. Dreyfus, R. G. Urban, C. Slaughter & S. Whipp. 1990. Secretion of methanol-soluble heat-stable enterotoxin (STb): energy- and secA-dependent conversion of pre-STb to an intermediate indistinguishable from the extracellular toxin. *J. Bacteriol.* 172:2427- 2432.
- Kosek M., C. Bern & R.L. Guerrant. 2003. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull WHO.* 82(3):197-204.
- Kilian M., J. Mestecky & M.W. Russell. 1988. Defense mechanism involving Fc-dependent functions of immunoglobulin A and their subversion by bacterial immunoglobulin A proteases. *Microbiol Rev;* 52(2): 296-303.
- Kraft S.C., R.M. Rothberg, C.M. Knauer, A.C. Svoboda, L.S. Monroe & R.S. Farr. 1967. Gastric acid output and circulating anti-bovine serum albumin in adults. *Clin Exp Immunol;* 2:321-30.
- Lake A.M., K.J. Bloch, K.J. Sinclair & W.A. Walker. 1980. Anaphylactic release of intestinal goblet cell mucus. *Inmunology;* 39:173-8.
- Lane P., C. Burdest, S. Hubele, D. Scheidegger, U. Muller, F. McConnell & K. Vilbois. 1994. B cell function in mice transgenic for mCTLA4-Hy1: Lack of germinal centers correlated with

poor affinity maturation and class switching despite normal priming of CD4⁺ T cell. *J. Exp. Med.* 179: 819-830.

- Lang A.L., Y.L. Tsai, C.L. Mayer, K.C. Patton & C.J. Palmer. 1994. Multiplex PCR for detection of the heat-labile toxin gene and shiga-like toxin I and II genes in *Escherichia coli* isolated from natural waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (9): 3145-3149.
- Levine M.M., P. Ristaino, R.B. Sack, J.B. Kaper, F. Ørskov & I. Ørskov. 1983. Colonization Factor Antigens I and II and type1 somatic pili in Enterotoxigenic *Escherichia Coli*: Relation to enterotoxin type. *Infection and Immunity.* 39: 889-897.
- Levine M.M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155:377-389.
- Lin K.I., C. Tunyaplin & K. Calamade. 2003. Transcriptional regulatory cascades controlling plasma cell differentiation. *Immunol Rev.* 194: 19-28.
- Lopez-Saucedo C., J.F. Cerna, N. Villegas-Sepulveda, R. Thompson, F.R. Velazquez, J. Torres, P.I. Tarr. T. Estrada-Garcia. 2003. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associate with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases.* 9:127-131.
- Lycke N., L. Eriksen & J. Holmgren. 1987. Protection against cholera toxin after oral immunization is thymus dependent and associated with intestinal production of neutralising IgA antitoxin. *Scand. J. Immunol.* 25: 413-419.
- Lycke N. 1999. Lack of J chain inhibits the transport of gut IgA and abrogates the development of intestinal antitoxic protection. *J. immunol.* 163: 913-919.
- Madigan J., J. Martinko & J. Parker. 1999. *Brock Biology of Microorganism.* 9a edición. Prentice Hall. USA. 1104 pp.
- Mackey M.F. & R.J. Noelle. 1998. The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cell. *Journal of Leukocyte Biology* 1998; 63: 418-428.
- Macpherson A.J., D. Gatto, E. Sainsbury, G. R. Harriman, Hans Hengartner, & R.M. Zinkernagel. 2000. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science.* 288: 2222-2226.
- Macpherson A.J., L. Hunziker, K. McCoy & A. Lamarre. 2001. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganism. *Microbes Infect.* 3: 1021-1035.
- McGowan I., A. S. Hawkins, & I. V. Weller. 1993. The natural history of cryptosporidial diarrhoea in HIV-infected patients. *AIDS* 7:349-354.

