

11680

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

DOCTORADO EN CIENCIAS
(Microbiología)

EVALUACIÓN DE LAS ALTERACIONES INDUCIDAS EN EL CONEJO POR
Escherichia coli 0157:H7 INOCULADA EN EL APÉNDICE CECAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

(Microbiología)

PRESENTA

GUILLERMO VALDIVIA ANDA

DIRECTOR : Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo

ASESOR: Dr. Jorge Tórtora Pérez.

Cuautitlan Izc. , Estado de México, Junio del 2002.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

DEDICATORIA

A mis padres:

Que siempre me han marcado lo correcto del sendero y son el mejor ejemplo de amor.

A mis hijos

Que amo y han sido mi mejor motivación de superación, mayor orgullo y para quienes deseo ser el mejor ejemplo en sus vidas.

A mi esposa

Quien me ha apoyado cuando el tiempo necesitaba.

A mis amigos

En quienes he encontrado el apoyo y el reto para ser mejor cada día.

A todos aquellos

Que me dieron algo mas que su tiempo para llegar a la terminación de este trabajo.

A los conejos.

Que sin su ayuda y sacrificio no hubiera podido realizar este trabajo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A mi Director y Asesor

Juan Antonio Montaraz Crespo y Jorge Tórtora Pérez que me dedicaron su tiempo, sus consejos y observaciones a todo lo largo de este trabajo, siempre supe que contaba con su confianza y amistad.

A todo el personal

Del Laboratorio DIVET, VALAR y la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal, que apoyaron para que este trabajo fuera posible.

Al Comité Tutorial

Dra. Silvia Giono C., Dr. Carlos Eslava C., Dr. Jorge Tórtora P., Dr. Juan Antonio Montaraz C. que se preocuparon en todas las reuniones para que el trabajo fuera mejor y me dieron consejos atinados.

Al Jurado.

Presidente :	Dra. Silvia Giono Cerezo.
Primer vocal:	Dr. Hipolito Manjarrez Hernández.
Segundo vocal:	Dr. Carlos Eslava Campos.
Tercer vocal:	Dr. José Luis Puente García.
Secretario:	Dr. Juan A. Montaraz Crespo.
Primer suplente:	Dr. Vianney Ortíz Navarrete.
Segundo suplente:	Dr. Francisco Suarez Güemes.

Que revisaron finalmente el trabajo y me hicieron observaciones importantes para su mejora.

A Díos y a todos los que están junto a Él.

Porque en ti creo y a ellos los recuerdo
Porque cada día reconozco tu grandeza y sé que están a mí lado.
Porque me escuchaste cuando más te necesitaba y en Ustedes muchas veces me apoye.

A todos **GRACIAS** por contar con Ustedes

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
COORDINACION DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**EVALUACIÓN DE LAS ALTERACIONES INDUCIDAS EN EL CONEJO POR
Escherichia coli 0157:H7 INOCULADA EN EL APÉNDICE CECAL**

ALUMNO :

**GUILLERMO VALDIVIA ANDA
Maestro en Ciencias (Microbiología)
Químico Bacteriólogo Parasitólogo
Médico Veterinario Zootecnista**

TUTOR : PhD Juan Antonio Montaraz Crespo

DIRECTOR : Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo

ASESOR: Dr. Jorge Tórtora Pérez.

PROGRAMA:

DOCTORADO EN CIENCIAS (Microbiología)

COMITÉ TUTORIAL

Dra. Silvia Giono Cerezo

Dr. Carlos Eslava Campos

Dr. Jorge Tórtora Pérez

Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo

Dr. Eliseo Hernández B.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

RESUMEN

Las cepas de *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC), están involucradas en la Colitis Hemorrágica y el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) en humanos, en la actualidad no se cuenta con un modelo que permita estudiar la patogenicidad de las alteraciones inducidas por estas bacterias. Previamente se describió un modelo en conejos inoculando *Escherichia coli* O157:H7 en el apéndice cecal y se logró reproducir la mayor parte de las alteraciones asociadas al SUH. El objetivo del presente trabajo fue la caracterización del modelo y de establecer los mecanismos iniciales de daño que le permiten al serotipo O157:H7 desarrollar las alteraciones en los conejos.

Se realizó una evaluación del desarrollo del apéndice cecal del conejo, posteriormente se inocularon bacterias en el apéndice cecal, modificando la concentración bacteriana, los productos bacterianos involucrados, el tiempo de acción y se evaluaron las lesiones cecales y del riñón de los animales inoculados.

El apéndice cecal aparentemente es un órgano linfoide secundario. Con 10^4 bacterias viables, se genera un modelo de infección crónica, observándose que los animales más jóvenes son susceptibles al daño intestinal. Se observó una secuencia en la presentación de alteraciones, iniciando con el cuadro intestinal y renal y finalmente susceptibles a alteración del SNC y la disminución de la respuesta inmune.

Asimismo, se requirió de la invasión bacteriana a la mucosa y submucosa del apéndice cecal; además, que se encuentren al mismo tiempo el LPS y las toxina SLT para desarrollar las lesiones características. El principal papel del LPS bacteriano parece ser que es el de aumentar la expresión del receptor Gb3 para la toxina. También se observó la participación del fenómeno vascular en el riñón y la destrucción intravascular de eritrocitos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Abstract.

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are involved in hemorrhagic colitis and the haemolytic uremic syndrome (HUS) in humans. To today, there is not a model that allows the study of the pathogenesis induced by this bacteria. We have previously described a rabbit animal model, *Escherichia coli* O157:H7 was inoculated in the ceccal appendix and most of the characteristic HUS were observed. The goal of the present work was the characterization of the model and the early mechanisms by which EHEC O157:H7 induced alterations in the rabbit animal model.

The first step was to evaluate the normal development of the ceccal appendix in the rabbit. Caecum was inoculated in the appendix, with different bacterial concentrations and your products. The kinetics lesion formation in the caecum appendix and kidneys was assessed.

The ceccal appendix is a secondary lymphoid organ. A concentration of 10^4 viable bacteria were enough for the establishment of a model of chronic infection. Young animals developed initially the intestinal lesion, and intestinal and renal alterations as subsequent events. Finally central nervous system (CNS) alteration and reduced immune response.

In order to establish a characteristic lesion, the bacterial invasion of the appendix submucose was necessary, as well as the presence of LPS (Lipopolysaccharide) and SLT (Shiga Like toxin). The principal role of LPS probably was to increase the expression of the Gb3 receptor for the toxin. It was also observed the participation of vascular phenomena in the kidney and the intravascular destruction of erythrocytes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE:

1.-INTRODUCCION.....	1 - 4
1.1 <i>Escherichia coli</i>	
1.2 Factores de virulencia	
1.3 Verotoxinas	
1.4 Síndrome Urémico Hemolítico	
1.5 Modelos animales	
2.- ANTECEDENTES -----	4 - 9
2.1 Desarrollo Morfohistológico del apéndice cecal	
2.2 Modelo animal en conejos	
2.3 Patogénesis de las infecciones por EHEC	
2.4 Expresión de los receptores para Stx	
2.5 Lesiones en las infecciones por EHEC	
3.- JUSTIFICACION	9
4.-OBJETIVOS	9-10
4.1 Objetivo general	
4.2 Objetivos específicos	
5.- MATERIAL Y MÉTODOS	
I.- DESARROLLO DEL APÉNDICE CECAL DEL CONEJO-----	11
5.1 Desarrollo morfohistológico del apéndice cecal del conejo	
II.-CARACTERIZACIÓN DEL MODELO ANIMAL EN EL CONEJO.	
-----	11-17
5.2 Edad de los animales	
5.3 Concentración de las bacterias inoculadas	
5.4 Localización de la bacteria	
I.- Obtención del suero hiperinmune	
II.- Ubicación de <i>E.coli</i> EDL933 en el apéndice cecal del conejo	
Obtención de las muestras.	
Inmunoperoxidasa en tejidos.	
III.- PATOGÉNESIS DE <i>Escherichia coli</i> INOCULADA EN EL APÉNDICE CECAL -----	17-22
5.5 Bacterias lavadas	
5.6 Fase de crecimiento bacteriano	
5.7 Sonicado de <i>E. coli</i> EDL933	

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

- 5.8 Inoculación de Lipopolisacárido de *E. coli*
- 5.9 Inoculación de las toxinas semipurificadas STx de *E. coli* EDL933
 - I.- Obtención de la toxina STx
 - II.- Semipurificación de la toxina
 - III.- Inoculación de los conejos en el AC
- 5.10 Ubicación de la toxina
 - I.-Obtención de las muestras
 - II.-Evaluación del receptor para la toxina en tejidos

6.- RESULTADOS

I.- DESARROLLO DEL APÉNDICE CECAL DEL CONEJO----- 23-26

- 6.1 Desarrollo morfohistológico del apéndice cecal del conejo.

II.-CARACTERIZACIÓN DEL MODELO ANIMAL EN EL CONEJO.

----- 27-38

- 6.2 Edad de los animales
- 6.3 Concentración de las bacterias inoculadas
- 6.4 Localización de la bacteria
 - I.- Obtención del suero hiperinmune
 - II.- Ubicación de *E.coli* EDL933 en el apéndice cecal del conejo
 - Obtención de las muestras.
 - Inmunoperoxidasa en tejidos

III.- PATOGÉNESIS DE *Escherichia coli* INOCULADA EN EL APÉNDICE CECAL ----- 39-50

- 6.5 Bacterias lavadas
- 6.6 Fase de crecimiento bacteriano
- 6.7 Sonicado de *E. coli* EDL933
- 6.8 Inoculación de Lipopolisacárido de *E. coli*
- 6.9 Inoculación de las toxinas semipurificadas STx de *E. coli* EDL933
 - Obtención de la toxina STx
 - Semipurificación de la toxina
 - Inoculación de los conejos en el AC
- 6.10 Ubicación de la toxina
 - Obtención de las muestras
 - Evaluación del receptor para la toxina en tejidos

7.-DISCUSIÓN 51-71

8.-BIBLIOGRAFIA 72- 82

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.- Imágenes histológicas del apéndice cecal del conejo Nueva Zelanda a diferentes edades	25
FIGURA 2.- Microfotografía del apéndice cecal del conejo a los dos meses de edad	26
FIGURA 3.- Microfotografía del apéndice cecal del conejo a los dos meses (corte longitudinal)	35
FIGURA 4.- Fotografía del AC de un conejo durante la cirugía	34
FIGURA 5.- AC de un conejo inoculado con la cepa de <i>E. coli</i> K12	34
FIGURA 6.- Lesiones a la necropsia de un conejo inoculado con <i>E.coli</i> EDL933	34
FIGURA 7.- Aparato gastrointestinal de un conejo inoculado con <i>E.coli</i> EDL933	34
FIGURA 8.-Sedimento urinario de un conejo inoculado con la cepa EDL933	35
FIGURA 9.- Cortes histológicos comparativos entre un conejo inoculado con la cepa EDL933 y un conejo con la cirugía del AC, pero sin inocular.	35
FIGURA 10.- Concentración relativa de IgG contra la cepa EDL933 en los sueros hiperinmunes mediante ELISA	36
FIGURA 11.- Curva de crecimiento y producción de verotoxina para la cepa 933 sobre medio de caldo soya tripticaseína.	40
FIGURA 12.-Inmunofluorescencia contra el receptor de las toxinas Stx en el apéndice cecal de los conejos inoculados con LPS mas toxina	49
FIGURA 13.- Apéndice cecal del conejo inoculado con la cepa EDL933 , receptor de las toxinas STx en linfocitos	49
FIGURA 14.- Representación esquemática del apéndice cecal de los conejos	69
FIGURA 15.- Esquema de los efectos propuestos por la inoculación de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 sobre el receptos para las toxinas Stx.	70
FIGURA 16.- Esquema de los efectos propuestos por la inoculación de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 sobre las células del sistema inmune	71

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

LISTA DE CUADROS .

CUADRO 1.- Células en las que se demuestran receptores para las Verotoxinas de <i>Escherichia coli</i>	8
CUADRO 2.- Rangos normales para las pruebas en sangre de los conejos Nueva Zelanda Blanco	13
CUADRO 3.- Alteraciones características en los conejos inoculados en el apéndice cecal con la cepa de <i>Escherichia coli</i> O157:H7	14
CUADRO .- Alteraciones encontradas en el apéndice cecal de los conejos inoculados con <i>Escherichia coli</i> O157:H7	31
CUADRO 4.- Hallazgos de las características del desarrollo del AC en los conejos Nueva Zelanda de diferentes edades.	24
CUADRO 5.-Criterios de interpretación para las determinaciones de laboratorio mas útiles practicadas en los conejos	27
CUADRO 6.- Principales hallazgos en los conejos de diferentes edades inoculados con la cepa de <i>Escherichia coli</i> 933	29
CUADRO 7.-Determinaciones de urea y creatinina sericas en los conejos de diferentes edades inoculados en el apéndice cecal.	30
CUADRO 8.- Hallazgos de laboratorio encontrados en los conejos inoculados con diversas concentraciones de bacterias.	32
CUADRO 9.-Resumen de los principales hallazgos clínicos y de laboratorio encontrados en los conejos inoculados con diversas concentraciones de bacterias.	33
CUADRO 10.- Alteraciones encontradas en el apéndice cecal de los conejos inoculados con <i>Escherichia coli</i> EDL933 (O157:H7)	37
CUADRO 11.-Aspectos histopatológicos y ubicación de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 en el apéndice cecal de los conejos con diferentes tiempos de efecto	38
CUADRO 12.-Principales resultados de los conejos inoculados con bacterias lavadas	39
CUADRO 13.-Uremia y creatinemia en los conejos inoculados con filtrados de cultivos de la cepa EDL933 a diferentes fases de crecimiento	41

CUADRO 14.- principales datos encontrados en los conejos inoculados con filtrados de cultivos de la cepa EDL933 a diferentes fases de crecimiento bacteriano	42
Cuadro 15.-Características de los sobrenadantes obtenidos de los sonicados del cultivo de la cepa de <i>Escherichia coli</i> EDL933	43
CUADRO 16.-Resumen de los hallazgos en los conejos inoculados con los filtrados o los sonicados de la cepa de <i>Escherichia coli</i> O157:H7	44
CUADRO 17.-Resultados del fraccionamiento del sobrenadante de la cepa EDL933 mediante ultrafiltración	45
CUADRO 18.-Características de los diversas fracciones empleadas en el trabajo	46
Cuadro 19.- Resultados de la inoculación en el apéndice cecal del conejo de LPS y toxina obtenidos de la cepa de <i>Escherichia coli</i> O157:H7	47
CUADRO 20.- Localización de los receptores para las verotoxinas I y II sobre el apéndice cecal y el riñón de los conejos inoculados.	48

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

1.1 *Escherichia coli*

Existen cinco diferentes grupos de *Escherichia coli* que causan enfermedad intestinal en humanos (patotipos): enteroagregativas (EAEC), enteropatógenas (EPEC), enterotoxigénicas (ETEC), enteroinvasivas (EIEC) y las productoras de toxina de Shiga (STEC o EHEC) (Nataro and Kaper, 1998; Hurley y col., 1999; Lai y col., 1999).

Las cepas de *Escherichia coli* pertenecientes al grupo enterohemorrágico (EHEC) producen una o ambas de las toxinas nombradas como *Shiga like toxin* (SLT) I y II. Mientras que para la SLTI no se han encontrado variantes antigénicas ni de su receptor sobre las células blanco, para la SLTII sí (Lindgreen, 1994). Los serogrupos O157, O111 y O26 son los que se han implicado con mayor frecuencia en las manifestaciones clínicas más importantes de infecciones en el humano por cepas EHEC (Puente and Finlay, 2001).

Escherichia coli O157:H7 (perteneciente al grupo de las EHEC) ha sido implicada en casos de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y Colitis Hemorrágica (CH) en diferentes partes del mundo. Cerca de 75,000 casos de infección en humanos por este serotipo ocurren en los Estados Unidos anualmente. La severidad de la enfermedad, la falta de un tratamiento efectivo y la posibilidad de un brote a gran escala, provocado por la ingestión de alimentos contaminados, han impulsado los estudios sobre su patogénesis y la detección de la bacteria (Paton and Paton 1998; Perna y col., 2001). A la fecha, no se conoce la secuencia precisa de eventos que conducen al SUH o a la colitis hemorrágica (Hurley y col., 1999), los dos principales problemas provocados en humanos por las cepas EHEC. En los cerdos se identificó una infección natural por estas cepas, conocida como enfermedad edematosa porcina (Gyles and Thoen, 1986) siendo la otra especie susceptible en la naturaleza a las cepas productoras de Stx (Donohue y col. 2000).

1.2 Factores de virulencia

Las infecciones causadas por el grupo de las EHEC están asociadas con tres principales factores de virulencia: capacidad para formar las lesiones de "attaching and effacing" (A/E), la expresión de toxinas de "Shiga" (Stx o SLT) y la presencia del plásmido de 60MDa (Puente and Finlay, 2001).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La lesión A/E se caracteriza por la disolución del ribete en cepillo intestinal y pérdida de la microvellosidad intestinal (*effacement*) en el sitio de unión de la bacteria (*attachment*) después de lo cual se rearregla la actina intracelular conduciendo a la formación de un pedestal en el sitio de interacción bacteria-célula. La lesión A/E se lleva a cabo en tres fases: unión a la superficie celular en un patrón de adherencia localizada y asociada con las fimbrias formadoras de rizos (*bundle-forming pili*, BFP), se induce una respuesta compleja de las células epiteliales que conducen a rearreglos del citoesqueleto y que son inducidas por proteínas secretadas por la bacteria (Esps) y finalmente la unión íntima y estrecha de la bacteria a la célula, mediada por una proteína bacteriana, intimina, y un receptor celular secretado por la misma bacteria (Tir); así mismo, Tir actúa como receptor celular para las cepas EHEC (Puente and Finlay, 2001).

1.3 Verotoxinas

Las toxinas producidas por las cepas EHEC son conocidas, además de Verotoxinas (VT) como: *Shiga Like Toxins* (SLT) o como toxinas de Shiga (Stx). Los miembros de la familia de toxinas de Shiga (STx) tienen parecido con la toxina de Shiga, producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1, compartiendo las siguientes propiedades: (Calderwood, 1994).

- 1.- Estructura polipeptídica de 5 subunidades B por una A.
- 2.- Estructura de un operón, con el gen codificante de la subunidad A “corriente arriba” del gen para la subunidad B.
- 3.- Actividad biológica idéntica para la subunidad A.
- 4.- Unión del pentámero B al receptor de tipo esfingolípido sobre las células eucarióticas.
- 5.- Actividades biológicas de enterotoxicidad en conejo, neurotoxicidad en ratón y citotoxicidad para cultivos celulares.

La nomenclatura propuesta por Alison O'Brien, (según Karmali y col., 1994), como toxinas semejantes a Shiga, “Shiga like toxin” (SLT), Verotoxinas (VT) o toxinas de Shiga (Stx), se emplean indistintamente y se reconocen cuatro subtipos: SLT-I/VT1, SLT-IIc/VT2c, SLT-IIId/VT2d y SLT-IIe/VT2e. Las cepas productoras de Stx 2 están con frecuencia mayor asociadas a enfermedad, por razones no bien conocidas (Hurley y col., 1999).

Los genes estructurales para SLT-I y IIc,d son parte de bacteriófagos temperados, desconociéndose la ubicación de las otras toxinas en elementos móviles dentro o fuera del cromosoma. La transcripción de SLT-I es regulada por la concentración de hierro en el medio y la expresión de SLT-IIc se incrementa drásticamente por la presencia de mucina intestinal (Calderwood, 1994)

Las subunidades B son las responsables de la actividad biológica diferente, además de correlacionar con la diferencia en citotoxicidad, localización de la holotoxina (espacio periplásmico o extracelular) y el tropismo hacia los diversos órganos. La unión sobre las células eucarióticas, de esta subunidad, se establece con los Globoséridos, siendo el globotriosilcerámico (Gb3) el sitio de unión para las toxinas SLT-I-II y IIc y el Gb4 para la toxina SLT-IIe, existen evidencias de que la composición de ácidos grasos de la molécula de Gb3 tiene un fuerte efecto sobre la unión a la toxina (Calderwood, 1994). El papel fisiológico del receptor, parece corresponder con el antígeno de diferenciación de los linfocitos B (CD77); el cual es un marcador de los centros germinales de las células B (Lingwood, 1994).

La subunidad B se une al receptor celular y promueve la entrada por endocitosis, de la subunidad A, posterior al rompimiento de ella en las fracciones A₁ y A₂. De esta forma, la fracción A₁ es transportada por el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico hasta los ribosomas, en donde actúa como una N-glicosidasa, hidrolizando una adenina de la fracción ribosomal 28S, inhibiendo el factor de elongación y bloqueando la síntesis de proteínas, conduciendo a la muerte celular (Stephen, 1986).

1.4 Síndrome Urémico Hemolítico

En humanos ha sido descrita una parte de la historia natural de la enfermedad para las infecciones por EHEC, la cual consiste en resumen de: La contaminación por cepas EHEC de alimentos (principalmente carne de res) las cuales al ser ingeridas con un cocimiento deficiente, permiten la entrada y replicación a nivel del colon de las bacterias, en un período de incubación de 1 a 8 días (promedio de 5) en el cual se puede producir un cuadro de diarrea sin sangre, con menos del 10% de los pacientes que se muestran asintomáticos. En las 48 horas posteriores, se desarrolla en el 70% de los casos una diarrea con sangre (Colitis hemorrágica), asociándose en un 30-60% de los pacientes a la presencia de vómito, menos del 30% presenta fiebre y es posible un aumento de leucocitos en sangre y sólo el 5% de los casos resultan en Síndrome Urémico hemolítico y de estos el 5% con un curso fatal (Chart, 2000). El SUH se caracteriza por tres signos: anemia hemolítica, trombocitopenia, falla renal aguda con uremia y muerte.

1.5 Modelos animales

Se han realizado experimentos para estudiar los mecanismos de patogenicidad de las bacterias que participan en el SUH, en ellos se ha pretendido reproducir la enfermedad en animales de laboratorio y domésticos

(Pai y col., 1986; Tzipori y col., 1986; Wadolkowski y col., 1990; Kita y col., 2000) y en monos (Kang y col., 2001).

El empleo del conejo como modelo, parte de los experimentos descritos por Sherman y col. en 1988, en los cuales se inocularon diferentes serotipos de *Escherichia coli* productoras de VT por vía intragástrica en animales jóvenes, aunque los resultados no mostraron evidencias de SUH, en algunos casos se presentó diarrea no hemorrágica a los siete días posteriores a la inoculación (Sherman y col., 1988); así como, colonización y lesiones en el intestino con diarrea sin sangre en conejos jóvenes. Además en conejos de 8 días de edad, las lesiones se presentaron primordialmente en el ciego y el apéndice cecal (Gyles, 1994). En otros experimentos en los que se inocularon verotoxinas por vía parenteral en conejos (Kavi y col., 1987; O'Brig y col., 1987; Pai y col., 1986; Tzipori 1987) se observó daño en células endoteliales y microangiopatía en riñón, intestino y encéfalo, muy similares a las observadas en humanos, fundamentando la hipótesis de que estos daños se producen por acción directa de la toxina sobre el riñón, el intestino y el encéfalo.

La administración intravenosa de VTs marcadas radiactivamente en conejos, demostró que la toxina se une y daña principalmente a las células endoteliales en las áreas correspondientes a la microcirculación del ciego y el sistema nervioso central, pero no se observó microangiopatía, ni activación y consumo de plaquetas (Brunton, 1994); sin embargo, en otro trabajo se demostró que la toxina VT2 se une a la microvasculatura del ciego y la VT1 al SNC en los conejos (Nelson, 1994)

ANTECEDENTES

2.1 Desarrollo morfohistológico del apéndice cecal del conejo

El intestino grueso se extiende desde la unión ileocecal al ano, comprende al ciego, apéndice cecal, el colon, el recto y el canal anal. El ciego es un gran fondo de saco que se continúa con el colon proximal. El apéndice cecal sale del ciego (Sanford, 1984).

La pared del tubo digestivo está formada por cuatro capas principales: la mucosa, la submucosa, la muscular y la serosa. La mucosa se compone de un epitelio, la lámina propia y la muscular de la mucosa. En la lámina propia se encuentran una gran cantidad de capilares sanguíneos y linfáticos que se proyectan hasta muy cerca del epitelio. La mucosa del intestino grueso no tiene vellosidades, es más gruesa que en el intestino delgado y por lo tanto las criptas de Lieberkühn son más profundas, dichas criptas no tienen células de Paneth, pero tienen más células caliciformes que el intestino delgado, las

(Pai y col., 1986; Tzipori y col., 1986; Wadolkowski y col., 1990; Kita y col., 2000) y en monos (Kang y col., 2001).

El empleo del conejo como modelo, parte de los experimentos descritos por Sherman y col. en 1988, en los cuales se inocularon diferentes serotipos de *Escherichia coli* productoras de VT por vía intragástrica en animales jóvenes, aunque los resultados no mostraron evidencias de SUH, en algunos casos se presentó diarrea no hemorrágica a los siete días posteriores a la inoculación (Sherman y col., 1988); así como, colonización y lesiones en el intestino con diarrea sin sangre en conejos jóvenes. Además en conejos de 8 días de edad, las lesiones se presentaron primordialmente en el ciego y el apéndice cecal (Gyles, 1994). En otros experimentos en los que se inocularon verotoxinas por vía parenteral en conejos (Kavi y col., 1987; O'Brig y col., 1987; Pai y col., 1986; Tzipori 1987) se observó daño en células endoteliales y microangiopatía en riñón, intestino y encéfalo, muy similares a las observadas en humanos, fundamentando la hipótesis de que estos daños se producen por acción directa de la toxina sobre el riñón, el intestino y el encéfalo.

La administración intravenosa de VTs marcadas radiactivamente en conejos, demostró que la toxina se une y daña principalmente a las células endoteliales en las áreas correspondientes a la microcirculación del ciego y el sistema nervioso central, pero no se observó microangiopatía, ni activación y consumo de plaquetas (Brunton, 1994); sin embargo, en otro trabajo se demostró que la toxina VT2 se une a la microvasculatura del ciego y la VT1 al SNC en los conejos (Nelson, 1994)

ANTECEDENTES

2.1 Desarrollo morfohistológico del apéndice cecal del conejo

El intestino grueso se extiende desde la unión ileocecal al ano, comprende al ciego, apéndice cecal, el colon, el recto y el canal anal. El ciego es un gran fondo de saco que se continúa con el colon proximal. El apéndice cecal sale del ciego (Sanford, 1984).

La pared del tubo digestivo está formada por cuatro capas principales: la mucosa, la submucosa, la muscular y la serosa. La mucosa se compone de un epitelio, la lámina propia y la muscular de la mucosa. En la lámina propia se encuentran una gran cantidad de capilares sanguíneos y linfáticos que se proyectan hasta muy cerca del epitelio. La mucosa del intestino grueso no tiene vellosidades, es más gruesa que en el intestino delgado y por lo tanto las criptas de Lieberkühn son más profundas, dichas criptas no tienen células de Paneth, pero tienen más células caliciformes que el intestino delgado, las

células epiteliales de la superficie tienen bordes estriados (ribete en cepillo) existiendo células enteroendócrinas. Las células epiteliales se originan por división en el interior de la cripta y de ahí migran hacia la superficie y terminan siendo expulsadas hacia la luz (Ham, 1975).

El apéndice vermiforme o cecal, se origina embriológicamente del mismo lugar que el ciego, pero sin sufrir la dilatación característica, el epitelio de la mucosa es parecido al del intestino grueso, pero en la lámina propia hay mucho más tejido linfático organizado en forma de nódulos que contienen centros germinativos; en el humano, el número de nódulos disminuye con la edad (Ham, 1975). La capa muscular de la mucosa puede faltar en algunos lugares del apéndice cecal.

2.2 Modelo animal en conejos

En un trabajo desarrollado previamente (Valdivia 1995), se demostró que mediante la inoculación de 10^8 Unidades formadoras de colonia (ufc) de la cepa O157:H7 se lograba reproducir la colitis hemorrágica, la falla renal aguda y la anemia en los conejos, en forma parecida a la observada en la presentación clínica del SUH en los humanos. Durante este trabajo se estableció un modelo de infección aguda con una muerte en 5-7 días; sin embargo, faltó caracterizar más a los animales, la dosis mínima y las edades de los animales.

Debido a que existió una diferencia sustancial con otros modelos animales, en cerdos (Gyles, 1994; Dean-Nystrom, 2000), conejos (Fujii, 1992, Pai, 1986; Gyles, 1994), terneros (Gyles, 1994; Cray, 1995), ratones (Gyles, 1994) y perros (Brunton, 1994) desarrollados previamente, en cuanto al sitio de inoculación (en el apéndice cecal) y que existen pocos datos sobre este órgano en el conejo (Archer y col., 1954, Monroy 1973), fue necesario estudiar su desarrollo, para tratar de correlacionar los efectos semejantes al SUH, con la morfología del órgano.

Los experimentos realizados por Pai y col., Potter y col., Li y col., (citados por Gyles, 1994), en conejos de diferentes edades inoculados intragástricamente, mostraron que los efectos observados dependen de la edad de los animales, siendo altamente susceptibles a lesiones intestinales los más pequeños y muy refractarios a estas lesiones los animales grandes. Asimismo, cuando se indujo toxemia en los conejos al administrar las toxinas por vía intravenosa o intraperitoneal, se observaron diferencias en los órganos afectados, lesionándose principalmente el riñón por la administración intravenosa (Gyles, 1994).

2.3 Patogénesis de las infecciones por EHEC

Después de la colonización de la mucosa intestinal por parte de las cepas EHEC, la cual se ha observado en intestino grueso (ciego y colon), principalmente sobre el tejido linfoide asociado a mucosas y sin invasión a la lámina propia (Pai y col., 1986), las toxinas Stx son capaces de atravesar la barrera intestinal y entrar en el torrente circulatorio para llegar a sus principales células blanco: las células endoteliales (Hurley y col., 1999).

Es un hecho que la aparición del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) requiere la presencia de una Verocitotoxemia y que las células endoteliales juegan un papel importante en la patogénesis (Van de Kar, 1992; Ramegowda, 1996; Louise, 1997; Jacewicz, 1999). Sin embargo, desde 1989, se reportó el papel que tienen otros componentes bacterianos sobre el daño causado por las toxinas SLT. Barret y col. (1989), demostraron que en conejos inoculados con STx más endotoxina (LPS= 30µg/Kg), se apreciaba un aumento en la severidad de las lesiones y la mortalidad de los animales, si se comparaba con la sola administración de la toxina StxII. Louise y col. (1992), encontraron que el LPS aumentaba los efectos vasculares en la infección intestinal con *Shigella dysenteriae*, también demostraron que el LPS de *Escherichia coli* productora de SLT, aumentaba el daño sobre células endoteliales en cultivo, por un efecto sinérgico entre estos dos componentes. Así mismo, se encontró que el efecto era aumentado por mediadores de la inflamación como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina 1 (IL-1) o la linfo toxina TNF- β ; presumiblemente al mejorar la unión de la toxina (SLT) a las células (Van de Kar y col., 1992; Sjogren y col., 1994; Foster y col., 2000; Puente and Finlay, 2001).

Algunas observaciones apoyan el papel de los componentes del propio organismo sobre la severidad de las lesiones, tal es el caso de las observaciones realizadas por Dean-Nystrom y col. (2000), quienes refieren que las lesiones nerviosas eran más severas al inocular cerdos destetados y calostrados, que al inocular cerdos privados del calostro. Se ha observado que las respuestas a la inoculación de las cepas O157:H7 en cerdos desarrollan las lesiones y enfermedad parecidas a la edematosa porcina, por lo que el efecto parece mas bien depender de la especie animal usada para los experimentos (Donohue y col 2000). De la misma manera hay evidencias del papel que juega el TNF α sobre la infección, al emplear un modelo en ratones gnotobiontes observando que los ratones co-inoculados con TNF- α , desarrollaron signos neurológicos más severos y tuvieron una frecuencia mayor de patologías glomerulares (Isogai, 1998).

La participación de otros componentes bacterianos, como el LPS, se refuerza por las observaciones de una respuesta de anticuerpos hacia el LPS en los pacientes con shigelosis complicada con SUH (Azim, 1996) y de IgM contra el antígeno O157 en pacientes con SUH (Kang, y col., 2001).

2.4 Expresión de los receptores para STx

Las toxinas STx tienen como principal receptor al Gb3, por lo que las células afectadas son aquellas que lo presentan en su superficie, condicionando la especificidad de los efectos en los diferentes órganos afectados durante las infecciones por cepas productoras de toxinas STx. (STEC) (Zoja y col., 1992).

Las citocinas pro-inflamatorias regulan la expresión del glicolípido Gb3 sobre la membrana, sugiriendo que la respuesta del hospedado puede contribuir a la patogénesis por sobre-expresión del Gb3 (Ramegowda, 1996). Karpman y col., (1997), trabajando con ratones con y sin respuesta a LPS y administrando *E.coli* O157:H7 por vía intragástrica, demostraron que tanto la toxina como el LPS son importantes en el desarrollo de la enfermedad. Jacewicz y col. (1999), pensaron que el daño al endotelio, estaba provocado por la Stxs, la endotoxina y las citocinas derivadas del hospedador.

Varios autores presentan evidencias de que el receptor Gb3 es regulado y sobrepresado por las células endoteliales en respuesta a diversas condiciones en las que se secretan citocinas (TNF α , IL-1 β). En el cuadro 1 se observan algunas células en las que se ha descrito la presencia del receptor Gb3.

2.5 Lesiones en las infecciones por cepas EHEC

Cuando se inocularon cepas de *E. coli* O157:H7 en conejos infantiles (gazapos) por vía intragástrica , éstas colonizaron el colon en su porción media y distal con cambios morfológicos en las células del epitelio, incremento de la actividad mitótica de las criptas, disminución de la mucina e infiltrado de polimorfonucleares en la mucosa: Estas alteraciones podían ser reproducidas por la administración de VT sola (Stephen and Pietrowski, 1986).

En el modelo animal en conejos desarrollado previamente (Valdivia, 1995), se demostró que la bacteria inoculada en el apéndice cecal era capaz de producir las siguientes lesiones locales: migración de leucocitos a la luz, hemorragias, edema, dilatación linfática y depleción linfoide; así como, lesiones sistémicas como el daño e insuficiencia renales, colitis hemorrágica, diarrea y anemia severas. Todos los hallazgos encontrados fueron sin diseminación de la bacteria y atribuibles a las verotoxinas producidas.

CUADRO 1

Células en las que se han demostrado receptores para las Verotoxinas de *Escherichia coli*.

Células con receptor Gb3 constitutivo	Células con receptor Gb3 inducido	Referencia
Células renales de humano (en cultivo)		Lingwood, 1994
Células del tubo proximal de humanos		Hughes y col., 1998
Plaquetas, glomérulo renal de infantes (humano).	Glomérulo renal de adultos	Lingwood 1994
Eritrocito precursor eritroide (UFBe) humanos		Ren y col., 1999
Células B activas (productoras de IgG)		Lingwood 1994
Monocito (humano)		Harlow y col 1988
Mucosa del colon en conejos adultos		Sugatani y col, 2000
	Endoteliales humanas de microvasculatura de SNC	Lelourd y col 2001

En el SUH y en la enfermedad edematosa porcina, la imagen histológica característica es la trombosis microangiopática; sin embargo, hay evidencias crecientes de que las células del sistema inmune son un blanco importante para las toxinas Stx, algunos de los datos clínicos que lo indican son: (Menge y col., 1999; Sugatani y col., 2000).

- a) El SUH se presenta principalmente en menores de 10 años .
- b) En Japón los niños entre 1 y 14 años que padecieron SUH tienen bajos niveles de anticuerpos contra Stx 2
- c) Los adultos que han sufrido infecciones por EHEC tienen bajos títulos de anticuerpos contra VT1
- d) En cerdos gnotobiontes, la infección por cepas de *E.coli* indujo ciertos estados de inmunodepresión.

- e) En ratones sin respuesta a LPS inoculados endovenosamente con la cepa O157:H7, se observó que había una baja de los linfocitos T. Este efecto se incrementó en ratones que responden a LPS.

Utilizando un modelo de infección crónica por *Escherichia coli* EDL933 inoculada en el apéndice cecal de los conejos, se demostró que la cepa O157:H7 empleada, causó una menor respuesta de la inmunidad celular y de la humoral (Pérez, 2002)

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se desconoce el mecanismo de patogenicidad que emplean las cepas del grupo de las EHEC en el desarrollo del SUH, así como de los diversos componentes que participan en la patogénesis del daño observado. El conocimiento de dichos factores puede contribuir al desarrollo de medidas de control y prevención más eficaces. Para llevar a cabo estos estudios es necesario contar con modelos animales en donde se desarrollen lesiones y se produzcan signos parecidos a los que se observan en los humanos con SUH. Con estos modelos se disminuirían los gastos de experimentación y se reducirían los tiempos para llevar a cabo los estudios de prevención, además del impacto sobre el conocimiento del papel zoonótico de las cepas involucradas en el SUH.

OBJETIVOS.

4.1 Objetivo general

Describir los factores y eventos de la infección por cepas de *Escherichia coli* EHEC en un modelo animal en conejos.

El trabajo se dividió en tres fases con la finalidad de facilitar su realización y descripción, en la primera fase se revisó y estudió el desarrollo del apéndice cecal de los conejos, desde la etapa de gestación hasta los tres años de edad. En la segunda parte se evaluaron las condiciones para estandarizar un modelo animal inoculando dentro del apéndice cecal del conejo la cepa de *Escherichia coli* O157:H7 (EDL933). Finalmente, se determinó el efecto sinérgico de las toxinas (Stx1 y Stx2) y el Lipopolisacárido (LPS), en la patogénesis de la enfermedad utilizando el modelo en conejos.

- e) En ratones sin respuesta a LPS inoculados endovenosamente con la cepa O157:H7, se observó que había una baja de los linfocitos T. Este efecto se incrementó en ratones que responden a LPS.

Utilizando un modelo de infección crónica por *Escherichia coli* EDL933 inoculada en el apéndice cecal de los conejos, se demostró que la cepa O157:H7 empleada, causó una menor respuesta de la inmunidad celular y de la humoral (Pérez, 2002)

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se desconoce el mecanismo de patogenicidad que emplean las cepas del grupo de las EHEC en el desarrollo del SUH, así como de los diversos componentes que participan en la patogénesis del daño observado. El conocimiento de dichos factores puede contribuir al desarrollo de medidas de control y prevención más eficaces. Para llevar a cabo estos estudios es necesario contar con modelos animales en donde se desarrollen lesiones y se produzcan signos parecidos a los que se observan en los humanos con SUH. Con estos modelos se disminuirían los gastos de experimentación y se reducirían los tiempos para llevar a cabo los estudios de prevención, además del impacto sobre el conocimiento del papel zoonótico de las cepas involucradas en el SUH.

OBJETIVOS.

4.1 Objetivo general

Describir los factores y eventos de la infección por cepas de *Escherichia coli* EHEC en un modelo animal en conejos.

El trabajo se dividió en tres fases con la finalidad de facilitar su realización y descripción, en la primera fase se revisó y estudió el desarrollo del apéndice cecal de los conejos, desde la etapa de gestación hasta los tres años de edad. En la segunda parte se evaluaron las condiciones para estandarizar un modelo animal inoculando dentro del apéndice cecal del conejo la cepa de *Escherichia coli* O157:H7 (EDL933). Finalmente, se determinó el efecto sinérgico de las toxinas (Stx1 y Stx2) y el Lipopolisacárido (LPS), en la patogénesis de la enfermedad utilizando el modelo en conejos.

- e) En ratones sin respuesta a LPS inoculados endovenosamente con la cepa O157:H7, se observó que había una baja de los linfocitos T. Este efecto se incrementó en ratones que responden a LPS.

Utilizando un modelo de infección crónica por *Escherichia coli* EDL933 inoculada en el apéndice cecal de los conejos, se demostró que la cepa O157:H7 empleada, causó una menor respuesta de la inmunidad celular y de la humoral (Pérez, 2002)

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se desconoce el mecanismo de patogenicidad que emplean las cepas del grupo de las EHEC en el desarrollo del SUH, así como de los diversos componentes que participan en la patogénesis del daño observado. El conocimiento de dichos factores puede contribuir al desarrollo de medidas de control y prevención más eficaces. Para llevar a cabo estos estudios es necesario contar con modelos animales en donde se desarrollen lesiones y se produzcan signos parecidos a los que se observan en los humanos con SUH. Con estos modelos se disminuirían los gastos de experimentación y se reducirían los tiempos para llevar a cabo los estudios de prevención, además del impacto sobre el conocimiento del papel zoonótico de las cepas involucradas en el SUH.

OBJETIVOS.

4.1 Objetivo general

Describir los factores y eventos de la infección por cepas de *Escherichia coli* EHEC en un modelo animal en conejos.

El trabajo se dividió en tres fases con la finalidad de facilitar su realización y descripción, en la primera fase se revisó y estudió el desarrollo del apéndice cecal de los conejos, desde la etapa de gestación hasta los tres años de edad. En la segunda parte se evaluaron las condiciones para estandarizar un modelo animal inoculando dentro del apéndice cecal del conejo la cepa de *Escherichia coli* O157:H7 (EDL933). Finalmente, se determinó el efecto sinérgico de las toxinas (Stx1 y Stx2) y el Lipopolisacárido (LPS), en la patogénesis de la enfermedad utilizando el modelo en conejos.

4.2 Objetivos específicos

FASE 1

1.-Evaluar el desarrollo morfohistológico del apéndice cecal de los conejos

FASE 2

2.- Analizar la participación de la edad del conejo en el desarrollo de lesiones y alteraciones tisulares en un modelo de infección experimental por cepas de *Escherichia coli* productoras de citotoxina (Stx)

3.- Determinar la participación de los factores auxiliares de virulencia: toxinas STx, LPS, soma bacteriano y constituyentes intracelulares en la patogénesis de infección experimental por *Escherichia coli*. EDL933 (O157:H7).

4.- Correlacionar los eventos de la infección por *Escherichia.coli* O157:H7 con los factores auxiliares de virulencia de la bacteria.

FASE 3

5.- Evaluar la presencia y posición del receptor Gb3 en el apéndice cecal y en el riñón de los conejos.

6.- Analizar la expresión del receptor Gb3 inducida por el LPS de *Escherichia coli* en el apéndice cecal y el riñón de los conejos.

MATERIAL Y METODOS

I.- DESARROLLO DEL APÉNDICE CECAL DEL CONEJO

5.1 Desarrollo morfohistológico del apéndice cecal

Se utilizaron 30 conejos de la raza Nueva Zelanda, obtenidos del módulo de producción agropecuaria de la FESC, seleccionando animales a diferentes edades de gestación y de nacimiento y tomándose al menos dos animales de cada edad, sin consideración del sexo.

Las edades muestreadas fueron: 17 y 20 días de gestación, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 300 días y 3 años de edad.

Los conejos fueron sacrificados mediante insensibilización con cloroformo e inmediatamente se les realizó la necropsia revisando todo el cadáver y se extrajo el apéndice cecal. Se tomaron datos del peso total del animal y del peso del apéndice cecal (AC), el cual fue colocado en formalina amortiguada durante 24 h, posteriormente se seccionó en forma transversal y longitudinal y se mantuvo en la formalina durante 48 h más. Los fragmentos fueron incluidos en parafina, cortados a 4 μ y los cortes teñidos por la técnica de hematoxilina y eosina (Estrada y col.,1982) para su evaluación en el microscopio. Se tomaron fotografías con diversas ampliaciones y se realizó una reconstrucción tridimensional del apéndice cecal.

II.- CARACTERIZACIÓN DEL MODELO ANIMAL EN CONEJOS

5.2 Edad de los animales

Se utilizaron 15 conejos Nueva Zelanda de 1, 1.5, 2, 3 y 6 meses de edad con 1.2, 1.4, 1.6, 2.2 y 2.9 Kg. de peso vivo, en promedio, respectivamente. Se tomaron al menos dos animales de cada edad, los cuales fueron inoculados en el AC con 1ml de un cultivo completo de la cepa EDL933 *Escherichia coli* O157:H7 de 18 h de incubación obtenido en caldo soya tripticaseína (CST, BIOXON). La inoculación en el AC se realizó mediante la técnica quirúrgica previamente descrita (Valdivia, 1995).