- Marcotte H. & M.C. Lavoie. 1998. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev*; 62(1): 71-109.
- Martin F., A.M. Oliver & J.F. Kearney. 2001. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-Independent blood-borne particulate antigens. *Immunity*. 14: 617-629.
- Martin F. & J.F. Kearney. 2002. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* 2: 323-335.
- Marriott I., E.K. Thomas & K.L. Bost. 1999. CD40-CD40 ligand interactions augment survival of normal mice, but not CD40 ligand knockout mice, challenged orally with *Salmonella dublin*. *Infection and Immunity* 67: 5253-5257.
- Mazanec M.B., J.G. Nedrub, C.S. Kaetzel & M.E. Lamm. 1993. A threetiered view of the role of IgA in mucosal defense. *Immunol Today* ; 14:430-435.
- Mc Veigh A., A. Fasano, D.A. Scott, S. Jelacic, S.L. Moseley & D.C. Robertson. IS1414 an *Escherichia coli* insertion sequence with a heat-stable enterotoxin gene embedded in a transposase-like gene. *Infect Immun* 2000;68:5710-5715.
- Muhldorfer I. & J. Hacker. 1994. Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microb. Phathog.*, 16: 171-181.
- Murakami M. & T. Honjo. 1995. Involment of B-1 cells in mucosal immunity and autoimmunity. *Immunology Today*. 16: 534-539.
- Medzhito R. & J.C.A. Janeway. Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* 2000. 343:338-344.
- Mestecky J. 1987. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J Clin immunol*; 7(4): 265-276.
- Michetti P., M.J. Mahan, J.M. Schlauch, J.J. Mekalanos & M.R. Neutra. 1992. Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun*; 60(5):1786-92.
- Murray B.E., D.J. Evans Jr, M.E. Peñaranda & D.G. Evans. 1983. CFA/I-ST Plasmids: Comparison of Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) of serogroups O25, O63, O78, and O128 and mobilization from an R Factor-Containing Epidemic ETEC Isolate. *Journal of Bacteriology*. 153:566-570.
- Murray B.E., J.J. Mathewson, H.L. DuPont & W.E. Hill. 1987. Utility of oligodeoxyribonucleotide probes for detecting enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Infec. Dis.* 155: 809- 811.
- Nataro J.P., & J.B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11(1):178-181.

- Nisitani S., T. Tsubata, M. Murakami & T. Honjo. 1995. Administration of interleukin-5 or -10 activates peritoneal B-1 cells and induces autoimmune hemolytic anemia in anti-erythrocyte autoantibody-transgenic mice. *Eur J Immunol.* 25: 3047-52.
- Olarte J. 1985. Etiopatogénia de las diarreas infecciosas. *Bol. Med. Hosp. Inf. Méx.* 42(1): 66-72.
- Oliver A.M., F. Martin & J.F. Kearney. 1999. IgM^{high} CD21^{high} lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J Immunol* 162: 7198-7207.
- Organización Panamericana de la Salud, 2004: <http://www.mex.ops-oms.org/boletin.htm>
- Padigel U.M. & J.P. Farrell. 2003. CD40-CD40 ligand costimulation is not required for initiation and maintenance of a Th-1 type response to *Leishmania major* infection. *Infection and Immunity* 71:1389-95.
- Peruski L.F., B.A. Kay, R.A. El-Yazeed, S.H. El-Etr, A. Cravioto, T.F. Wierzba, N. Rao, N. El-Ghorab, H. Shaheen, S.B. Khalil, K. Kamal, M. Wasfy, A.M. Svennerholm, J.D. Clemens & S.J. Savarino. 1999. Phenotypic diversity of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains from a community-based study of pediatric diarrhea in periurban Egypt. *J. Clin. Microbiol.* 38(2): 803-805.
- Pierce-Cretel A., M. Pamblanco, G. Strecker, J. Montreuil & G. Spik. 1981. Heterogeneity of the glycans O-glycosidically linked to the hinge region of secretory immunoglobulins from human milk. *Eur J Biochem;* 114(1): 169-78.
- Phillips R.W: Normal function of the gastrointestinal mucosa and changes caused by injury and metabolic stress. In Roche AF editor: *The gastrointestinal response to injury, starvation and enteral nutrition.* Columbus, Ohio. Ross Laboratories 1988; pp 6-8.
- Quinto Informe de Gobierno 2005: <http://quinto.informe.fox.presidencia.gob.mx>
- Ramos-Payan R., M. Aguilar-Medina, S. Estrada-Parra, J.A. González y Merchand, L. Favila-Castillo, A. Monroy-Ostria & I.C.E. Estrada-García. 2003 Quantification of Cytokine Gene Expresión Using an Economical Real-Time Polymerase Chain Reaction Meted Based on SYBR Green I. *Scandinavian Journal of Immunology.* 57:439-445.
- Renegar K.B. & P.A. Small. 1991. Passive transfer of local immunity to influenza virus infection by IgA antibody. *J. Immunol.* 146: 1972-1978.
- Renegar K.B. & P.A. Small, Jr. 1991. Immunoglobulin A mediation of murine nasal anti-influenza virus immunity. *J. Virol.* 65: 2146-2148.