Los animales fueron seguidos en el postoperatorio en su signología clínica y mediante pruebas rutinarias de laboratorio como: biometría hemática (BH), examen general de orina, urea y creatinina séricas de acuerdo a las técnicas descritas previamente (Valdivia, 1995).

Posterior a la muerte o a la eutanasia de los conejos, se realizó la necropsia para evaluar las lesiones inducidas y se tomaron muestras del AC y en función de la presencia de lesiones macroscópicas, del riñón, bazo, encéfalo, intestino, pulmón o hígado.

El criterio seguido para caracterizar y agrupar los signos clínicos, las pruebas de laboratorio y las lesiones macro y microscópicas fue utilizando los hallazgos y conclusiones obtenidos con esta misma línea de conejos, la misma técnica y cepa de *E. coli* EDL933, previamente descritos por Valdivia (1995). De esta forma, los rangos normales para las pruebas de laboratorio se muestran en el cuadro 2 y las alteraciones que caracterizan al efecto de las cepas verotoxigénicas en los animales (Efecto VT) se resumen en el cuadro 3.

Para la interpretación de las pruebas de laboratorio, se tomó el criterio reportado por Yoxall and Hird, (1980) y Arderiu y col. (1998), en donde una desviación de los valores de un 10 al 20% se interpretó como leve, del 20 al 30% como moderada y de más del 30% como severa, dicho criterio fue previamente validado por análisis estadístico para este mismo modelo animal (Valdivia, 1995).

5.3 Concentración de bacterias inoculadas

Se obtuvo un cultivo de 18 h de incubación de la cepa EDL933 en CST, se le realizó cuenta viable haciendo diluciones decimales en PBS e inoculando cajas con agar soya tripticaseína (AST, BIOXON) sembrando por la técnica de vaciado en placa. Del cultivo de 18h, se realizaron diluciones dobles (1:2, 1:4 y 1:8) y diluciones decimales (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}) utilizando CST.

Se realizó la cirugía empleando dos animales por dilución, inoculándoles 1 ml en el AC, evaluando los efectos clínicos, hematológicos (BH, urea, creatinina), lesiones a la necropsia e histopatológicas.

Los resultados se interpretaron de acuerdo a lo indicado en el cuadro 2 y 3.

CUADRO 2
RANGOS NORMALES PARA LAS PRUEBAS EN SANGRE PRACTICADAS EN
CONEJOS NUEVA ZELANDA

DETERMINACION	RANGO NORMAL*	UNIDADES
Eritrocitos	5.12 – 6.27	millones/ mm ³
Hemoglobina	7.7 – 9.5	g/dl
Hematocrito	25.6 – 31.9	%
Plaquetas	225 – 598	miles/mm ³
Leucocitos	6.24 – 9.21	miles/mm ³
Linfocitos	35 – 74	%
Monocitos	0 – 2	%
Neutrófilos	24 – 59	%
N. segmentado	23 – 57	%
N. en banda	0 – 3	%
Eosinófilos	0 – 3	%
Basófilos	0 – 1	mg/dl
Urea	22.0 – 32.3	mg/dl
Creatinina	0.30 – 0.73	mg/dl
Hemoglobina Plasmática	2.9 – 14.1	mg/dl
Haptoglobina sérica	50.6 – 103.1	mg/dl
TGP	11 – 31	mg/dl
LDH	217 – 377	mg/dl
CPK	108 – 217	mg/dl

Tomado de Valdivia, 1995

Se utilizaron 29 conejos Nueva Zelanda Blanco de 60 días de edad clínicamente sanos.

*Rango normal , se expresa como la media +/- 1 SD

TGP.- Transaminasa Glutámico Pirúvica (Alanina amino transferasa).

LDH.- Deshidrogenasa láctica , CPK.- Creatin fosfoquinasa

CUADRO 3
ALTERACIONES CARACTERÍSTICAS EN LOS CONEJOS INOCULADOS EN
EL APÉNDICE CECAL CON LA CEPA EDL933 DE *Escherichia coli* O157:H7
(EFECTO VT).

APARATO O SISTEMA	SIGNOS CLINICOS	PATOLOGÍA CLÍNICA	NECROPSIA	HISTOLOGÍA
Gastrointestinal	Diarrea hemorrágica, deshidratación	Sangre en heces positivo	Distensión por líquido hemorrágico, úlceras	Úlceras, hemorragias, edema
Apéndice cecal	NA	NA	Distensión por contenido hemorrágico, hemorragias en las paredes	Hemorragias, edema, depleción linfoide, dilatación linfática
Sanguíneo	Palidez de mucosas Cianosis terminal	Disminución de los eritrocitos, hemoglobina y hematocrito, hemólisis intravascular	Disminución de tamaño en bazo, palidez de los tejidos	Depleción linfoide y hemosiderosis en bazo
Renal	NA	Aumento de urea y creatinina séricas Cilindruria y hemoglobinuria	SCPA	Hemorragias en corteza renal, proteína en tubos

Resumido y modificado de Valdivia, 1995

SCPA.- Sin cambios patológicos aparentes

NA.- No aplica

5.4 Localización de la bacteria

I.-Obtención de suero hiperinmune contra *E.coli* EDL933.

Se preparó un cultivo de la cepa EDL933 en CST con 12 h de incubación, las bacterias se lavaron con PBS mediante centrifugación, resuspendiéndose en PBS a una concentración celular equivalente al tubo tres del nefelómetro de McFarland. Las bacterias fueron inactivadas con fenol para ser utilizadas como antígeno.

Se utilizaron dos conejos NZ de 2 kg de peso, aplicándoles el siguiente esquema de inmunización:

0 días .- 1 ml del antígeno + 1 ml de adyuvante completo de Freud , subcutáneo en sitios múltiples .

7 días .- 1 ml del antígeno + 1 ml de adyuvante incompleto , vía intra muscular (i.m).

15 días .- 1 ml del antígeno , (im)

20 días .- 0.5 ml del antígeno por vía endovenosa

27 días .- sangría a blanco .

Los animales fueron sangrados previos a cada inmunización y con el suero, se realizó una prueba de aglutinación, usando el mismo antígeno y diluciones dobles del suero.

Se recolectaron los sueros al final de la fase de inmunización y fueron adsorbido con la cepa de *E. coli* K12 (C600), posteriormente se realizó la precipitación del mismo mediante sulfato de amonio saturado para obtener la fracción de gama globulinas (Gama) de acuerdo al protocolo descrito por Harlow (1988). Así mismo se evaluó un suero hiperinmune contra el serotipo O157:H7, donado por el Dr. Carlos Eslava de la Facultad de Medicina de la UNAM .

Todos los sueros y fracción gama se probaron mediante aglutinación en placa utilizando un antígeno de la cepa EDL933 normalizado (10^6 bacterias por ml, inactivadas con fenol).

Utilizando el mismo antígeno y un anti- IgG de conejo peroxidado (SIGMA) fue estandarizada una técnica de ELISA. Para ello se determinó la concentración óptima de antígeno bacteriano usado para la sensibilización , la dilución óptima del suero de conejo hiperinmunizado, la dilución óptima de conjugado y el tiempo de incubación para la reacción antígeno anticuerpo (Tijssen, 1993; Crowther, 2001). Brevemente, las placas (Costar, media adherencia de 96 pozos) fueron sensibilizadas con 100µl del antígeno y 100 µl de la solución de bicarbonato (pH 9.6), se incubó toda la noche a 4° C, se lavó con solución de lavado (PBS Tween) y se agregaron 300 µl de grenetina al 1%, incubándose durante 2 h a 37° C, después de lavar exhaustivamente, se

agregaron 100µl del suero de conejo se incubó a 37° C , se lavó y se agregaron 100 µl del conjugado peroxidado anti- IgG de conejo para incubarse a 37° C, después del lavado se agregaron 50 µl del desarrollador de color incubando a temperatura ambiente y finalmente se agregaron 50 µl de una sol. de ácido fosfórico para detener la reacción, la lectura se tomó en un lector de microplacas (Metrolab 910) con un filtro de 492 nm. La cantidad de anticuerpo de la clase IgG se correlacionó con el cambio de absorbancia entre el pozo con antígeno menos la lectura del pozo sin antígeno (Crowther, 2001).

II.-Ubicación de *E. coli* EDL933 en el AC del conejo.

Obtención de las muestras

Para determinar la posición de la bacteria durante la infección experimental, se inocularon 10 conejos con 1 ml del cultivo completo de la cepa EDL933 en el AC como ya se describió previamente, después de la cirugía se realizó la eutanasia de pares de animales a las 4 , 24 , 48, 72 , 96 horas de la cirugía. Dos conejos fueron inoculados con 1 ml de la cepa K12 y se sacrificaron a las 96 horas postinoculación.

Se evaluaron las lesiones a la necropsia, se tomó el apéndice cecal, se dividió en dos porciones y una fracción se fijó con formalina amortiguada y la otra se embebió en TissueTec (SIGMA) y se congeló en nitrógeno líquido.

Con la porción en formalina se procedió a realizar cortes a 4µ mediante inclusión en parafina. Los cortes fueron desparafinados (Estrada y col., 1982) e hidratados para su uso. Con los tejidos mantenidos en nitrógeno líquido se realizaron cortes por congelación mediante criotomo (A.O.).

III.- Inmunoperoxidasa en tejidos

Se estandarizó la prueba de inmunoperoxidasa (IP) en portaobjetos, microplacas y tejidos (AC, riñón) sobre los cuales se depositaron cultivos de *E. coli* EDL933 y de la cepa K12(C600) como control negativo, los resultados obtenidos para los tejidos, determinaron usar el suero hiperinmune diluido 1:80 , el conjugado a una dilución 1:200 y como cromógeno se utilizó DAB. Se requirió eliminar la peroxidasa endógena mediante tratamiento previo con peróxido de hidrógeno (Harlow 1988). Después se verificaron estas condiciones realizando un ensayo previo utilizando cortes del AC de los conejos sacrificados a las 48 h postinoculación para estandarizar la técnica de IP en tejido de acuerdo a lo reportado en Harlow, (1988).

Los cortes hidratados fueron tratados durante 45 min con una solución de peróxido de hidrógeno al 0.6 % en metanol al 80% para eliminar la actividad de peroxidasa endógena, en seguida se agregaron 300 µl del suero de conejo hiperinmune dejándose actuar durante 1 h a 37° C en cámara húmeda ,

se lavó exhaustivamente con la solución de lavado (PBS-Tween 20), se agregaron 200 μ l del conjugado peroxidado (SIGMA) a una dilución 1:200 y se dejó actuar durante 30 min a 37°C en cámara húmeda. Finalmente se lavó y se agregaron 200 μ l del desarrollador de color, diamino benzidina (DAB, SIGMA), después de lavar el corte se sumergió en hematoxilina durante 10 seg, fue cubierto con glicerina y un cubreobjetos y se observó al microscopio.

III.-PATOGÉNESIS DE *Escherichia coli* EDL933 (O157:H7) INOCULADA EN EL APÉNDICE CECAL.

Para determinar parcialmente el mecanismo de patogenicidad de *E. coli* en el AC de los conejos, primeramente se evaluó el efecto de inocular sólo las bacterias viables, sin los productos extracelulares derivados del crecimiento bacteriano; después se evaluó el efecto de todos los productos extracelulares mediante la inoculación del filtrado libre de bacterias. Así mismo se buscó determinar el efecto de los componentes bacterianos intracelulares sobre el desarrollo de las lesiones utilizando sonicados de la bacteria. Finalmente se determinó el efecto provocado sólo por las toxinas Stx, sólo por el LPS y la respuesta a la mezcla de Stx más LPS.

Otro objetivo en esta parte del trabajo, fue analizar la sobreexpresión del receptor para las toxinas Stx inducida por el LPS, principalmente a nivel del apéndice cecal y del riñón; así como, determinar la ubicación celular de las toxinas en el AC y el riñón de los conejos inoculados.

5.5 Bacteria lavada

Se utilizó un cultivo de 18h en CST de la cepa EDL933, centrifugándose a 5,000 rpm durante 15 min a 6° C (SORVALL), el paquete bacteriano se resuspendió en PBS al volumen original, se mezcló perfectamente y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Este lavado se repitió dos veces más, al final se ajustó al volumen original con PBS y se utilizó como inóculo. Se emplearon dos conejos, inoculándose 1 ml del cultivo lavado en el AC. Los animales fueron evaluados de la manera antes mencionada.

5.6 Fase de crecimiento bacteriano.

Curva de crecimiento.-

Se realizó una curva de crecimiento para la cepa EDL933 en caldo CST utilizando técnicas previamente establecidas y tomando la turbidez mediante lecturas en Unidades Klett empleando un fotocolorímetro con filtro rojo. Se tomaron muestras en las fases: lag, logarítmica temprana, log intermedia, log tardía y en la fase estacionaria y se realizó la determinación de la producción

de las VTs sobre células Vero de acuerdo a Konowalchuck y col., (1977), la actividad de las verotoxinas se expresó en unidades citotóxicas en cultivo celular (UCCC) tomándose como el inverso de la máxima dilución que aún produjera al menos el 50% de destrucción del monoestrato celular (Palacios, 1992).

Obtención de los filtrados.

Se centrifugaron a 5,000 rpm durante 15 min. a 6° C, cinco ml. del cultivo realizado en el paso anterior a diferentes tiempos de incubación. Se tomó el sobrenadante y se pasó por un filtro de 0.2 μ de poro (Millipore) en condiciones de esterilidad, los filtrados se guardaron hasta su uso a -20°C.

Inoculación de los filtrados

Se utilizaron conejos NZ, inoculando 1 ml en el AC del cultivo completo o de un filtrado, de los tiempos: 1, 6, 18, 48 y 72 horas de crecimiento bacteriano. Del filtrado obtenido del crecimiento a 18 horas, se inocularon 0.5 , 0.6 , 0.8 y 1 ml en el apéndice cecal.

Como control se inoculó en el apéndice cecal 1ml de un cultivo completo de *E.coli* EDL933 o K12 (C600) con 18h de incubación; así como también, 1 ml de un filtrado obtenido a las 18h de incubación de ambas cepas, utilizando un conejo por inóculo.

Todos los conejos fueron evaluados por signología, patología clínica, lesiones a la necropsia e histopatología y la interpretación de resultados se realizó de acuerdo a lo indicado en el cuadro 3a y 3b.

5.7 Sonicado de *Escherichia coli* EDL933

Se realizó un cultivo en 5 ml de CST a partir de una colonia de la cepa EDL933, a las 18 h se inocularon 100 ml de CST con 1 ml del cultivo obtenido y se dejó incubando 18 h. El cultivo fue dividido en 3 porciones, una de las cuales fue colocada en un baño de hielo y sometido a sonicación utilizando tres ciclos de 60 seg, a una frecuencia de 90–45 Hertz, otra porción se sometió a cinco ciclos de 60 seg a la misma frecuencia. La última porción sólo se colocó en un baño de hielo durante 10 min.

Los sonicados fueron divididos en dos fracciones, una de las cuales se filtró a través de una membrana Millipore de poro 0.2 μ .

De esta manera se obtuvieron seis inóculos:

- I) Cultivo completo sonicado con tres ciclos
- II) Cultivo completo sonicado con cinco ciclos
- III) Filtrado del sonicado de tres ciclos
- IV) Filtrado del sonicado de cinco ciclos

V) Filtrado de cultivo sin sonicar

VI) Cultivo completo de la cepa de *Escherichia coli* K12 sonicado cinco ciclos.

Se realizó la inoculación de dos animales por cada preparado, colocando 1 ml en el AC. Los animales fueron monitoreados mediante los exámenes clínicos de laboratorio e histológicos antes descritos.

El control del experimento consistió en un sonicado de la cepa K12 obtenido bajo condiciones iguales a la EDL933 (cinco ciclos), inoculado en el AC (inóculo VI).

A los inóculos usados se les determinó:

- a) Título de toxina VT, usando el ensayo en células Vero, descrito por Konowalchuck y col. en 1977, siguiendo la técnica como se describe en Palacios (1992).
- b) Se cuantificó la proteína total mediante la técnica de Bradford.
- c) Se les realizó una prueba de esterilidad sembrando los sonicados sobre agar soya tripticaseína.

5.8 Inoculación de Lipopolisacárido (LPS) de *E.coli*.

Se utilizó un extracto de LPS de la cepa de *E. coli* O157:H7 donado por el Dr. Carlos Eslava de la Facultad de Medicina UNAM, éste fue obtenido mediante el método de Westphall y se encontraba liofilizado, se resuspendió en 5 ml de agua inyectable, de esta suspensión se realizó una dilución 1:4, dilución que fue empleada para inocular en el AC, 1 ml por conejo, empleando la técnica quirúrgica antes descrita. El inóculo así empleado contenía 1.7 mg/ml de endotoxina, medida mediante el equipo E-toxate (Sigma Ch.Co). Los animales se evaluaron en forma rutinaria.

5.9 Inoculación de las toxinas semipurificadas STx de *E. coli* EDL933 (O157:H7).

I.-Obtención de la toxina Stx de *E.coli* EDL933.

Se obtuvieron 500 ml de un cultivo en CST de 24 h, de la cepa EDL933. En el cultivo se determinó la concentración de bacterias viables por siembra en placas de AST. El cultivo se centrifugó a 5,000 rpm / 20 min. a 6°C en centrífuga refrigerada, se separó el sobrenadante y se pasó a través de membranas de 0.4µ de poro (Millipore). Al filtrado se le determinó la concentración de proteína mediante la técnica de Bradford (Harlow y col., 1988), el título de toxina Stx mediante células Vero y se le realizó una prueba de esterilidad.

II.- Semipurificación de las toxinas Stx de *E.coli* EDL933.

Básicamente se siguió el procedimiento de Ultrafiltración reportado por Deutscher (1990), que consistió en utilizar 100 ml del filtrado obtenido previamente, pasándolos a través de una membrana de ultrafiltración (AMICON) de poro 100,000 , reduciéndose el volumen a 10 ml sobre la membrana y recolectando esta fracción (fracción > de 100,000); el ultrafiltrado fue pasado por una membrana de poro 50,000 , manteniendo 5 ml del contenido sobre la membrana (fracción 50-100), los 85 ml finales de filtrado se pasaron por una membrana de poro 30,000 (fracción < 30,000) y el filtrado fue recolectado. Todas las fracciones obtenidas fueron mantenidas en congelación (-80°C) hasta su uso.

En todos los pasos se tomaron muestras a las cuales se les realizó: determinación de proteínas mediante la técnica de Bradford, titulación de toxina usando el ensayo con células Vero y finalmente se calculó la actividad específica determinando la actividad de la toxina por unidad de proteína (μg) (Deutscher, 1990).

A las fracciones se les realizó corrimiento electroforético en geles de Poliacrilamida (SDS-PAGE), revelando con azul de Coomassie y nitrato de plata. Finalmente se realizó la determinación del contenido de endotoxina a la fracción 50-100, sobrenadantes y sonicados del cultivo de 18h de la cepa EDL933 mediante el ensayo de E-Toxate (Sigma).

III.- Inoculación de los conejos en el AC.

Toxina

Con la fracción que contenía la actividad verocitotóxica se inocularon dos conejos, colocando 1 ml de la fracción, en el apéndice cecal, los animales fueron evaluados rutinariamente como se mencionó anteriormente.

El control utilizado fue la fracción 50-100 obtenida de la misma manera pero utilizando un cultivo de la cepa de *E.coli* K12 (C600).

LPS + Toxinas.-

Se utilizó el LPS donado por el Dr. Carlos Eslava de la Facultad de Medicina (UNAM), la fracción obtenida anteriormente (50-100) y una endotoxina estandar de la cepa de *Escherichia coli* (SIGMA) . Con ella se realizaron las siguientes combinaciones, colocando 0.5 ml de cada componente:

- a) LPS (O157) + Toxina(50-100).
- b) Endotoxina (O26) + Toxina (50-100)
- c) LPS (O157) + endotoxina (O).

Se realizó la cirugía en el apéndice cecal de los conejos, utilizando las combinaciones anotadas, se inocularon dos conejos por cada preparación. Además fueron inoculadas parejas de conejos, con cada uno de los componentes por separado y otros dos con los tres componentes juntos. Los animales fueron evaluados en forma rutinaria por exámenes clínicos, de laboratorio, necropsia e histopatología.

5.10 Ubicación de la toxina

I.- Obtención de las muestras.

Se inocularon 10 conejos con 1 ml del cultivo completo de la cepa EDL933 , después de la cirugía se realizó la eutanasia de pares de animales a las 4 , 24 , 48, 72 , 96 horas postoperatorio. Dos conejos fueron inoculados con 1 ml de la cepa K12 y sacrificados a las 96 horas postinoculación.

Se evaluaron las lesiones a la necropsia , se tomó el apéndice cecal, se dividió en dos porciones y una fracción se fijó con formalina amortiguada y la otra se embebió en TissueTeK (SIGMA) y se congeló en nitrógeno líquido.

Con la porción en formalina se procedió a realizar cortes mediante inclusión en parafina a 4 μ . Los cortes fueron desparafinados (Estrada y col., 1982) e hidratados para su uso. Con los tejidos mantenidos en nitrógeno líquido se realizaron cortes por congelación en un criotomo, los cuales fueron depositados sobre portaobjetos tratados con grenetina al 1% (Harlow, 1988). A cada corte se le agregó un mezcla 1:1 de anticuerpo monoclonal contra la toxina VT1 y VT2 (donado por la Facultad de Medicina UNAM), se dejó incubando 3 h a 37° C en cámara húmeda, se lavó mediante PBS Twen, se agregaron 30 μ l de un conjugado fluoresceinado anti ratón (SIGMA), se dejó actuar durante 1 h a 37° C, se lavó exhaustivamente, se le agregó una gota de medio de montaje para fluorescencia (SIGMA) y se observó al microscopio de epifluorescencia .

II.- Evaluación del receptor para la toxina en tejidos.

Se utilizaron los animales inoculados con la cepa EDL933, con la cepa K12, con la toxina purificada , con el LPS (O157) y un testigo inoculado con 1ml de caldo soya tripticaseína. De ellos se obtuvieron cortes por congelación del apéndice y del riñón.

Sobre los cortes se colocaron 50 μ l del sobrenadante de la cepa K12 o de la cepa EDL933 como fuente de toxinas VT1 y VT2, se incubó a 4° C durante toda la noche en cámara húmeda. Después se lavaron los cortes 1 vez con PBS y se agregaron 50 μ l de una mezcla de los anticuerpos monoclonales anti VT1 y anti-VT2 diluïdos 1:100, se incubaron a 37°C durante 3 horas, al final de la cual se lavaron 5 veces con PBS. Finalmente se agregaron 50 μ l de

anti ratón fluoresceinado (SIGMA) diluido 1:10,000 para incubarse 1 hora a 37° C. Al término, se lavaron los cortes 5 veces con PBS- 2% tween 20, 5 veces con PBS y se colocó una gota de medio de montaje para fluorescencia (Sigma).

La observación se realizó mediante un microscopio de epifluorescencia, equipado con una cámara de video. Las imágenes fueron grabadas en computadora, para su análisis posterior.

RESULTADOS

I.- DESARROLLO DEL APÉNDICE CECAL DEL CONEJO

6.1 Desarrollo morfohistológico del apéndice cecal del conejo.

Los resultados demostraron que el AC incrementa su tamaño con la edad pasando de 0.5cm a 13.4 cm de longitud en promedio y de un peso de 3.0 a 160g (Cuadro 4) con un crecimiento proporcional del órgano hasta los 300 días y una posible involución manifiesta a los 3 años.

Histológicamente se aprecian diferencias a nivel de la mucosa consistentes en tipo de epitelio y forma de las proyecciones a la luz del AC, antes del nacimiento el AC se encontró con un epitelio cuboidal de células isomorfas, que tienden a proyectarse levemente hacia la luz, al nacimiento se observa una proyección larga y una corta, hacia el interior una separación de tejido conjuntivo que contiene células musculares lisas en patrón discontinuo para terminar en una serosa delgada. Entre los 15 y 30 días de edad, el epitelio tiende a modificarse en las proyecciones cortas teniendo un patrón aplanado y manteniéndose el patrón cuboidal en las proyecciones largas; cambio que coincide con la estructuración de la proyección corta en forma piramidal y de la proyección larga en forma de sombrilla tapando parcialmente y recubriendo a las proyecciones cortas (Fig. 1c), el epitelio en las proyecciones largas se mantiene en forma cuboidal en la base y se observa columnar bajo en la proyección, con la aparición de células caliciformes recordando la estructura general del intestino (Ross y col., 1992). A los 30 días la forma que presentan las vellosidades es la que tendrá durante toda la vida del animal (Fig. 2); de tal manera que analizando los cortes longitudinales (Figura 3) y transversales realizados en el AC, fue posible imaginar la estructura de las vellosidades en unas cortas, de epitelio plano, de forma cónica que son recubiertas totalmente por las vellosidades altas formando como "sombrillas" que dejan pequeñas grietas de comunicación hacia la profundidad, en donde se encuentran las vellosidades cortas (Fig.3). Con respecto a las capas que componen el AC, antes del nacimiento y hasta los 15 días, solo se identifica una sola entre el epitelio y la serosa; sin embargo a los 30 días empieza a aparecer una muscular de la mucosa, por lo que es posible identificar una mucosa, una submucosa y una serosa (Fig. 2 y 3).

Antes del nacimiento y en los primeros 10 días después de éste, ocurre la colonización de linfocitos, con algunos de ellos dispersos en el tejido conjuntivo que se encuentra entre el epitelio y la serosa, zona que en esta etapa es delgada, entre los 10 y 15 días de edad se empiezan a agregar en pequeños grupos de 6-10 linfocitos, sin aparente predilección por alguna zona

y continuando en aumento hasta formar cúmulos (a los 30 días aproximadamente), este fenómeno coincide con la proyección de la mucosa hacia la luz en dos formas de la vellosidad, una corta y una alargada (figura 1c) . Después se observa un gran acumulo de linfocitos , principalmente bajo las proyecciones piramidales (fig.1c) que continúa poblándose hasta formar dos acúmulos linfoides con organizaciones definidas, uno a nivel de la mucosa y el otro en la submucosa, las cuales se encuentran separadas por tejido muscular (Fig.2). Aparentemente existe un cambio microscópico en las poblaciones de linfocitos de la región, considerando la basofilia del citoplasma, la hipercromicidad del núcleo y la distribución de la cromatina nuclear. Antes del nacimiento y durante los primeros 15 días de edad los linfocitos presentan núcleo de cromatina agregada en patrones periféricos, nucleolo aparente y citoplasma levemente basófilo, después de los 15 días, en la población de linfocitos predominan los que se observan con núcleos de cromatina dispersa, sin nucleolo y basofilia citoplasmática acentuada, siendo comparativamente mas pequeños que los anteriormente descritos.

CUADRO 4

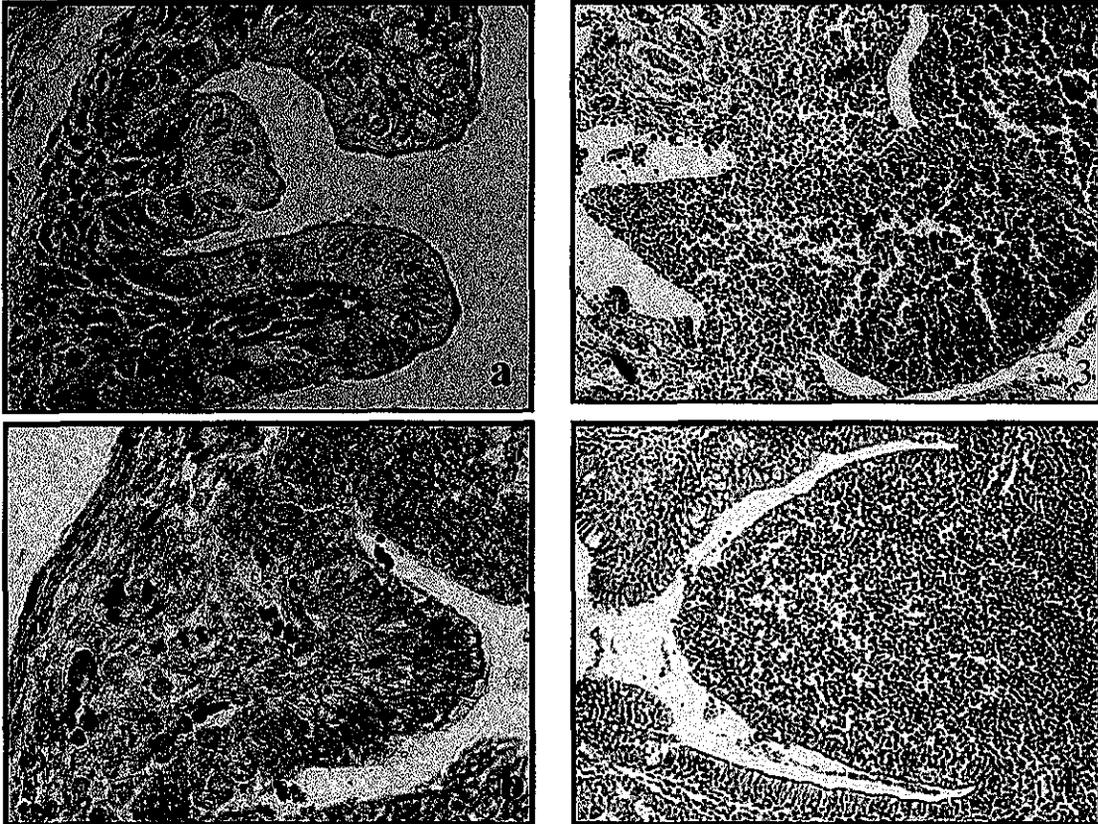
Hallazgos de las características del desarrollo del apéndice cecal en conejos Nueva Zelanda

Edad * (días)	Peso total del conejo ** (g)	Longitud del apéndice (cm)	Peso del apéndice (g)	Relación: peso total / peso apéndice
- 14	52	0.5	3.0	17.33
- 11	61	0.6	3.6	16.94
5	190	1.2	8.4	22.62
10	350	1.5	10.5	33.33
15	450	3.4	27.2	16.54
30	1200	5.7	47.0	25.53
60	1800	6.8	61.4	29.31
90	2500	7.5	67.5	37.03
120	3400	9.0	85.0	40.00
300	4200	10.9	100.0	42.00
1000	4700	13.4	160.0	29.34

* La edad fue tomada de los registros o proporcionada por el encargado del área

** Los pesos son promedio de los animales muestreados en cada edad . El promedio de gestación en esta raza es de 31 días y el destete se realiza entre los 15 y 20 días de edad.

FIGURA 1
IMÁGENES HISTOLÓGICAS DEL APÉNDICE CECAL DEL CONEJO NUEVA
ZELANDA A DIFERENTES EDADES.

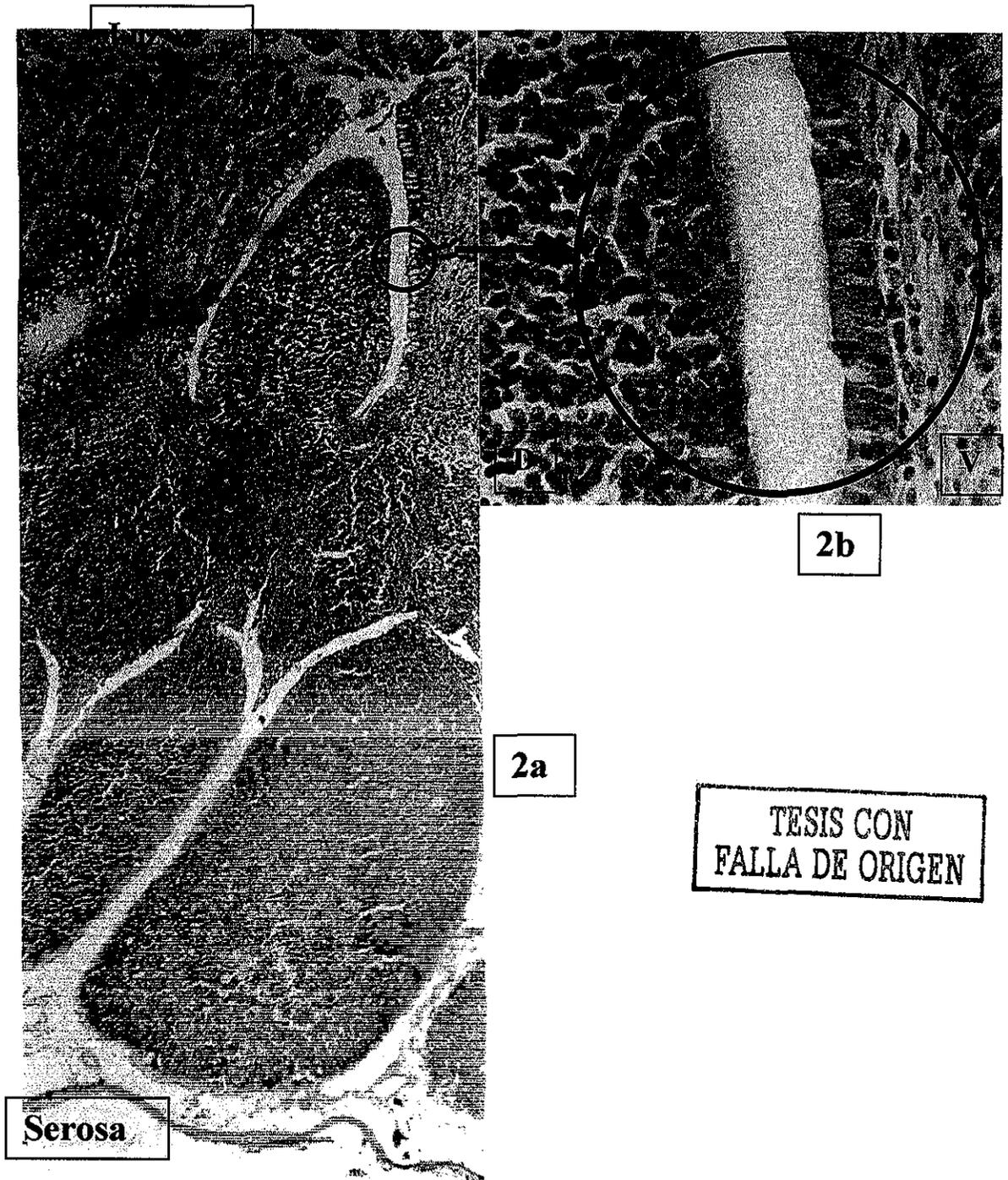


a.- Al nacimiento , b.- 15 días, c.- 30 días y d.- 60 días

Se realizaron cortes por parafina y se tiñeron mediante H.E. fotografiándose con los objetivos 40X, 40X, 10X y 10X respectivamente

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA N° 2
MICROFOTOGRAFIA DEL APÉNDICE CECAL DEL CONEJO
A LOS DOS MESES DE EDAD



2 a) Composición de toda la pared del apéndice cecal. b) ampliación de la mucosa en las proyecciones del Domo (D) y la Vellosidad (V).

II.-CARACTERIZACIÓN DEL MODELO ANIMAL EN EL CONEJO

Las consideraciones realizadas para las constantes fisiológicas y de laboratorio en los animales sanos, fueron las mismas que las encontradas previamente (Valdivia, 1995), coincidiendo con los animales usados en el presente trabajo, por ello se consideraron de la misma manera (resultados no descritos) y se indicaron cuando fue necesario hacerlo. Las alteraciones clínicas, patológicas y de laboratorio obtenidas previamente en el desarrollo del modelo animal en conejos, se muestran en el cuadro 3 en donde se consideran los principales hallazgos clínicos, de laboratorio, de la necropsia y al examen histológico (Valdivia, 1995).

En la figura 4 se observa el AC de un conejo al momento de la cirugía así como el sitio de corte para su separación pero manteniendo la irrigación original.

En el presente trabajo, se consideró un efecto de las verotoxinas (efecto VT) a los resultados que reúnen todas las características indicadas en el cuadro 3. Además de las consideraciones de interpretación para las pruebas de laboratorio de acuerdo a Galen (1980) que se indican en el cuadro 5.

CUADRO 5
CRITERIOS DE INTERPRETACION PARA LAS
DETERMINACIONES DE LABORATORIO MAS UTILES
PRACTICADAS EN LOS CONEJOS

GRADO	PORCENTAJE DE ALTERACIÓN	ERITROCITOS millones/mm ³	HEMATOCRITO %	UREA mg/dl	CREATININA mg/dl
LEVE	10-20	4.1-4.6	20-22.5	35-39	0.8-1.0
MODERADO	20-30	3.5-4.0	15-20	40-65	1.1-1.9
SEVERO	mayor a 30	< 3.4	< 15	>65	>2.0

Calculado de acuerdo a Galen, 1980, basado en los valores de referencia del Cuadro 2

6.2 Edad de los animales

Los resultados de los conejos inoculados a los 1, 1.5, 2, 3 y 6 meses de edad se muestran en el cuadro N° 6, en él se indican los días de sobrevivencia posteriores a la inoculación en el apéndice cecal, el resultado terminal, cuadro clínico y cuadro patológico con el que murieron y el desarrollo o no de uremia, considerando ésta como una de las características de patología clínica

para el SUH. En la figura 5 se observa el aspecto del AC "in situ" durante la necropsia de uno de los animales de 2 meses de edad inoculado con la cepa de *Escherichia coli* K12 C600

Como se aprecia, al principio existieron signos asociados a diarrea; pero en los conejos mas grandes, se obtuvieron datos primarios de lesión al SNC, parecido para lo observado en el SUH. Durante la necropsia las lesiones características producidas por la cepa de *E.coli* O157:H7 consistieron en distensión del AC por liquido hemorrágico, úlceras ocasionales en el estómago, intestino delgado; con acumulación de líquido sero-hemorrágico en el intestino delgado y contenido hemorrágico y diarreico en el ciego, así como una disminución marcada del tamaño del bazo (Fig. 6 y 7)

Las elevaciones de urea y creatinina sérica, como medida de la insuficiencia renal, fueron realizadas periódicamente y los resultados, expresados en función del tiempo, se observan en el cuadro N° 7 , en él también se indica cuando existió una baja considerable de los eritrocitos en la biometría hemática o hemograma. Así mismo, en la figura 8 se puede observar una imagen al microscopio del sedimento urinario de uno de los conejos de dos meses de edad inoculado con la cepa EDL933, el sedimento corresponde con un resultado de hemoglobinuria y proteinuria.

Por otro lado, la lesión histopatológica típica en el AC de un cuadro VT, se caracterizó por hemorragias, edema, distensión de linfáticos, destrucción de poblaciones linfocitarias locales, infiltrado de linfocitos hacia la zona, sin destrucción del epitelio (Fig. 9).

El conejo de 32 días de edad, tuvo un cuadro de coagulación intravascular diseminada con septicemia (Cuadro 6), consecuencia de una fuga en el segmento del AC , probablemente asociada a que las paredes del AC son más delgadas y friables a estas edades y por lo tanto se dificulta la técnica quirúrgica, además de que el AC es menos resistente a la distensión por el contenido inoculado y el volumen que se genera. Todo animal que después de operado presentó fuga en el segmento, fue eliminado del trabajo y la discusión.

CUADRO 6
PRINCIPALES HALLAZGOS EN LOS CONEJOS DE DIFERENTES EDADES
INOCULADOS CON LA CEPA DE *Escherichia coli* EDL933

EDAD (días)	PESO (kg)	SOBREVIDA (días)	RESULTADO TERMINAL *	UREMIA
32	1.27	4	CID	No
30	1.22	4	SCPA	No
29	1.18	5	Diarrea	Leve
35	1.45	29	Diarrea	No
35	1.35	7	Diarrea	No
35	1.42	5	Efecto VT	Leve
40	1.50	7	Efecto VT	Si
45	1.65	6	Efecto VT	Si
60	1.80	6	Efecto VT	Si
65	2.10	6	Efecto VT	Si
66	2.25	7	Efecto VT	Si
85	3.0	2	SNC, Efecto VT	ND
95	2.9	8	SNC, Efecto VT	si
180	4	7	SNC, efecto VT	Si
180	4.2	7	SNC, efecto VT	Si

* Resultado.- Resumen referido a los hallazgos más significativos en la necropsia, patología clínica y signología, indicando el aparato o sistema afectado

Efecto VT.- cuando los animales presentaron las lesiones y signos como los previamente descritos para el modelo cuadro 3 (Valdivia 1995).

SNC.- Alteraciones en el sistema nervioso central consistentes en parálisis flácida del tren posterior, luego el anterior hasta la cuádruplejia.

CID.- Coagulación intravascular diseminada

SCPA.- Sin cambios patológicos aparentes. ND.- No determinado

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CUADRO 7
DETERMINACIONES DE UREA Y CREATININA SERICAS EN LOS
CONEJOS DE DIFERENTES EDADES INOCULADOS EN EL
APÉNDICE CECAL.

Muestreo postoperatorio (días)

EDAD DE LOS CONEJOS (días)	3	5	10	16	25
32	33/0.4 ++	MUERTE			
30	28/0.7	MUERTE			
29	73/1.4	58/1.0	MUERTE		
35	91.1/1.4	ND	44.4/1	ND	43.8/0.8
35	82/1.0	55/1.3	MUERTE		
35	65/0.9	74/1.6	MUERTE		
40	91.1/1.4 *	88.5/2.5*	MUERTE		
45	55/1.7	89/1.9	MUERTE		
60	77/1.6	107/2.5 *	MUERTE		
66	80/1.7	115/3.0	MUERTE		
65	90/1.8	95/2.3	MUERTE		
85	MUERTE				
95	93/1.5	100/2.5	MUERTE		
180	77/1.8	87/2.1	MUERTE		
180	85/2.2	93/2.4	MUERTE		

++.- Referido como urea/creatinina (mg/dl) ; valor normal: Urea=22-32.3mg/dl .
 creatinina=0.3-0.73

*.- Se encontraron datos de anemia leve, considerando una baja de hasta un 20% de los valores previamente determinados como normales para la población trabajada.

valores normales: Eritrocitos=5.12-6.27millones/mm³, Hematocrito= 25.6-31.9 %

ND- No se realizo la determinación.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

6.3 Concentración de las bacterias inoculadas

Los resultados obtenidos de inocular diferentes concentraciones de *E. coli* EDL933 (O157:H7), todas ellas obtenidas a partir de un cultivo de 18h en CST, se muestran en el cuadro N° 8 y en el cuadro N° 9 la interpretación clínica, de laboratorio e histopatológica de los resultados.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CUADRO 8
HALLAZGOS DE LABORATORIO ENCONTRADOS EN LOS CONEJOS INOCULADOS
CON DIVERSAS CONCENTRACIONES DE BACTERIAS.