- Renegar K.B., C.D. Johnson, R.C. Dewitt, B.K. King, J. Li, K. Fukatsu & K.A. Kudsk. 2001. Impairment of mucosal immunity by total parenteral nutrition: requirement for IgA in murine nasotracheal anti-influenza immunity. *J Immunol*; 66(2): 819-25.
- Riley L.W., E. Castro-Muñoz, R.J. Zárate, B. Sibley, J. Keller, L.G. Zárate, M. Millan-Velasco & G.K. Schoolnik. 1990. Factores de riesgo de diarrea infantil aguda en una comunidad rural de Chiapas, México. Una estrategia de intervención. *Bol. Of. Sanit. Panamá*. 108(2):93-99.
- Roit, I., J. Bostoff & D. K. Male. 1990. *Immunology*. 2nd Edition. Gower Medical Publishing, London.
- Ruddock L.W. 1995. Kinetics of acid-mediated disassembly of the B subunit pentamer of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Molecular basis of pH stability. *J Biol Chem* 270, 29953-29958, PubMed ID: 96102052.
- Salmond R.J., J.A. Luross & N.A. Williams. 2002. Immune modulation by the cholera-like enterotoxins. *Expert Rev Mol Med*. 2: 1-16.
- <http://www.revista-anaporc.com/curso/cuarto3.htm>
- Sears C.L. & J.B. Kaper. 1996. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol. Rev.*, 60 (1):167-215.
- Sepúlveda J., W. Willet & A. Muñoz. 1998. Malnutrition and diarrhea. Longitudinal study among urban Mexican children. *Am. J. Epidemiol.* 1998. 127:365-376.
- Simon G.L. & S.L. Gorbach. 1982. Intestinal microflora. *Med Clin North Am*; 66:557-74.
- Sixma T.K. 1993. Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. *J Mol Biol* 230, 890-918, PubMed ID: 93240541.
- Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica de la Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud. 2005: <http://www.salud.gob.mx>
- Soong L., J.C. Xu, I.S. Grewal, P. Kima, J. Sun, B.J. Longley Jr, N.H. Ruddle, D. McMahon-Pratt & R.A. Flavell. 1996. Disruption of CD40-CD40 ligand interactions results in an enhanced susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection. *Immunity*. 4: 263-273.
- Snider D.P., H. Liang, I. Switzer & B.J. Underdown. 1999. IgA production in MHC class II-deficient mice is primarily a function of B-1a cells. *International Immunology*. 11: 191-198.
- Spangler B.D. 1992. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* 56, 622-647, PubMed ID: 93125438.
- Spencer J., M.E. Perry & D.K. Dunn-Walters. 1998. Human marginal-zone B cells. *Immunology Today*. 19: 421-426.