CONC. BACT. INOCULADAS (UFC)	SOBREVIDA (días)	DÍA DE MUESTREO	Nº de GR millones/m ³	Hematocrito %	Urea/creatinina mg/dl
0.8 x 10 ⁸	5	2	4.8	27.8	66/2.0
		5	3.0	15.0	87/2.6
0.8 x 10 ⁸	4	3	2.8	14.2	90/3.0
4 x 10 ⁷	5	2	3.2	16.9	85/2.8
4 x 10 ⁷		5	4.0	18.0	75/1.8
2 x 10 ⁷	6	2	3.9	16.3	58/1.9
		5	3.5	15.7	79/2.8
2 x 10 ⁷	7	2	4.0	18.4	62/1.5
		5	3.6	15.8	96/2.7
1.6 x 10 ⁷	3	2	3.8	18.2	65/1.4
1.6 x 10 ⁷	6	2	4.2	21.0	60/1.2
		5	2.8	12.8	63/2.0
1.6 x 10 ⁶	2	2	3.7	20.3	66/1.8
1.6 x 10 ⁶	5	2	4.6	26.6	45/0.8
		5	3.9	17.9	60/1.8
1.6 x 10 ⁵	18	2	3.9	16.7	40/0.9
		5	4.1	18.0	54/1.9
		7	4.3	20.6	65/1.8
		15	4.9	21.5	33/0.7
1.6 x 10 ⁵	27	2	5.1	28.5	35/0.9
		5	4.9	27.9	40/1.0
		7	4.3	19.7	37/1.1
		20	5.2	24.4	32/0.9
1.6 x 10 ⁴	27	2	5.9	25.9	33/0.8
		5	5.0	23.0	40/1.0
		7	5.8	24.9	37/0.9
		20	5.6	31.3	35/0.6
1.6 x 10 ⁴	27	2	5.0	24.0	30/0.5
		5	6.0	30.2	39/0.9
		7	5.8	31.2	34/0.7
		20	5.9	30.9	25/0.4
1.6 x 10 ²	27	2	5.9	24.7	27/0.6
		5	5.7	25.0	18/0.7
		7	6.1	28.0	29/0.7
		20	6.2	29.1	21/0.4
1.6 x 10 ²	29	2	6.0	27.6	ND
		5	5.8	25.5	29/0.5
		7	5.6	25.2	31/0.8
		20	5.3	24.9	29/0.7

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CUADRO N° 9
RESUMEN DE LOS PRINCIPALES HALLAZGOS CLÍNICOS Y DE
LABORATORIO ENCONTRADOS EN LOS CONEJOS INOCULADOS CON
DIVERSAS CONCENTRACIONES DE BACTERIAS.

CONC. BACT. INOCULADAS (UFC)	SOBREVIDA (días)	EFECTO	ANEMIA	UREMIA
0.8×10^8	5	VT	Severa	Severa
0.8×10^8	4	VT	Severa	Severa
4×10^7	5	VT	Severa	Severa
4×10^7	5	VT	Severa	Severa
2×10^7	6	VT	Moderada	Severa
2×10^7	7	VT	Moderada	Severa
1.6×10^7	3	VT	Moderada	Moderada
1.6×10^7	6	VT	Severa	Severa
1.6×10^6	2	VT	Moderada	Moderada
1.6×10^6	5	VT	Moderada	Moderada
1.6×10^5	18	Diarrea, VT	Leve	Moderada
1.6×10^5	27	Diarrea moderada	Leve	Leve
1.6×10^4	27	Diarrea moderada	No	Leve
1.6×10^4	27	Diarrea leve	No	Leve
1.6×10^2	27	SCPA	No	No
1.6×10^2	29	SCPA	No	No

El cultivo original presentó un título de 1.6×10^8 UFC/ ml y correspondió con 10^6 UCCC/ ml de toxina . la dosis en todos los casos fue de 1 ml en el apéndice cecal. La anemia y uremia se consideraron independientemente de en que momento aparecieron (ver cuadro 8) interpretándose como una anemia leve , moderada y severa si se obtenía una disminución de los GR y/o del hematocrito de un 10-20% , 20-30% o >30% respectivamente. El mismo criterio se tomó para los aumentos de niveles de urea sérica , en ambos casos comparando con los valores normales obtenidos previamente que fueron de ; urea=22-32.3mg/dl , creatinina=0.3-0.73 mg/dl.

6.4 Localización de la bacteria

I.- Obtención del suero hiperinmune contra la cepa de *E.coli* O157:H7 (EDL933)

Los resultados obtenidos fueron de 1:1,600 para el suero hiperinmune obtenido en el presente trabajo y de 1:3,200 para el donado por la Facultad de Medicina.

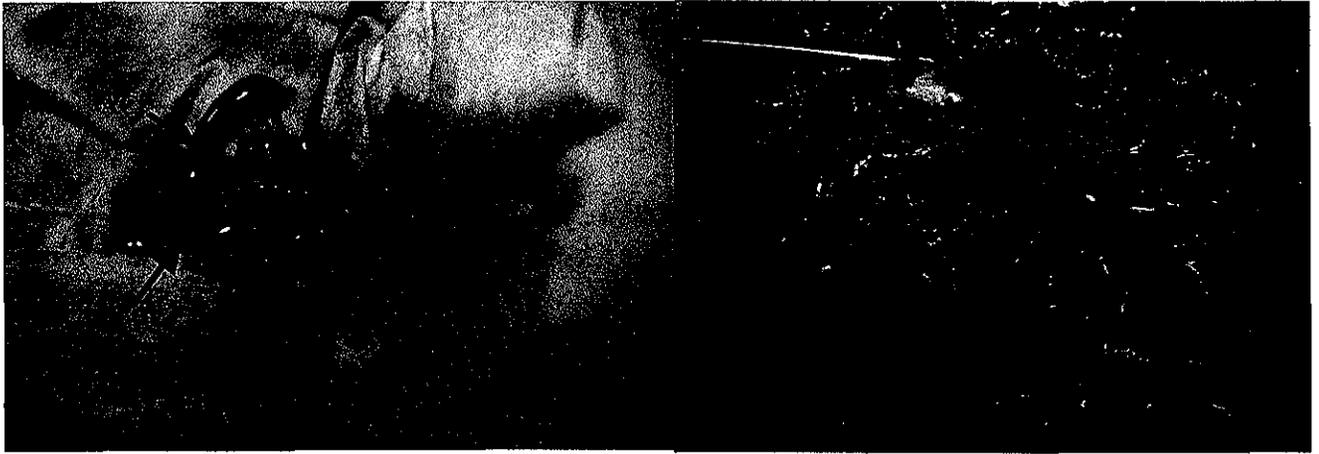


Fig.4 Fotografía del apéndice cecal (AC) de un conejo mostrando la irrigación. La flecha muestra la zona de Incisión quirúrgica.

Fig.5 .-Fotografía del aspecto macroscópico del AC, "in situ" de un conejo inoculado con la cepa de Escherichia coli K12 C600 a los 21 días de operado.

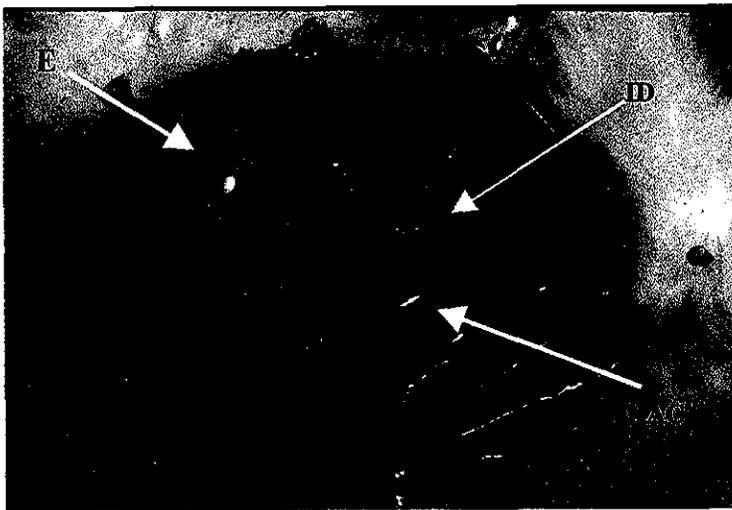


Fig. 6. Lesiones a la necropsia de un conejo inoculado con la cepa De E. coli EDL933 a los 7 días de operado. (AC) apéndice cecal (E) estómago, (ID) intestino delgado.

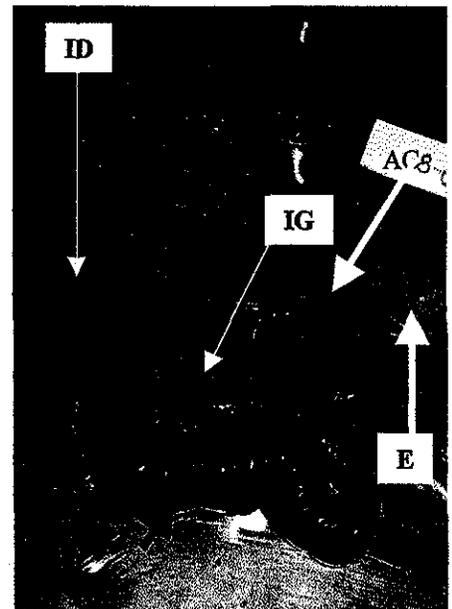


Fig. 7. Aparato gastrointestinal de un conejo Inoculado con la cepa EDL933, muerto a Los cinco días de inoculado. (E) estómago (C) ciego, (IG) intestino grueso, (ID) intestino Delgado, (B) bazo.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

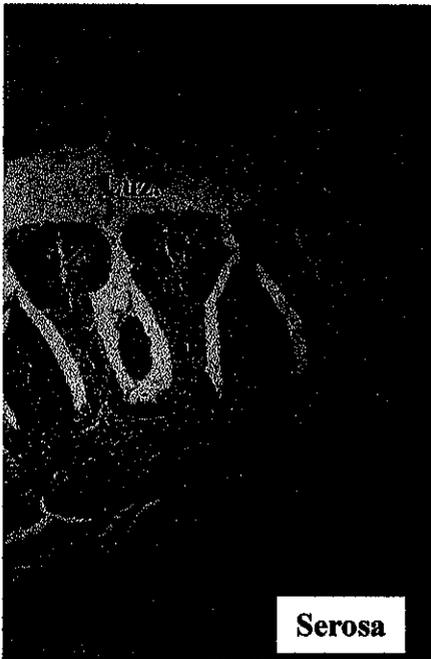


Fig. 3. Corte longitudinal del apéndice Cecal de un conejo sano teñido por H.E. Amplificación 50X.

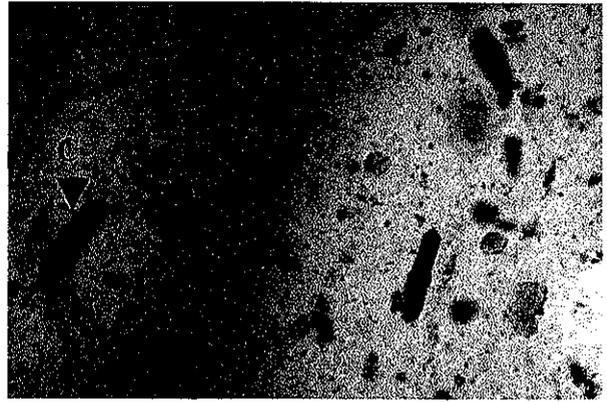


Fig. 8.- Microfotografía del sedimento urinario de Un conejo inoculado en el AC con la cepa EDL933, Sin teñir. © cilindros granulosos Amplificación 400X

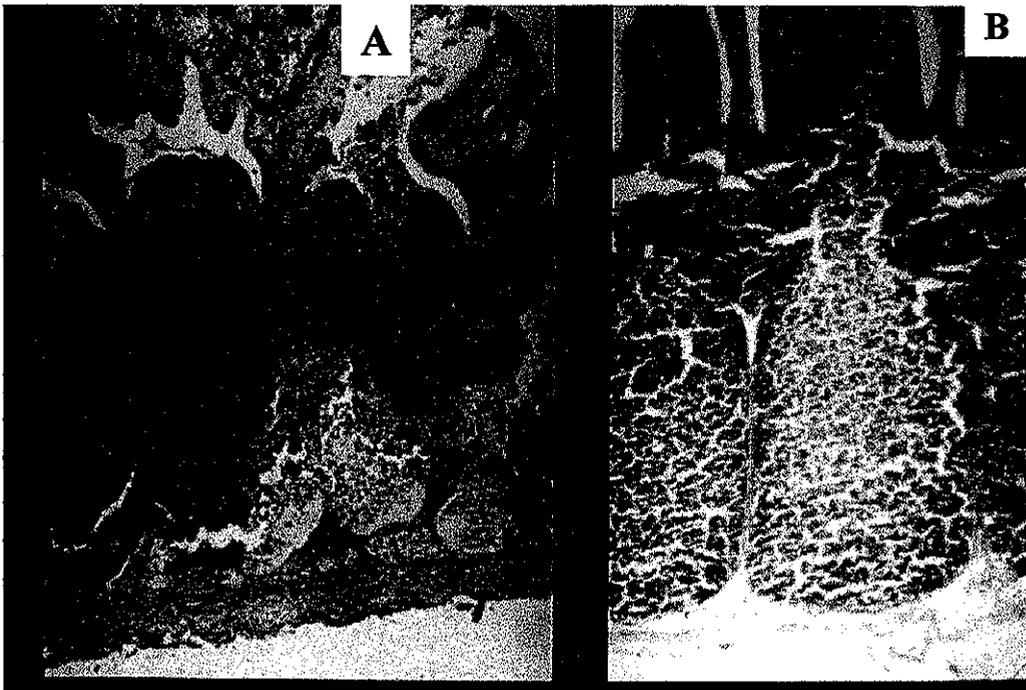
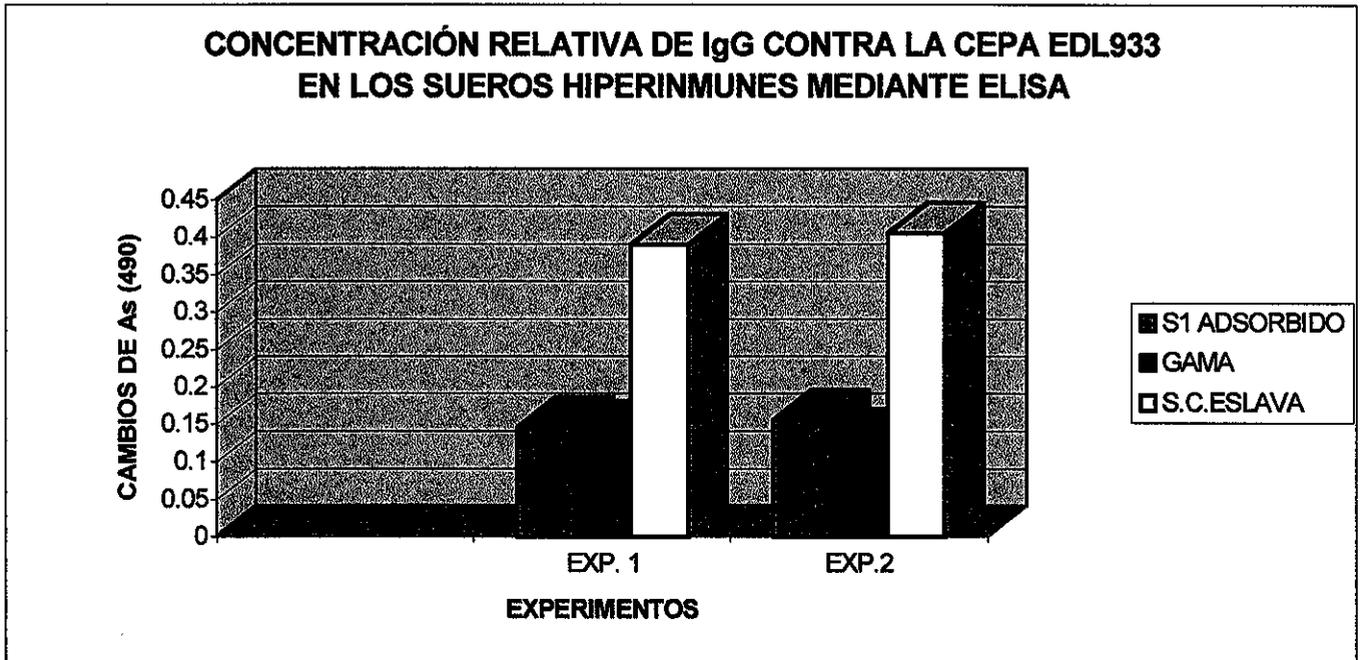


Fig. 9. Cortes histológicos teñidos por HE, de un conejo inoculado con la cepa EDL933 (A) Y de un conejo sano (B). La parte superior corresponde con la Luz del AC y la inferior Con la serosa del órgano.

Los títulos de absorbancia a 492 nm obtenidos mediante la técnica de ELISA estandarizada durante este trabajo, se muestran en la Fig. 10.

FIGURA N° 10



Se utilizó un conjugado anti IgG de conejo peroxidado diluido 1: 1500, y los resultados se muestran como cambios de absorbancia obtenidos restando la lectura del pozo sensibilizado con la cepa K12, del pozo sensibilizado con la cepa EDL933 como antígenos. El experimento se realizó utilizando seis pares de pozos por suero y repitiéndolo en dos ocasiones (Exp. 1 y Exp.2), los resultados son promedio de las seis determinaciones en cada experimento.

Como se aprecia la cantidad de IgG fue casi tres veces mayor en el suero preparado en la Facultad de Medicina por el Dr. Carlos Eslava, que el obtenido en el presente trabajo, por ello se utilizó este suero hiperinmune para los trabajos posteriores.

6.4 Ubicación de *E.coli* EDL933 en el apéndice cecal del conejo

Obtención de las muestras.

De los animales inoculados en el AC con la cepa EDL933 y sacrificados a diferentes tiempos, se encontraron las alteraciones del AC que son resumidas en el cuadro N° 10.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CUADRO 10

ALTERACIONES ENCONTRADAS EN EL APÉNDICE CECAL DE LOS CONEJOS INOCULADOS CON *Escherichia coli* EDL933 (O157:H7)

Inóculo	Eutanasia (h)	Aspecto del apéndice cecal
K12 cultivo	24	SCPA
EDL933 cultivo	4	SCPA
EDL933 cultivo	4	SCPA
EDL933 cultivo	24	aumento de tamaño, enrojecido y contenido hemorrágico leve
EDL933 cultivo	24	aumento de tamaño, enrojecido y contenido hemorrágico leve
EDL933 cultivo	48	Enrojecido, aumentado de tamaño, contenido hemorrágico
EDL933 cultivo	48	Enrojecido , aumentado de tamaño y contenido hemorrágico leve
EDL933 cultivo	72	Aumentado de tamaño, enrojecido, contenido hemorrágico
EDL933 cultivo	72	Aumentado de tamaño, enrojecido, contenido hemorrágico
EDL933 cultivo	96	Aumentado de tamaño, enrojecido, contenido hemorrágico
EDL933 cultivo	96	Aumentado de tamaño, enrojecido, contenido hemorrágico
K12	96	Aumento de tamaño con contenido blanquecino

SCPA.- Sin cambios patológicos aparentes

Inmunoperoxidasa (IP) en tejidos.

Los resultados obtenidos de la evaluación de la ubicación de la bacteria mediante IP, así como las alteraciones tisulares observadas en el apéndice cecal de los conejos sacrificados a diferentes tiempos , se resumen en el cuadro 11.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CUADRO 11
ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS Y UBICACIÓN DE *Escherichia coli* O157:H7
EN EL APÉNDICE CECAL DE LOS CONEJOS CON DIFERENTES TIEMPOS
DE EFECTO

Tiempo Horas (cepa)	Bacteria EDL933 ubicada en: *	Tipo de leucocitos en la luz **	Tipo de leucocitos en la mucosa	Tipo de leucocitos en la submucosa
4 (EDL933)	Luz y asociada al epitelio	Ninguno	Ninguno	Neutrófilo
24 (EDL933)	Luz, asociada a n la mucosa	Neutrófilos	Neutrófilos	Neutrófilos y macrófagos (escasos)
48 (EDL933)	Luz y en la mucosa	Neutrófilos	Neutrófilo, linfocito	Neutrófilo, macrófago y linfocito
72 (EDL933)	Luz, Mucosa	Neutrófilos Macrófagos escasos	Linfocito	Linfocito Macrófagos
96 (EDL933)	Mucosa, Submucosa (escasas)	Neutrófilos Macrófagos	Linfocito (escaso) Disminución de linfocitos	Linfocito Disminución de linfocitos
4 (K12)	No aparece	Ninguno	Ninguno	Ninguno
96 (K12)	No aparece	Neutrófilo	Neutrófilos (escasos)	Ninguno

- *Determinado mediante inmunoperoxidasa
- ** Determinado mediante tinción con hematoxilina y eosina

La bacteria invadió la mucosa desde las 24 h post-inoculación, llegando hasta la submucosa en baja cantidad a las 96 h, se encontró principalmente dentro de los macrófagos locales y se observaron algunas bacterias libres en el estroma. También fue posible observar bacterias adheridas a las células del epitelio del Domo, mediante examen bacteriológico (cultivo) no se detectaron bacterias (cepa EDL933) en otro órgano o sección de intestino.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

III.- PATOGÉNESIS DE *Escherichia coli* INOCULADA EN EL APÉNDICE CECAL

6.5 Bacterias lavadas

Los principales datos obtenidos de inocular la cepa EDL933 previamente lavada se aprecian en el cuadro 12.

CUADRO N° 12
PRINCIPALES RESULTADOS DE LOS CONEJOS INOCULADOS CON BACTERIAS LAVADAS

INÓCULO	SOBREVIDA (días) *	RESULTADO	ANEMIA	UREA/ CREATININA mg/dl
EDL933 LAVADA	21	diarrea (1-3 días)	leve (14 días)	29.6 /0.8
EDL933 LAVADA	25	diarrea (1-4 días)	leve (14 días)	33/0.9
EDL933 LAVADA	15	diarrea (2 y 12 días)	leve (14 días)	22/0.7
EDL933 CULTIVO	6	VT	severa	104/2.9
K12 LAVADA	25	SCPA	NO	35/0.4

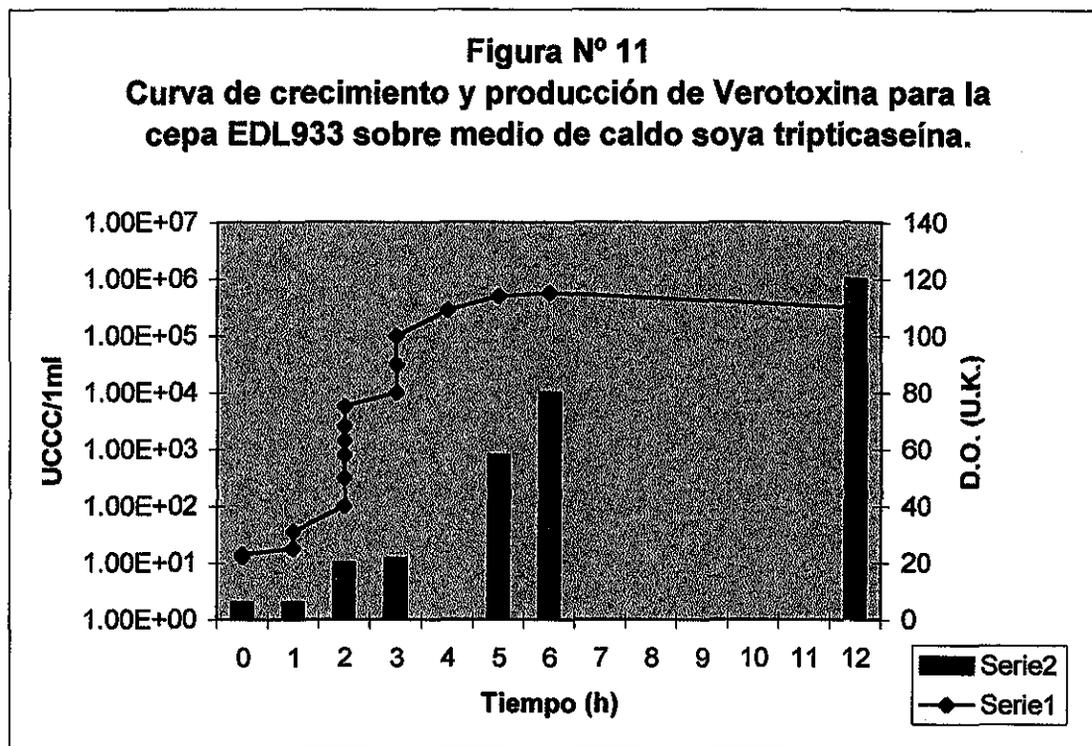
*Se realizó la eutanasia al tiempo indicado, excepto en el caso del cultivo de la cepa EDL933, el cual murió a los 6 días post-inoculación.

Todos los animales presentaron en los primeros 3-4 días manchas de heces en la región perianal (aspecto diarreico) después ya no se apreciaron. A los 12-14 días se identificó anemia leve, sin aumento de los valores de urea y creatinina séricas; a los 20 días se sacrificaron presentando un cuadro diarreico leve, sin anemia, pero con hemoglobinuria leve. No se encontró hipertermia en ninguno de los animales de este grupo.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

6.6 Fase de crecimiento bacteriano

La figura 11 muestra la curva de crecimiento de la cepa EDL933 sobre CST, así mismo se muestran las concentraciones de toxina encontrada en las diferentes fases de crecimiento.



Serie 1. - Curva de crecimiento bacteriano

Serie 2. - Concentración de verotoxina en el sobrenadante expresado en Unidades Citotóxicas para Cultivo Celular (UCCC) por cada ml de sobrenadante.

En los experimentos en los que se empleó el filtrado el cultivo bacteriano crecido a diferentes tiempos, se obtuvieron los resultados de urea y creatinina séricas que se observan en el cuadro 13 y el resumen de los principales hallazgos clínicos y patológicos se presentan en el cuadro 14.

ESTO CON
FALLA DE ORIGEN

CUADRO 13
UREMIA Y CREATINEMIA EN LOS CONEJOS INOCULADOS CON
FILTRADOS DE CULTIVOS DE LA CEPA EDL933 A DIFERENTES FASES DE
CRECIMIENTO

INOCULO	2 días	3 días	4 días	16 días	23 días
Filtrado * 1h	NR	22/1.2	26/1.0	20/1.0	22/1.1
Filtrado 6h	NR	33/0.9	NR	33.7/0.9	RIP
Filtrado 6h	NR	NR	45.8/0.8**	44.1/0.7**	25.7/0.9**
Filtrado 18h (1 ml+)	NR	NR	77.4/0.9**	NR	52.4/0.6 ***
Filtrado 18h (0.5ml+)	69.3/1.1 **	NR	NR	NR	46.4/0.7 **
Filtrado 18 h (0.6ml+)	73.9/1 **	NR	NR	NR	60.2/0.8 **
Filtrado 18h (0.8 l+)	NR	NR	129.3/1.7**	NR	40.2/1.2 (48días)
Filtrado 48h	NR	78/1.1**	NR	NR	30.6/1.2 (46)
Filtrado 48h	196/3.5**	NR	NR	37/0.7	RIP
Filtrado 72h	RIP				
Filtrado 72h	RIP				
Cultivo EDL933 18h	NR	215.6/2.4 **	RIP		
Filtrado K12 24h	32/1.0	29/0.9	24/0.8	22/0.8	23/0.9
Filtrado K12 72h	33/1.2	35/1.1	34/1.0	28/1.0	RIP
Cultivo K12	NR	67/0.8	56/0.7	55/0.8	48/0.7

** Presentaron anemia leve ***.- Presentó anemia severa

* El filtrado usado se obtuvo de la cepa EDL933 sobre CST a los tiempos indicados de incubación (h)

NR.- No probado RIP.- Muerte

+ Indica la cantidad de filtrado inoculada, en todos los demás casos se utilizó 1 ml de inóculo.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Cuadro 14

**PRINCIPALES DATOS ENCONTRADOS EN LOS CONEJOS INOCULADOS
CON FILTRADOS DE CULTIVOS DE LA CEPA EDL933 A DIFERENTES FASES
DE CRECIMIENTO BACTERIANO**

INOCULO *	SOBREVIDA (días)	RESULTADO	UREMIA
Filtrado, 1h	25	SCPA	NO
Filtrado, 6h	21	Enteritis	NO
Filtrado, 6h	25	Enteritis	NO
Filtrado, 18h	27	SCPA	SI (4° día)
Filtrado 18h (0.5ml**)	25	SCPA	NO
Filtrado 18 h (0.6ml)	25	SCPA	SI (1° día)
Filtrado 18h (0.8 ml)	48	SCPA	SI (4° día)
Filtrado, 48h	46	SCPA, Absceso	SI (3° día)
Filtrado, 48h	22	SCPA	SI (2° días)
Filtrado, 72h	2	Peritonitis CID severa	NP
Filtrado, 72h	1	Efecto VT, CID	NP
Cultivo completo EDL933 18h	4	Efecto VT	SI (3° día)
Filtrado K12, 24h	25	SCPA	No
Filtrado K12, 72h	20	Decaído	No
Cultivo completo K12, 18h	25	SCPA	No

* El filtrado usado se obtuvo de la cepa EDL933 sobre CST a los tiempos indicados de incubación (h)

NP.- No probado

** Indica la cantidad de filtrado inoculada, en todos los demás casos se utilizó 1 ml de inóculo.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

6.7 Sonicado de *E. coli* EDL933

Las determinaciones practicadas a los diversos sonicados obtenidos se muestran en el cuadro N° 15.

Los resultados obtenidos de la inoculación de los sonicados en el apéndice cecal de los conejos se presentan en el cuadro 16.

CUADRO 15
CARACTERÍSTICAS DE LOS SOBRENADANTES OBTENIDOS DE LOS
SONICADOS DEL CULTIVO DE LA CEPA de *Escherichia coli* EDL933

Inóculo	Prueba de esterilidad	UCTCC 50% / 100ul	Proteína en el sobrenadante (mg/ml) ***
I Cultivo completo * 3 ciclos	1.7×10^8 ufc/ml	10^5	22.7
II Cultivo completo 5 ciclos	N.D. **	10^6	34.3
III Filtrado de 3 ciclos	N.D.	10^5	25.0
IV Filtrado de 5 ciclos	N.D.	10^6	28.7
V Filtrado sin sonicar	N.D.	10^4	19.0
VI cepa K12	N.D.	Negativo	21.2

- Se utilizó un cultivo de la cepa EDL933 conteniendo 3.5×10^8 ufc / ml
- UCTCC.- Unidades citotóxicas en cultivo celular
- ** N.D. No se obtuvo desarrollo de colonias sobre AST
- *** Mediante la técnica de Bradford

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CUADRO 16
RESUMEN DE LOS HALLAZGOS EN LOS CONEJOS INOCULADOS CON LOS
FILTRADOS O LOS SONICADOS DE LA CEPA DE *Escherichia coli* O157:H7

INOCULO	SOBREVIDA (días)	SIGNOS CLÍNICOS	LESIONES	Urea/creat**	
				3 días	5 días
I	9	Decaído	VT	62/1.9	66/1.9
I	15	Diarrea	VT	85/2.2	
II	15	Decaído	SCPA	83/2.0	65/0.7
II	15	Decaído	SCPA	78/1.6	60/0.9
III	15	Decaído	SCPA	80/1	139/1.1
III	15	No se observaron	SCPA	68/1.5	93/1.9
IV	15	No se observaron	SCPA	76/1.9	70/0.7
IV	20	No se observaron	SCPA	98/2.2	85/2.6
V	20	Diarrea	SCPA	87/1.9	75/1.8
V	20	Diarrea	SCPA	65/1.4	56/1.0
V	21	Diarrea	Anemia leve	73/1.6	
VI	21	No presentó	SCPA	28/0.7	

VT.- cuando los animales presentaron las lesiones y signos como los previamente descritos para el modelo.

** Indica los valores obtenidos de urea y creatinina (mg/dl) obtenidos a los 3 y 7 días post-inoculación. Valores normales:

SCPA.- Sin cambios patológicos aparentes.

Se inoculó 1 ml del filtrado o del sonicado obtenidos

Se utilizaron dos métodos de sonicación, puesto que el de tres ciclos sólo produjo el 50% de la lisis bacteriana, como lo demostraron los cultivos realizados con él. Los animales a los que se les administraron estos inóculos mostraron lesiones del SUH pero en mayor tiempo, debido a contener menos bacterias viables en el inóculo.

También se observó que el sonicado aumentó el título de toxina en una dilución decimal lo que es comprensible considerando que la toxina se produce desde la fase de crecimiento logarítmico pero se acumula en el

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

espacio periplásmico (Karmali y col 1994). El sonicado a 100% de eficiencia mostró un comportamiento levemente más drástico que el anteriormente referido, pero no fue concluyente.

6.9 Inoculación de las toxinas semipurificadas STx de *E. coli* EDL93

-Semipurificación de la toxina

Al emplear el método de ultrafiltración para separar las toxinas del cultivo de la cepa de *E. coli* EDL933 se obtuvieron las cuatro fracciones y las características de cada una mostradas en el cuadro 17.

**CUADRO N° 17
RESULTADOS DEL FRACCIONAMIENTO DEL SOBRENADANTE DE LA CEPA
EDL933 MEDIANTE ULTRAFILTRACIÓN**

Fracción	Conc. proteínas mg/dl	Efecto sobre cél. Vero UCCC/50ul	Factor de Concen tración *	Actividad específica (UCCC / mg) **
Directo	390	10^4	1X	0.51×10^0
> 100	63	103	10X	0.31×10^5
50-100	606	10^7	20x	3.3×10^7
30-50	5.4	10^2	1X	0.37×10^5
<30	1.8	Neg	10x	Neg

*El factor de concentración expresa la concentración final después de reducir el volumen por este factor

** Calculada en referencia a la concentración de proteínas para cada fracción
UCCC Unidades citotóxicas para el cultivo celular

A todas las fracciones obtenidas de la cepa EDL933, se les realizó la prueba de determinación de endotoxina mediante el ensayo de Limulus (Sigma Ch.Co) y la determinación de proteínas mediante la técnica de Bradford. Los resultados de estas determinaciones para los productos empleados, son presentados en el cuadro 18.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CUADRO 18
CARACTERÍSTICAS DE LOS DIVERSAS FRACCIONES
EMPLEADAS EN EL TRABAJO

FRACCIÓN EMPLEADA	CONCENTRACION DE ENDOTOXINA *	CONCENTRACION DE PROTEÍNA **** (ug/100 ul)	CONCENTRACION DE TOXINA VT (UCCC / 50 ul) **	Actividad Específica UCCC 50% /mg
Toxina purificada por ultrafiltración (fracción 50-100)	3 pg /ml	606.0	10 ⁷	3.3 x 10 ⁷
Sobrenadante del cultivo de 18h de la cepa EDL933	7.3 ug/ml	390.2	10 ⁴	5.1 x 10 ⁵
Sonicado de la cepa EDL933 a 18h de incubación	340 ug/ml	909.1	10 ⁶	2.2 x 10 ⁶
LPS de la cepa O157 (Eslava)	1.7 mg/ml	20	10	5 x 10 ⁻¹
LPS de <i>E. coli</i> cepa O55B5 (Sigma)	4,000 U.E. / ml ***	12	Negativo	Negativo

- * Determinada mediante la prueba de Limulus (Sigma)
- ** Determinado mediante cultivo de células Vero
- *** Concentración referida por el fabricante.
- **** Se utilizó el método de Bradford

-Inoculación de los conejos en el AC

Los resultados mas sobresalientes al inocular la toxina, el LPS o las mezclas de ambos, se muestran en el cuadro 19.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CUADRO 19
RESULTADOS DE LA INOCULACIÓN EN EL APÉNDICE CECAL DEL CONEJO DE
LPS Y TOXINA OBTENIDOS DE LA CEPA DE *Escherichia coli* O157:H7.

INOCULO	SOBREVIDA	SIGNOS	LESIONES	(dias) Urea/creat	Hemograma
Cultivo completo	6 dias	Vt	Vt	(5) 180/3.0	anemia severa
LPS	15 dias	decaido x 48h	Neumonía leve focal hemorragica	(3) 70/0.7 (5) 40/0.9 (7) 20.5/1.3	Leucocitosis
LPS	2 dias	neumonía, anorexia	neumonía hemorragica difusa	(2) 28.3/1.2	Leucocitosis
LPS	15 dias	s/signos	APC , contenido caseoso blanquecino	(3)60/1.0 (5) 33/0.9 (7) 30/1.0	-anemia leve leucocitosis
LPS	18 dias	S/signos	APC , contenido caseoso blanquecino	(3) 38/1.0 (5) 22/1.1 (9) 24/0.9	-leucocitosis leve
50-100	10 dias	S/signos	APC contenido leve caseoso	(3) 67/1.2 (5) 63/0.8 (7) 42.8/0.7	anemia leve anemia leve
50-100	15 dias	decaido 48 h	atrofia APC	(3) 52/1.2 (5) 48/1.2 (7) 36/1.0	
50-100	12 dias	s/signos	leve contenido blanquecino	(3) 69/1.4 (5) 60/1.5 (7) 38/1.2	anemia leve
LPS + 50-100	9 DIAS	VT	VT	(3) 60/1.6 (5) 74/ 1.9 (7) 118/3.0 (9) 125/2.9	Anemia leve
LPS + 50-100	8 dias	VT	VT	(3)65 /1.5 (5) 72/ 1.6 (7) 89/ 2.3	Anemia moderada
LPS + 50-100	9 dias	VT	VT	(3) 67/ 1.4 (5) 99/ 2.8 (7) 97/ 2.9	Anemia moderada
LPS + 50-100	10 dias	VT	VT	(3)84/ 2.5 (5) 80 /2.7 (7)90/3.7 (9) 110/ 3.8	Anemia leve

LPS.- Lipopolisacárido purificado

VT.- Efecto de Verotoxina

50-100.- Fracción obtenida por ultrafiltración que contiene la actividad citotóxica

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

6.10 Ubicación de la toxina

Los resultados para la evaluación del receptor para la toxina en tejidos (AC y riñón) se muestran en el cuadro 20

CUADRO 20
LOCALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES PARA LAS VEROTOXINAS I Y II SOBRE EL APÉNDICE CECAL Y EL RIÑÓN DE LOS CONEJOS INOCULADOS.

TRATAMIENTO	APENDICE CECAL *	RINON *
SANO	Punta de las vellosidades lanceoladas	No detectado
CST	Punta de las Vellosidades lanceoladas	No detectado
K12	Punta de vellosidad Mononucleares	No detectado
EDL933	Punta de vellosidad Mononucleares	Macrovasculatura
TOXINA SLTs	Punta de vellosidad	No detectado
LPS	Punta de vellosidad Mononucleares Endotelios	Macrovasculatura
LPS + SLTs	Punta de vellosidad Mononucleares Endotelios	Macrovasculatura microvasculatura

Tratamiento .- referido a la administración en el apéndice cecal del producto indicado mediante la técnica quirúrgica descrita.

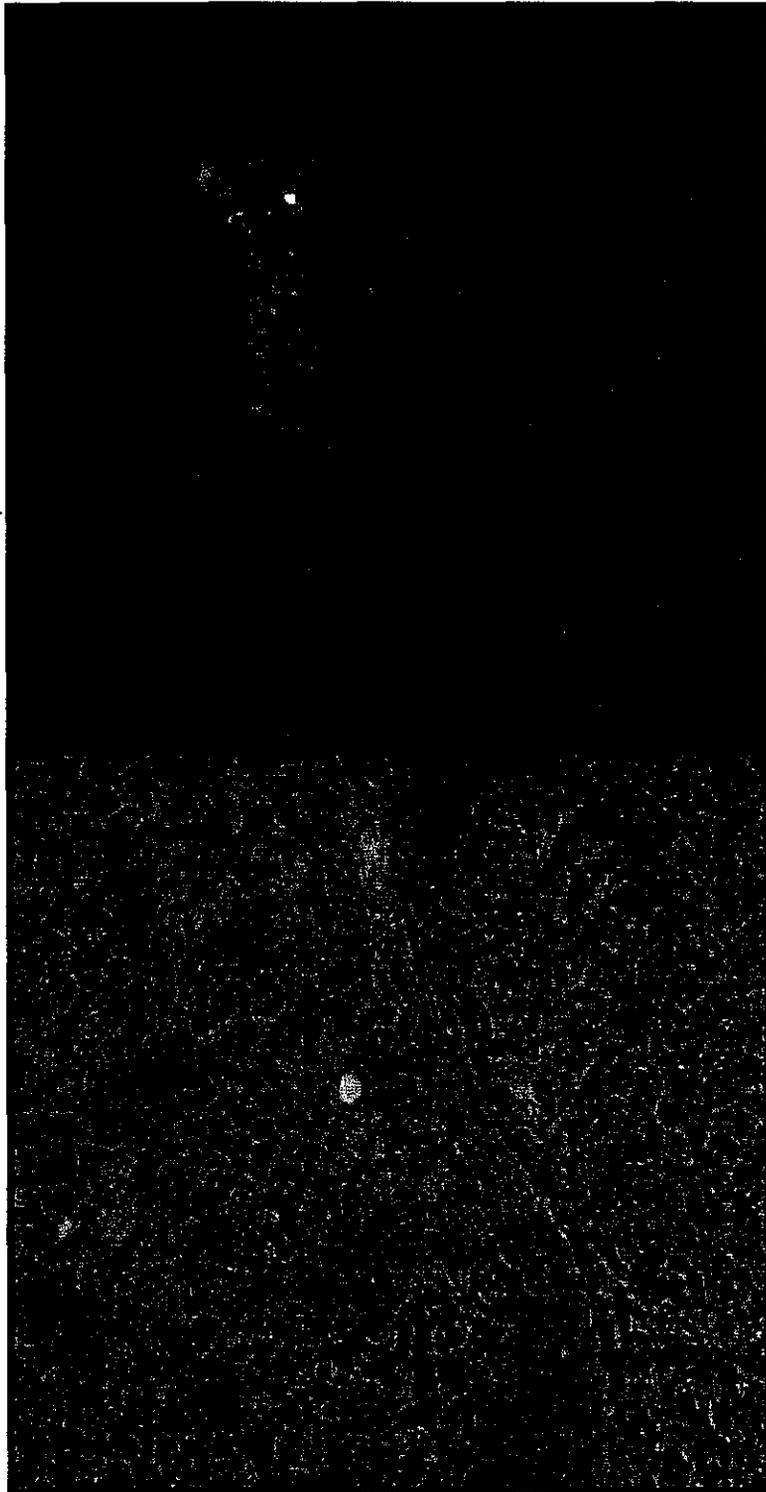
* Localización de los receptores mediante fluorescencia

En el cuadro 20 se mencionan a las vellosidades lanceoladas como las del domo de la cripta y a las células mononucleares que morfológicamente coinciden con linfocitos. Así mismo la macrovasculatura se refiere a grandes vasos sanguíneos localizados a nivel de la interfase corteza médula y a la microvasculatura, principalmente la correspondiente al glomérulo.

En ninguno de los cortes examinados se pudo detectar la presencia de toxinas

FIGURA N° 12

INMUNOFLUORESCENCIA CONTRA EL RECEPTOR DE LAS TOXINAS ST_x EN EL APÉNDICECECAL DE LOS CONEJOS INOCULADOS CON LPS MAS TOXINA



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 13.- Apéndice cecal del conejo inoculado con la cepa EDL933 , receptor de las toxinas ST_x en linfocitos

La distribución de los receptores, presumiblemente Gb3, fue observada en las células del epitelio linfoide (cripta) del apéndice cecal, pero únicamente en la punta de ésta. Así mismo, se observaron receptores asociados al glicocalix, inmediatamente por encima de estas células, esta distribución sugiere que el receptor aparece con la maduración de las células epiteliales y que los productos de degradación de estas células aún contienen receptores funcionales, capaces de ligar a la toxina. En el intestino delgado se identificaron enterocitos que presentan el receptor y que al igual que en el apéndice, sólo se observaron en las células más maduras de la punta de las vellosidades. En ambos casos no se observan receptores en las células endoteliales del órgano. El riñón no mostró marcaje de receptores a nivel medular, pero sí en los vasos sanguíneos a nivel cortico-medular.

DISCUSIÓN

I.- DESARROLLO DEL APÉNDICE CECAL DEL CONEJO

El apéndice cecal del conejo es un órgano eminentemente linfoide, que tienen cambios histológicos con un aumento y modificación de las poblaciones linfocitarias con la edad (Fig. 1) lo que sugiere que es un órgano linfoide secundario. Algunos autores proponen como función del AC la de ser un área de presentación de antígenos (Pospisil y col., 1996) y un sitio de absorción de nutrientes o de secreción de sustancias (Monroy, 1973, Cheeke, 1987). La mucosa presenta dos tipos de epitelio, uno cilíndrico bajo con presencia de células caliciformes en las proyecciones alargadas, "fungiformes", y otro cuboidal bajo, casi aplanado, a nivel de las proyecciones cortas, "lanceoladas", (figura 2b). El primero puede tener funciones digestivas de absorción y secreción, mientras que el segundo parece corresponder más a una función linfoide, con células aplanadas semejantes a las células "M", descritas para las placas de Peyer, como células captadoras y presentadoras de antígeno (Kato y col., 2000). Este hecho previamente ha sido descrito en los conejos por Lelouard y col. en el 2001, quienes además denominan a las proyecciones cortas (lanceoladas o piramidales) como "Domo" de linfocitos (o placas de Peyer), y a las proyecciones fungiformes como "Velloidades", haciendo una diferenciación clara en cuanto a sus funciones.