- Springer G.F. 1970. Importance of blood-group substances in interactions between man and microbes. *Ann NY Acad Sci* 1970; 169:134-52.
- Stacy-Phipps S., J.J. Meca & J.B. Weiss. 1995. Multiplex PCR assay and simple preparation method for stool specimens detected enterotoxigenic *Escherichia coli* during the course of infection. *J. Clin. Microbiol.*, 33 (5): 1054-1059.
- Stoll B.J., A.M. Svennerholm, L. Gothefors, D. Barua, S. Huda & J. Holmgren. 1986. Local and systemic antibody responses to naturally acquired enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea in an endemic area. *J. Inf. Dis.* 153: 527-534.
- Strober W., S. Fagarasan & N. Lycke. 2005. IgA B cell development. In *mucosal immunology*, 3rd Ed. J. Mestecky, M. E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock, J. R. McGhee, and L. Mayer, eds. Academic Press, Boston. pp. 583-616.
- Tóme P., H. Reyes, L. Rodríguez, H. Guiscafré & G. Gutiérrez. 1996. Muerte por diarrea aguda en niños: un estudio de factores pronósticos. *Salud Pública de México.* 38(4):227-235.
- Torres-Medina A. 1984. Effect of combined rotavirus and *Escherichia coli* in neonatal gnotobiotic calves. *Am. J. Vet. Res.* 45: 643-651.
- Tercer Informe de Gobierno.2003. <http://www.presidencia.gob.mx>.
- Thompson M.R. 2005. Desarrollo de un modelo murino de infección y persistencia con una cepa de referencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica, aislada de humanos. Tesis de Maestría en Ciencias. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN.
- Tumang J.R., R. Frances, S.G. Yeo & T.L. Rothstein. 2005. Spontaneously Ig-secreting B-1 cells violate the accepted paradigm for expression of differentiation-associated transcription factors. *J Immunol.* 174: 3173-77.
- Urzúa M.F. 2004. Influencia de la dosis de inóculo inicial en la infección por *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino según el sexo.
- Valle G.M., M.M. Decalo, L. McCook, M. Piloto, C. Sebazco, & V. Ruiz. 2005. Modelo de herida infectada. *Rev Cubana Med Milit.* 34: 23-27.
- Vega F.L. 2002. Reportes de vigilancia epidemiológica que el pediatra debe conocer. *Rev. Méx. Pediatr.* 69(1):3-4.
- Vázquez-López H.G. 2003. Desarrollo de un modelo murino para la infección por EPEC típica. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

- Walker W.A. 1976. Host defense mechanisms in the gastrointestinal tract. *Pediatrics* 1976; 57:901-906.
- Walker W.A. 1978. Antigen handling by the gut. *Arch Dis Child*; 53:527-31.
- Wells C.L. & S.L. Erlandsen. 1988. Factors influencing the translocation of normal intestinal bacteria, including a possible association with a dietary lectin. In Roche af editor. *The gastrointestinal response to injury, starvation and enteral nutrition*. Columbus. Ohio 1988 Ross Laboratories pp 27-31.
- World Health Organization. 1990. A manual for the treatment of acute diarrhoea for use by physicians and other senior health workers. Geneva: Program for control of Diarrhoeal Diseases, World Health Organization, WHO/CDD/SER/80.2.Rev, 2.
- World Health Organization. 1999. New frontiers in the development of vaccines against enterotoxigenic (ETEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *E. coli* infections. *Weekly Epidemiol. Rec.* 13: 98-100.
- World Health Organization. 2004. Report of the meeting on future directions for research on ETEC vaccines for Developing Countries. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Byrd W. & J. Cassels. 2006. Long-Term systemic and mucosal antibody responses measured in BALB/c mice following intranasal challenge with viable enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 46: 262-268.
- Xu J., T.M. Foy, J.D. Laman, E.A. Elliot, J.J. Dunn, T.J. Waldschmidt, J. Elsemore, R.J. Noelle & R.A. Flavell. 1994. Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity.* 1: 423-431.
- Zhou P. & R.A. Seder. 1998. CD40 ligand is not essential for induction of type 1 cytokine responses or protective immunity after primary or secondary infection with *Histoplasma capsulatum*. *Journal of Experimental Medicine.* 187: 1315-1324.