Los linfocitos presentan una distribución organizada en una, y posteriormente otra, áreas linfoides separadas por la muscular de la mucosa, conformación que es más aparente en el Domo; inmersos entre los linfocitos se encuentra una gran cantidad de macrófagos, situación que junto a la presencia de células planas en el epitelio, sugieren un área de intercambio de antígenos con la luz del órgano y presentación a las células linfoides de la mucosa y submucosa. (Tomohiro y col., 2000).

A pesar de que el peso del AC disminuye en proporción del peso corporal, pasando de un 6 a un 3 % del peso total, el dato puede no reflejar la disminución de su actividad, debido a que la raza de conejos trabajada tiene como finalidad zootécnica la de obtención de conejos para abasto (engorda), por lo que se considera mejor evaluar el desarrollo considerando su aspecto histológico. Además, se ha descrito que el AC aumenta de tamaño por la administración de una dieta rica en carbohidratos fácilmente fermentables, por lo que puede observarse más corto o más largo, dependiendo de la dieta, esta variable estuvo controlada en nuestro experimento, ya que todos los conejos utilizados en el presente estudio fueron mantenidos bajo la misma

dieta (Cheeke , 1987). Como se refiere en la literatura, el AC es mas largo (proporcionalmente al ciego) antes y al nacimiento que lo que corresponde al adulto (Keith, 1988)

Por las características histológicas y el desarrollo encontrado, además de estudios anteriores en los que se encontró una alta vascularidad linfática (Monroy, 1973, Cheeke 1987, Cripps y col., 2000), es muy probable que cumpla una función de órgano linfoide secundario, siendo una zona importante de captación y presentación de antígenos. La mucosa se modifica de un epitelio cuboidal alto en toda su extensión a un epitelio plano en las proyecciones lanceoladas del Domo, coincidiendo con la aparición y acumulo de linfocitos y macrófagos en la mucosa. Aunque también se ha propuesto que se comporte como un órgano linfoide primario (Roitt, 1989). Esta posibilidad puede ser elucidada a través de estudios de la variación de las subpoblaciones linfocitarias en la región.

Cuando se utilizó este sitio para la inoculación de cepas de *Escherichia coli* productoras de citotoxina, se observaron dos efectos predominantes: por un lado la lesión vascular produciendo hemorragias severas y edema regional y por otro la destrucción de los linfocitos locales y del bazo (Valdivia, 1997). El cuadro clínico consistió en anemia severa, insuficiencia renal aguda y colitis hemorrágica; signos que no habían sido observados previamente en otros modelos animales (Tzipori y col., 1986; Pai y col., 1986; Wodolkowski y col., 1990; García 1992). Por lo anterior, se puede suponer que las características linfoides del tejido permitieron la evolución de las lesiones y que puede existir algún papel de las células del sistema inmune, en el desarrollo de la patogénia de las cepas verocitotóxicas de *Escherichia coli* O157:H7.

II.- CARACTERIZACIÓN DEL MODELO ANIMAL EN CONEJOS

EDAD DE LOS ANIMALES

Los animales jóvenes, de menos de 66 días de edad, parecen refráctiles a las lesiones nerviosas, es probable que la expresión del receptor de la toxina (Gb3) esté controlada por la edad del animal, de tal forma que se observa un mayor efecto primero en el sistema gastrointestinal, después en el renal y finalmente en el nervioso, considerando la edad del animal. Estos resultados contrastan con los encontrados en ratones (Takaaki y col., 1998), en los que la lesión nerviosa aparece primero y con más severidad que la lesión renal; sin embargo, otros autores han señalado que no existen receptores Gb3 en el SNC de los ratones y ratas (Ren y col., 1999). Por otro lado, los resultados se

parecen a los observados en bovinos (Orden, 1998) en los que la susceptibilidad a cepas VTEC se incrementa con la edad y las lesiones nerviosas aparecen en los animales de mayor edad (animales de 30 días de edad). Las alteraciones encontradas previamente en los conejos por Ren y col. (1999) y por Zoja y col.(1992), fueron cambios microvasculares, edema y hemorragias focales en el SNC. Richardson y col. (1992), inocularon endovenosamente VT1 purificada en conejos de 2kg y comunicaron el desarrollo de diarrea sin sangre y una parálisis flácida debida a hemorragias y necrosis de neuronas en el SNC, además de edema y hemorragias en la mucosa y submucosa del ciego, así como, en menor grado, anemia y microangiopatía trombótica, con lesiones en el riñón. Estos resultados son prácticamente iguales a los del presente trabajo, al inocular en el apéndice cecal la bacteria, sugiriendo que para desarrollar el mismo tipo de lesiones y en la misma secuencia, con conejos de 2 kg o más grandes, la toxina tuvo que haber ingresado a sangre después de ser producida en el AC. Por otro lado, Richarson y col. (1992), sugieren que las lesiones encontradas en el ciego son atribuibles a la toxemia y el modelo sirvió adecuadamente para estudiar las lesiones vasculares, pero sin lograr replicar el SUH. También Fujii y col. (1992), encontraron que al inocular VT2 por vía endovenosa (5µg/kg) en conejos, se desarrolló diarrea hemorrágica , parálisis flácida y signos de lesión en el SNC. El mismo Fuji y col. en 2001 encontraron que la toxina Stx2 fue 44 veces más letal y de acción rápida sobre el SNC del conejo, que la Stx1, cuando se administran endovenosamente.

Contrastando con lo anterior, en el presente modelo inoculando la bacteria en el apéndice cecal, se desarrollaron casi todas las alteraciones del SUH, por lo que las diferencias en los resultados antes mencionados pueden ser debidas principalmente a la edad de los animales, al sitio de inoculación y al mantenimiento sostenido de la bacteria en el AC, aprovechando la propiedad que ésta tiene de unirse principalmente en intestino, ciego y colon sobre la mucosa con tejido linfoide asociado (Pai y col., 1986) . Las alteraciones pueden explicarse, en parte, por la presencia en el SNC del conejo del receptor Gb2 (Ren y col., 1999) o el Cerámico de Galabiosil (Zoja y col., 1992) al cual se pueden unir las VTs .

Cuando en el SUH se involucra el Sistema Nervioso Central, las lesiones endoteliales se convierten en factor crítico de la mortalidad (Ren y col., 1999), aparentemente las diferentes lesiones y susceptibilidad a la infección por STEC, están asociadas a la presencia del receptor Gb3, que es abundante en varios tejidos del humano, excepto en el SNC, así mismo el eritrocito contiene al receptor Gb3 y el Gb4. Pero también las Stx se unen

débilmente al receptor Gb2, el cual está presente en grandes cantidades en el SNC de los conejos; en contraparte en el ratón y la rata no existe Gb3 en SNC.

La lesión en el sistema nervioso central de las personas afectadas por SUH ha sido observada con poca frecuencia, este fenómeno puede deberse a la carencia del receptor Gb3 en el tejido nervioso de los niños (Ren 1999); en el modelo desarrollado, se observaron lesiones más aparentes y primarias del SNC en los animales de mayor edad, correlacionando este hecho con el desarrollo del AC. El efecto renal y en el SNC, también pudieran estar ligado a una población más completa y compleja de leucocitos en el AC, que pudiera estar funcionando como detonadora de la lesión en el SNC de los conejos.

Inexplicablemente dos de los conejos, de los 120 trabajados, lograron sobrevivir a la inoculación en el apéndice cecal con 10^8 bacterias. Este fenómeno ya había sido previamente observado en 4/12 conejos inoculados endovenosamente con $5\mu\text{g}/\text{Kg}$ de toxina, en 8 de los cuales se encontraron lesiones cerebrales consistentes en edema asociado a una lesión endotelial, a nivel de cerebelo y Vermix y 4 no desarrollaron las lesiones (Fujii y col., 1992). Desafortunadamente, los dos conejos sobrevivientes no fueron evaluados histológicamente; sin embargo, presentaron en los primeros 5 días alteraciones hematológicas y bioquímicas como el resto de los animales inoculados.

Debido a que los animales de 1.7 a 2.0 kg presentaron los daños previamente asociados a las cepas verocitotóxicas trabajadas, cuadro 3a y 3b, (Valdivia, 1995), se decidió seguir trabajando con estos pesos.

CONCENTRACION BACTERIANA

En el modelo de infección descrito previamente (Valdivia, 1995), se desarrollaron las lesiones y se indujo la muerte de los animales en un período de 5 a 7 días. Los resultados mostrados en el cuadro 9, demuestran que empleando una dosis de 1.6×10^5 UFC/ml se logró la sobrevivencia de los animales, provocándoles sólo signos clínicos pasajeros los cuales consistieron en diarrea moderada a los 3 días. Lo anterior sugiere que la lesión fue inducida por la toxina en el intestino delgado y/o grueso, se aumentó la urea y creatinina a niveles de 70 mg/dl y 1.9 mg/dl respectivamente y por un lapso no mayor a 7 días, datos que correlacionaron con el daño al riñón y la insuficiencia renal pasajera esperada, pero sin llegar a observar lesiones en el sistema nervioso central como las reportadas con dosis más altas. Los datos mostrados en el Cuadro 9 indican que se produjeron lesiones e insuficiencias en los animales; sin embargo, al ser más leves e incompletas que las reportadas previamente (Valdivia, 1995), no condujeron a la muerte, y se pudo establecer un modelo de infección crónica. La dosis infectiva reportada

para la infección natural de la colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico (SUH) se ha establecido en sólo 10 bacterias de las cepas citotóxicas administradas por vía oral (Karmali. y col., 1994), aunque otros autores reportan de 10 a 100 bacterias en promedio (Chart, 2000). En ratones, la LD₅₀ se ha establecido en 10 bacterias administradas oralmente (Melton-Celsa, 1997); sin embargo, trabajos en los que se emplearon lechones se requirieron 10¹⁰ UFC para desarrollar las lesiones (Karmali y col., 1994) y en conejos de 3 días de edad se requirieron 10⁸ bacterias (Pai y col., 1986). En el presente trabajo, la dosis mínima para lograr las lesiones completas fue mayor que en la infección natural en humanos, esto puede ser debido a que los mecanismos de inmunidad innata sean más eficientes en el apéndice cecal que en el intestino grueso, dadas sus características de órgano linfoide (Valdivia y col. 1997; Monroy, 1993) o a que el modelo permite el efecto local de los fenómenos celulares inflamatorios, más eficientes en éstas condiciones. En este mismo punto, Melton y col. (1997), postulan que una diferencia en la virulencia de las cepas observadas en los diversos modelos animales, se puede deber a una diferente producción de la toxina en el microambiente tisular o bien requerirse un período de adaptación al microambiente para iniciar la síntesis de toxina (Takaaki y col., 1998). Otra probable explicación es la disminución en virulencia que tienen las cepas de *Escherichia coli* que son mantenidas en el laboratorio por resiembras continuas (Ebel y col., 1996; Enami y col 1999); en cualquier caso, las lesiones desarrolladas en este modelo de infección crónica, permitieron demostrar que la toxina se produjo en el AC, se absorbió por vía sanguínea y pudo tener efecto en el intestino, riñón y eritrocitos, pero permitió la recuperación de los conejos. En este contexto es importante considerar algunas observaciones epidemiológicas respectivas a la infección por estas cepas en los niños y ancianos: el 5 al 15% de los enfermos de colitis hemorrágica desarrollan SUH y de éstos sólo un porcentaje de 5 al 30% mueren, por lo que la virulencia de la bacteria en humanos es baja o bien que la severidad del cuadro clínico es leve en las personas afectadas (Chart, 2000; Karmali, 1994).

Una concentración de 10⁵ bacterias viables fue la dosis mínima capaz de causar las lesiones y alteraciones observadas en el modelo, aunque estos animales mostraron al inicio un cuadro diarreico e insuficiencia renal leve, las alteraciones causadas no llevaron a la muerte de los animales. Este mismo inóculo se utilizó en otros experimentos que demostraron que el daño al sistema inmune fue tanto a nivel celular como humoral y se repitieron los resultados obtenidos con esta concentración bacteriana inoculada en el AC (Pérez, 2002). La explicación probable al fenómeno es de que con ese número de bacterias, los mecanismos de respuesta inespecíficos (fagocitosis

primordialmente) son capaces de eliminar a las bacterias tanto en la luz del AC como en el tejido; así mismo, en los animales que sobrevivieron de esta manera, se detectaron bajos títulos de anticuerpos mediante la prueba de ELISA (datos no mostrados).

En infecciones en el humano, provocadas por las VTEC, la dosis mínima infectiva es de 10 a 100 bacterias viables (Chart, 2000). La dosis infectiva que en este modelo causó las lesiones relacionadas a la colitis hemorrágica fue mayor que lo comunicado para humanos; sin embargo, se logró desarrollar signología en el 98% de los animales inoculados, con un período de incubación de 3 a 4 días, presentándose diarrea con sangre en todos los casos y casi el 100% de las alteraciones asociadas al SUH, uremia, anemia y muerte. Estos resultados claramente contrastan con lo observado en la naturaleza para las personas (Chart, 2000) en las que se observa una signología inicial de diarrea sin sangre en el 90% de los casos analizados, que a las 48h se vuelve con sangre en el 70%, con un período de incubación de 1 a 8 días pero solo en un 5% de los afectados desarrollan SUH y es fatal en el 5% de estos casos. Debido a que se logró reproducir la mayoría de las alteraciones observadas en el SUH, pero con una presentación más severa con la cepa EDL933 aislada de humanos, se propone que el modelo en conejos puede ser empleado con seguridad para estudiar el SUH y los mecanismos de control, prevención y tratamiento del mismo.

FASE DE CRECIMIENTO BACTERIANO Y FILTRADOS

Como se puede apreciar en los cuadros 14 y 16, los filtrados obtenidos de fases tempranas de crecimiento bacteriano no produjeron alteraciones asociadas al SUH; sin embargo con filtrados provenientes de cultivos bacterianos obtenidos a las 18h o más de crecimiento, se pudo observar una uremia leve en los primeros 4 días la cual desapareció con el tiempo. Con los filtrados de 72 horas de crecimiento bacteriano, se observó un efecto de coagulación intravascular diseminada, probablemente debido a la cantidad alta de endotoxina presente, en uno de estos animales se identificó un efecto de verotoxinas al observar las lesiones a la necropsia.

El resto de los animales inoculados con filtrados, no mostraron comportamientos atribuibles al tratamiento, el filtrado sólo determinó efectos renales en las primeras 48-72h de inoculación, después los animales se recuperaron, lo que sugiere que la toxina presente es suficiente para causar daño; sin embargo, se requiere de la producción continua de la toxina para reproducir el cuadro completo.

Las alteraciones antes mencionadas no se encontraron en los controles inoculados con filtrados provenientes de la cepa K12 .

Se requirió del cultivo completo para el efecto total, la absorción de la toxina a nivel del apéndice cecal fue muy baja con los filtrados por lo que aparentemente se requiere la presencia de la bacteria viable para aumentar la absorción ó para mantener la producción de la toxina; lo que implica que es necesario que la bacteria se adhiera a la superficie, penetre a la submucosa y en este lugar comience a producir la toxina ó que se inicien los mecanismos de inflamación mediados por la toxina STx, la endotoxina o alguna otra sustancia producida por la bacteria , como las lipoproteínas (Zhang y col., 1998) o los factores de colonización asociados al LEE presente en esta cepa (Puente and Finlay, 2001, Dahan y col., 2002). La alteración de las uniones estrechas del enterocito conduce a alterar las propiedades de barrera de la mucosa y este hecho es importante en la patogénesis de la diarrea causada por las cepas EPEC (Elliott y col., 2002) la alteración es provocada por productos codificados en el locus LEE, por ejemplo EspF, dichos genes son acarreados por las cepas EHEC.

Al colocar la toxina en la luz intestinal, ésta fue pasada al torrente circulatorio posiblemente por un mecanismo de translocación a través de las células epiteliales del intestino, sin destruirlas ni alterar las uniones intercelulares, pero por mecanismos que son diferentes para ambas toxinas (Hurley y col., 1999). Dicho mecanismo pudiera iniciarse por la presencia de receptores para las toxinas Stx sobre estas células; en el presente trabajo se demuestra que los receptores Gb3 (o algún otro) se encuentran localizados en la punta de la vellosidad lanceolada (Domo), en células con características no absorptivas, sino más bien, de presentación antigénica. Otro mecanismo involucrado en el paso de las toxinas STx a través de las células epiteliales puede ser el aumento asociado a la trans-migración de los polimorfonucleares (PMN) desde el lado basal al apical de las células epiteliales aumentando el movimiento de las toxinas en sentido contrario, como lo demostraron Hurley y col. (2001). En el presente trabajo se demuestra una gran movilización de PMN hacia la luz del AC que pudiera estar mediado por la secreción de Interleucina 8 (IL-8) por las células epiteliales (Hurley y col. 2001, Dahan y col., 2002). En apoyo a esta consideración, los trabajos de Dahan y col. (2002), demuestran que las cepas EHEC interactúan con las células epiteliales del intestino y por vía de la inducción de las proteín-cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y del factor de transcripción NF- B, inducen la secreción de IL-8 por mecanismos diferentes al efecto de las VTs, proponiendo que las proteínas de secreción asociadas al LEE y el LPS pudieran ser responsables del efecto.

UBICACIÓN DE LA BACTERIA

La bacteria se unió a las células epiteliales del Domo, cerca de las criptas, dado que la cepa EDL933 contienen los genes EAF, esta unión se establece por la intimina, parte de la membrana externa de la cepa EDL933 y por Tir, anclada a la membrana celular epitelial, secretada y translocada por la propia *E.coli* (Puente and Finlay, 2001). La unión genera la lesión tipo Eaf, pero ésta no se puede evaluar por la microscopia óptica empleada en el presente trabajo. Así mismo, induce una serie de cambios como el rearrreglo de la actina y la consiguiente modificación de las microvellosidades con la producción de la lesión en pedestal (Elliott y col., 2002). Sjogren y col.(1994), encontraron que al comparar una cepa RDEC (enteroadherente) de *E.coli* con una cepa isogénica de ella, que contenía el genotipo de la toxina SLT-1, la última cepa fue mucho mas virulenta en el modelo en conejos que la cepa que era enteroadherente. Las alteraciones consistieron en cambios vasculares y edema. Las anteriores alteraciones refuerzan el papel de la toxina en la patogénesis, sin embargo indican que otros factores interactúan para lograr los efectos finales.

Si bien es cierto que la literatura refiere que las cepas STEC no son invasivas y sólo se restringen a la luz intestinal (Sjogreen y col., 1994, Hurley y col 1999) aún no queda claro cómo las toxinas penetran y se diseminan para llegar hasta los sitios blanco distantes: intestino, riñón y SNC. En el modelo desarrollado, es claro que se trata de una invasión local, sin diseminación, como lo descrito para *Shigella dysenteriae* (Sansonetti y col., 2001). La migración de las bacterias hacia la mucosa y submucosa puede llevarse a cabo de varias maneras: pasando por migración transepitelial, como se ha descrito para *Salmonella* a través de las células "M" o entre las uniones intercelulares, condicionado por su apertura a la migración de PMN (Abigail y col. 1994, Maroeska y col., 2001) o por la destrucción de la barrera intestinal debida a la apertura de las uniones estrechas intercelulares (Elliott y col., 2002). Otra probable explicación, puede ser el mecanismo observado en otras bacterias de aumento de su internalización vía el desarreglo en la actina polimerizada (Wells y col., 1998, Gagandeep y col. 2001), que puede ser producido por el efecto Eaf presente en el fenotipo de las bacterias utilizadas (Enami y col., 1999, Puente y col., 2001). Se ha estudiado como *E.coli* es capaz de inducir apoptosis en células epiteliales en cultivo, independientemente de la producción de toxina, lo que ofrece una ventaja a las bacterias que son capaces de unirse a las células, dado que aumentan la expresión de su propio receptor (Foster y col., 2000). En refuerzo del anterior punto, se ha estudiado como las cepas O157:H7 inoculadas en monos *Macaca*, produjeron lesiones A/E, que correlacionaron con la gravedad de la diarrea (Gagandeep y col., 2001).

Por los resultados obtenidos durante el presente trabajo, usando diferentes concentraciones de las bacterias, cultivos lavados, sólo los filtrados del sobrenadante y la ubicación de la bacteria, parece ser que el efecto detonante de las lesiones requiere de la presencia de bacterias atravesando la mucosa. o interactuando estrechamente con ella.

La bacteria se asoció predominantemente a las células epiteliales bajas (aplanadas) localizadas en las proyecciones foliares de la mucosa, por lo que ellas presumiblemente deben tener los receptores específicos para la unión de la bacteria al epitelio; sin embargo, en los experimentos del presente trabajo, aparentemente estas células epiteliales no presentaron el receptor para las toxinas. Pai y col., en 1986, trabajando con conejos, encontraron que al administrar intragástricamente cepas O157:H7, las bacterias se unieron a intestino, ciego y colon, predominantemente sobre el epitelio que recubre al tejido linfoide asociado a mucosas, causando apoptosis en estos epitelios, pero sin encontrar bacterias en la submucosa. En los experimentos realizados en el presente trabajo, la asociación de las bacterias ocurrió a las células bajas del Domo, que en consecuencia deberían expresar receptores para las bacterias sobre su superficie y que pueden estar internalizándolas por translocación, en un mecanismo parecido al utilizado por *Yersinia spp.*, dichas células pueden corresponder con las células M del intestino, las cuales son muy abundantes y se encuentran en la vellosidad lanceolada o "Domo" (Lelourd y col., 2001).

A las 48 h, algunas bacterias aparecen dentro de macrófagos (mononucleares) y en los heterófilos (equivalentes al neutrófilo). El infiltrado inicial estuvo constituido por neutrófilos, así como de linfocitos, que aparecen asociados a los vasos linfáticos a las 48 h, éstos son más numerosos a las 72 h y tienden a mantenerse presentes hasta las 96 h; sin embargo, desde las 72 h se empieza a notar una disminución de los linfocitos en las áreas linfoides, con persistencia de macrófagos. Esta infiltración de neutrófilos al sitio de la lesión ha sido previamente documentada (Liu y col., 1999, Maroeska y col., 2001)

Uno de los primeros efectos observados fue el de diarrea, de cierta manera predecible, dado que existen receptores para la toxina en las células maduras del intestino delgado; sin embargo, es necesario explicar cómo la toxina logra llegar desde el AC hasta el intestino y afectar a los enterocitos. Una probable explicación radica en la diferencia en translocación que muestran la toxina Stx 1 y 2, mientras que la primera sólo puede atravesar en forma direccional (de la luz a la basal), la Stx2 puede hacerlo en ambas direcciones (Hurley y col., 1999) por lo que Stx2 puede llegar por vía circulatoria (Kita y col., 2000), atravesar en dirección basal – luminal y producir los efectos sobre las células maduras de la vellosidad, que son las que tienen un mayor poder absorptivo y con ello causar diarrea. El mecanismo

anteriormente propuesto puede funcionar para el epitelio del colon y ciego , aunque en este caso no se investigó la presencia de receptores Gb3 en estos tejidos.

PATOGÉNESIS DE *E. coli* EDL933 INOCULADA EN EL APÉNDICE CECAL

Como se aprecia en el cuadro 18, el método de ultrafiltración resultó muy eficiente, la actividad específica fue alta, además de contener menos endotoxina.

Este resultado es parecido al previamente descrito por Mulvey y col., (1998), quienes purificando la toxina por ultrafiltración obtienen una actividad específica de 6.9×10^7 y de 1.4×10^7 DCCC_{50%}/mg de proteína, para la SLTI y SLT II respectivamente, el resultado en el presente trabajo fue de 3.3×10^7 para ambas toxinas. Así mismo, para el resto de los productos utilizados en los experimentos (cuadro 19), se observó que la mayor actividad específica correspondió a la fracción 50-100, seguida por el sonicado y al final el sobrenadante del cultivo, por ello se puede concluir que la ultrafiltración provee un producto más concentrado en toxina. Al mismo tiempo las concentraciones de endotoxina fueron menores en la fracción ultrafiltrada, mayores en el sobrenadante y más altas aún en el sonicado, resultado esperado ya que la sonicación libera mas endotoxina y la ultrafiltración separó por peso molecular al LPS. Se logró una menor contaminación con endotoxina, 3pg/ml, en la fracción 50-100 obtenida por ultrafiltración, demostrando que el proceso empelado tuvo mejores resultados que los obtenidos por Mulvey y col., 1998 y sin emplear capatadores de endotoxina; posiblemente estos resultados fueron consecuencia de la sucesión de membranas y poros utilizados, contra el uso de una sola membrana.

Como se aprecia en el cuadro 19, el LPS fue capaz de producir alteraciones vasculares locales, se absorbió y causó alteraciones sistémicas indicando que el AC es un órgano de absorción y de reacción a la endotoxina. Estas alteraciones coinciden con los efectos previamente descritos para el LPS, sobre la movilización de leucocitos de la microvasculatura intestinal hacia el intersticio y la luz del órgano, fenómeno asociado a la expresión en la célula endotelial de moléculas de adhesión leucocitaria (E y P-selectinas ICAM-1, VCAM-1) en 3 a 5 horas (Panes y Granger, 1998); lo que explica la salida de PMN hacia la luz intestinal, observándose el fenómeno tanto con la cepa K12, no patógena, como con la cepa EDL933.

Ni el LPS, ni la toxina purificada, desarrollaron lesiones compatibles con SUH. Localmente el LPS indujo una respuesta inflamatoria muy severa pues se encontraron abundantes neutrófilos, abundante líquido, una leve

dilatación de linfáticos y trombosis con CID en otros órganos. A diferencia de la inoculación de verotoxina purificada que produjo sólo una leve hemorragia en el apéndice cecal. Asimismo, el efecto observado fue independiente del tipo de serogrupo empleado para obtener la endotoxina (cuadro 18) por lo que este efecto puede no tener relación con la porción polisacárido del LPS.

Esta observación se refuerza por el hecho de que las infecciones por cepas EHEC pueden ser producidas por serogrupos diversos al O157 (Karmali y col., 1994), incluso se reporta que las cepas O157 pueden perder la reactividad del antígeno "O" por almacenaje, pero mantienen sus propiedades patógenas (Hara-Kudo, 2000).

En un modelo en ratón, Karpman y col. (1997), demostraron que al administrar intragástricamente cepas O157:H7 se desarrollan al mismo tiempo los signos sistémicos y neurológicos, mientras que al utilizar ratones que no responden al LPS, la enfermedad siguió un curso en fases, primero hubo signos sistémicos y después signos del sistema nervioso central, sugiriendo el papel que tienen el LPS y las toxinas en el desarrollo de la enfermedad. La lesión cerebral parece tener un componente previo de sobrerregulación de receptores para las toxinas STx a nivel del endotelio vascular, regulación asociada a mediadores (citocinas) liberados por efecto del LPS, como por ejemplo el TNF α que a su vez sobrexpresó el Gb3 en cultivos de células endoteliales de microvasculatura cerebral humana (Eisenhauer y col., 2001).

La diapedesis de neutrófilos implicó un daño posterior, relacionado a los propios polimorfonucleares (Panes, 1998). Este tipo de daño ha sido demostrado en una serie de modelos previos de daño intestinal, como el fenómeno de isquemia/reperfusión, el cual provoca un aumento de la permeabilidad a nivel de la microvasculatura, edema intersticial, fallas en la vaso-regulación, infiltrado de células inflamatorias y ulceración de las mucosas, lesión observada en el estómago de los conejos durante el presente trabajo. En el caso de las infecciones por EHEC, se demostró que la toxina Stx2 causó un retardo significativo en la apoptosis espontánea de los neutrófilos, su mayor supervivencia puede agravar el daño a tejidos mediado por los mismos (Liu y col., 1999).

La inducción del fago temperado codificante de las Stx, regula positivamente la producción y secreción de la toxina (Wagner y col., 1999); así mismo, se ha observado que el efecto fagocítico de los neutrófilos sobre la bacteria, induce la producción de toxina (Wagner y col., 2001). Una explicación del retardo en los efectos cuando se administraron las bacterias lavadas en el presente trabajo, puede encaminarse a que éstas primero deberán inducir el fenómeno de inflamación para la quimiotaxis de los neutrófilos al sitio de inoculación, generen la inducción de la toxina y el daño posterior. Sin

embargo existe un equilibrio entre las bacterias agresoras, el hospedador en defensa y el microambiente que puede desviar la progresión hacia la infección, por lo que el número de bacterias inoculadas en el modelo y la dosis mínima infectante pudieran estar relacionadas con esta capacidad.

En un trabajo realizado por Paton y col., (1998), observaron que los anticuerpos anti LPS (de cepas O157), bloquearon de manera específica la unión de la bacteria a células endoteliales, este efecto no estuvo relacionada a un efecto del LPS como adhesina, ni a un efecto bactericida o aglutinante del suero. La explicación de este fenómeno puede ser la expresión previa de receptores para la bacteria, inducidos por el LPS en una manera similar a lo observado para la regulación de estos receptores celulares por las interleucinas (Larsson y col., 2000). Por otro lado, se han reportado efectos de bloqueo del LPS, por lo que se puede impedir su acción en vivo; el receptor para el LPS (CD14) se localiza sobre algunas células (incluyendo ciertos tipos de células mononucleares) por lo que la presencia de LPS en tejidos, eventualmente podría bloquear o activar a dichas células. Por otro lado, la presencia de lactoferrina, que es un quelante de LPS (Larsson y col., 2000), puede eventualmente bloquear al LPS en la circulación o en la luz intestinal debido a la presencia de esta sustancia en secreciones (Baveye y col., 2000).

RECEPTORES PARA VT

A pesar de que la determinación de los receptores para las toxinas en el intestino delgado no era uno de los objetivos específicos del presente trabajo, estos receptores pudieron ser identificados en las células enterocíticas de la punta de las vellosidades en el intestino delgado, las cuales corresponden a células maduras. Estas observaciones pudieran explicar el efecto enterotóxico observado previamente en el ensayo de asa ligada en conejo (Puente y col., 2001), puesto que existen receptores en la luz, así mismo explica porque los animales muy pequeños son menos susceptibles a la enfermedad con manifestación de diarrea, lo que puede deberse a la inmadurez de las células epiteliales en el apéndice y en el resto del tracto gastrointestinal. Así mismo, se puede pensar que la mayor intensidad, así como la dinámica, de la presentación de receptores primero en el tracto intestinal, después en el renal y finalmente en el nervioso, es debida a la aparición de receptores GB3 primero en el gastrointestinal, después en el riñón y finalmente en el endotelio del sistema nervioso central, asociada a la maduración de las células y a la cinética de expresión del receptor Gb3 en estos órganos.

La inoculación intragástrica de ratones usando altas dosis (mas de 10^7 UFC/animal) establecen la infección por STEC, pero no logra desarrollar diarrea, a diferencia de los conejos, los cuales la desarrollan con dosis

menores (10^3 UFC/animal), colonizando y dañando primordialmente el intestino grueso (Michinaga y col., 2001), datos que sugieren la diferente distribución de los receptores para la toxina, condicionada por la especie animal y la edad.

Las observaciones hechas por Buret y col., (1998), sobre el efecto protector del Factor de Crecimiento Epidérmico en la colonización por cepas EPEC en conejos, pueden apoyar el hecho de que la falta de maduración celular no impide la lesión de borramiento y esfacelamiento de la microvellosidad (Eaf), ni la colonización de las cepas EPEC, condicionando la expresión de intimina y la secreción y translocación de Tir hacia las células epiteliales para permitir la adherencia y la colonización (Puente y col., 2001) fenómeno que se lleva a cabo principalmente en las células más inmaduras (las de las criptas). En un trabajo con ratones, Takaaki y col. (1998), observaron que la malnutrición proteica y calórica, provocaba falta de desarrollo en células intestinales y esto se correlacionó con una susceptibilidad aumentada a cepas EHEC. Estos dos experimentos apoyan el hecho de que en ratones y conejos las células intestinales inmaduras pueden ser más susceptibles a la colonización por cepas EHEC. En apoyo de los datos anteriores, en el presente trabajo se logró observar las cepas EDL933 (O157:H7) adheridas y colonizando las células de la cripta del Domo. Por lo que la diferencia en susceptibilidad condicionada por la edad en los conejos parece estar más relacionada a la expresión de los receptores para las STx (Gb3).

Devenis y col., (1997) demostraron que la unión de las VTs a células Vero, puede ser bloqueada por el tratamientos con formaldehído; así mismo, se ha sugerido la presencia de algún otro receptor de origen proteico, diferente al Gb3. De las células renales ensayadas en el trabajo, sólo las de origen porcino unieron VTs a su superficie.

En el presente trabajo se demostró que el tejido renal no expresa receptores para la toxina y sólo después del tratamiento con LPS se lograron demostrar receptores en la macrovasculatura, pero no fue posible hacerlo en la microvasculatura (glomérulo). Sin embargo, los estudios histopatológicos realizados en personas afectadas de SUH muestran que a nivel renal, la lesión principalmente se caracteriza por microangiopatía trombótica glomerular. En estudios realizados con células de los túbulos proximales renales expuestas a Stx-1 (Hughes y col., 1998), se encontró que las células fueron muy sensibles a la toxina, la IL-1 incremento la unión de la toxina, pero sin alterar los niveles totales o la expresión de receptores Gb3; el LPS y el butirato no afectan la unión, pero incrementan los efectos hacia las célula, los resultados sugieren la sensibilidad alta de las células del túbulo contorneado proximal a

la toxina; pero también sugieren la posibilidad de algunos otros factores del organismo que incrementan el efecto sobre las células (Hughes y col., 1998). Por otro lado Koshiy y col.,(1997), encontraron daño ultraestructural en la microvasculatura del tracto gastrointestinal, principalmente del ciego, mostrando mayor daño los capilares y las venulas que las arteriolas, lo que explicaría el desarrollo de diarrea hemorrágica en el SUH. Estos resultados sugieren fuertemente que la uremia y creatinemia encontradas, pueden ser debidas primordialmente a un problema de circulación en la nefrona, más que a un daño directo sobre las células de la misma; los efectos en la macrovasculatura, disminuirían el flujo hacia el glomérulo y desencadenaría la insuficiencia renal. Se ha encontrado que células endoteliales en cultivo celular (*in vitro*) expresan constitutivamente el receptor Gb3, a diferencia de los endotelios de la macrovasculatura, los cuales pueden ser inducidos por LPS o citocinas para expresar al receptor Gb3 (Jacewicz y col., 1999). Cuando se realizaron estudios empleando riñones de rata perfundidos y adicionados de Stx, se observó que la lesión provocada fue la proteinuria y daño a la región de los túbulos en la médula renal, sugiriendo un sinergismo entre la hipoxia medular local y los efectos toxicos directos sobre los túbulos ó endotelios (Shibolet y col., 1997). También se han realizado estudios que demuestran el efecto directo sobre células tubulares renales de las toxinas Stx, estos estudios se han hecho en cultivos de células renales de humanos y demostraron que las células de los túbulos contorneados proximales son altamente susceptibles a las Stx (Hughes y col., 1998),

El fenómeno de activación y aumento de lesiones por el LPS, había sido propuesto previamente por Karpman y col., (1997), al indicar que la interacción del LPS y la toxina SLT, fueron importantes para el desarrollo de la enfermedad.

Integrando las observaciones de lesiones, posición de la bacteria y presencia de los receptores para las toxinas, es posible proponer el siguiente mecanismo de infección en el modelo estudiado:

- 1.- La bacteria se adhiere a la mucosa de las vellosidades lanceoladas (Domo) del apéndice, los resultados demuestran que la adherencia se lleva a cabo en las células del Domo linfoide, en la base de la vellosidad foliar.
- 2.- La toxina presente en el cultivo, o producida "in situ" inicialmente, se une a los receptores GB3 de estas mismas células, provocando alteraciones que permiten que la bacteria sea translocada a la submucosa. Esta posibilidad es apoyada por el hecho de que al inocular bacterias lavadas, el efecto se retrasa en forma evidente.
- 3.- A las 48h post-inoculación, la bacteria se está replicando en la submucosa, es fagocitada en las áreas linfoides y también se observa libre en el estroma.

4.- La presencia de la bacteria y eventualmente de sus productos de degradación, incluyendo el LPS, inician el proceso inflamatorio supurativo en la región; la toxina liberada localmente y la absorbida de la luz del órgano, inician sus efectos en el tracto gastrointestinal, primordialmente a nivel de intestino delgado e intestino grueso, explicando la diarrea hemorrágica inicial (72 h) observada en los animales. En el conejo existen receptores para la toxina en las vellosidades intestinales, principalmente en las células más maduras.

5.- El LPS y la bacteria viable indujeron la expresión de receptores en la microvasculatura y macrovasculatura renales. Estos experimentos sugieren la participación importante de la endotoxina en la expresión de Gb3 (o algún otro receptor para la toxina), el efecto posterior de las toxinas sobre el riñón y explican el efecto marcado en la insuficiencia renal, como consecuencia de un fenómeno vascular que involucra ambas irrigaciones renales.

6.- El efecto sobre el SNC fue aparente en los últimos estadios de la enfermedad en los conejos de dos meses de edad, siendo el predominante en los animales más grandes, por ello es probable que los receptores en la vasculatura ó las neuronas del encéfalo se expresen por efecto del LPS en animales pequeños y en los animales mayores estén presentes previamente.

La cinética de expresión de la toxina durante la patogénesis y la forma en la que la toxina entra a la circulación son poco conocidas, aún no se conoce si la toxina viaja libre o en asociación con proteínas transportadoras (Chart, 2000); aunque Maroeska y col., (2001) demuestran el paso de VT a través de las células intestinales sin dañarlas y que la toxina viaja en sangre unida a los PMN. Existen pocos estudios de cómo las toxinas atraviesan el epitelio intestinal, sugiriéndose el mecanismo de translocación directa (Acheson y col., 1994; Jacewicz y col., 1999). En el presente trabajo, se observó que existen receptores para la toxina sobre ciertas células epiteliales en la mucosa del apéndice cecal y el intestino delgado, éstos pueden ser los responsables de la translocación de la toxina desde la luz, como lo sugiere el leve efecto producido al inocular los filtrados del crecimiento bacteriano; sin embargo, el efecto no fue característico de las VT. Por otro lado, cuando se inoculó la bacteria lavada, ésta no fue capaz de inducir lesiones severas, lo que sugiere que para iniciar el daño se requiere la presencia inicial de cierta cantidad de toxina o de otros productos extracelulares bacterianos en la luz intestinal, que actuarían en primera instancia, permitiendo la invasión de la bacteria, como lo demuestra la cronología de la infección en el apéndice cecal, o bien por el efecto primario de la toxina sobre los mecanismos de fagocitosis bacteriana dentro del AC. Estas inferencias se esquematizan en la figura 15.

Una lesión muy aparente, observada en el presente modelo y reportada previamente (Valdivia, 1995), fue la disminución de los linfocitos locales en la mucosa y submucosa del AC y en el bazo. Colateralmente al presente trabajo se investigó el efecto que sobre el sistema inmune tiene una infección subclínica con el mismo modelo en conejos y se encontró que la inoculación con la cepa 933 disminuyó significativamente la respuesta humoral (anticuerpos) hacia *Brucella abortus* muerta, a diferencia del efecto observado con la cepa K12 que no produce toxina (Pérez, 2002). Los resultados evaluados por 45 días, demostraron que la respuesta de anticuerpos aglutinantes en los animales inoculados previamente con la cepa 933, fue menor que la de otros grupos experimentales, estos datos sugieren marcadamente un efecto sistémico de la toxina sobre los linfocitos involucrados en la respuesta. Por otro lado, se produjo una disminución en la respuesta de los conejos hacia el BCG, el cual induce primordialmente una respuesta celular, midiéndola mediante intradermorreacción y comprobándola a través del análisis histológico, los resultados indicaron la ausencia de respuesta celular en el sitio de inoculación de la tuberculina, fenómeno observado sólo en los animales desafiados con la cepa EDL933, verocitotóxica (Pérez, 2002). De nueva cuenta, la explicación está dada por una reacción de supresión, por parte de la toxina, hacia alguno de los componentes participantes. En estos experimentos se descartó un efecto local (a nivel del apéndice cecal) debido a que la reacción fue normal en los conejos apendicectomizados, a pesar de que el órgano es una zona eminentemente linfoide (Archer y col. 1954; Valdivia, 1995; Huang y col., 1999). Así mismo, se descartó un efecto inmunosupresor asociado al LPS (Huang y col. 1999) debido a que el efecto no se presentó con la cepa de *E.coli* K12, que aunque es una cepa rugosa, contiene completa la fracción del lípido A, responsable del efecto endotóxico.

Previamente se ha reportado (Valdivia y col., 1997), un efecto de destrucción de linfocitos locales y en el bazo, proponiéndose que dicho efecto pudo ser mediado por una lisis de linfocitos portadores de receptores GB3 o bien por un fenómeno indirecto vía citocinas. En este sentido se ha demostrado que el receptor para las toxinas VT1 y VT2 (Gb3) se localiza en las células inmaduras de los centros germinales y en los linfocitos B activados, plasmocitos, productores de IgG e IgA principalmente (Menge y col., 1999). Dicho efecto justifica la ausencia de anticuerpos de la clase IgG contra la toxina, en individuos afectados por STEC (Sugatani y col., 2000)

Otros trabajos demuestran que el linfocito T, las células preT y las B maduras no tienen receptor para la toxina (Karmali y col., 1994; Sugatani y col., 2000). Así mismo se encontró que la toxina VT1 inhibe la proliferación

in vitro de los linfocitos T y B de bovino, mientras VT2 tiene el mismo efecto in vivo sobre los linfocitos de cerdos y los de terneros (Menge y col., 1999).

En un brote de SUH en Japón que afectó niños de menos de 10 años de edad, se observaron bajos niveles de anticuerpos contra la toxina VT2 y en otros países se observa que en los adultos con infecciones por VTs existen títulos de anticuerpos contra VT1 bajísimos. Se ha observado, en un modelo animal empleando cerdos gnotobiontes, que las toxinas inducen cerdos inmunocomprometidos (Sugatani y col., 2000).

Con los datos anteriormente presentados se deduce que la toxina con mayores efectos sobre las células del sistema inmune es la VT2 (Sugatani y col., 2000); sin embargo, se describen datos contradictorios en los efectos, los cuales dependen del sistema de prueba. Esta situación probablemente tenga una relación directa con la expresión del receptor Gb3 sobre las células, el cual es diferente según la especie animal usada en el ensayo (Ren y col., 1999). En el presente modelo fue posible demostrar el receptor para las toxinas en las células mononucleares que llegan a la luz y en las que se encuentran en las estructuras lanceoladas del AC (Cuadro 20, Fig.13).

Otra probable explicación a la disminución de linfocitos observada en este trabajo o al efecto inmunosupresor reportado por otros autores (Pérez, 2002) puede estar relacionada a una modulación alterada de la respuesta inmune vía interleucinas o vía citocinas. En el primer caso un buen candidato sería la IL-10 puesto que ésta se ha involucrado con los fenómenos de tolerancia intestinal y la regulación de los linfocitos Th3, los cuales a su vez abaten la respuesta de los Th1 y Th2. La IL-10 es producida por los macrófagos en respuesta a una estimulación directa por el LPS, el que proviene de una lisis de bacterias Gram negativas como *E.coli*.

Heumann y col., (2001), demostraron que los neutrófilos, de respuesta tisular local, al tratar de actuar sobre la bacteria, induce en ella el sistema de respuesta SOS, teniendo como consecuencia la inducción del fago codificante de la toxina y colateralmente el aumento de la lisis bacteriana provocada por el ciclo lítico del fago (Foster y col., 2000), lo que a su vez aumentaría la cantidad de Stx y de LPS en el medio. Así mismo, Thorpe y col. (1999), han implicado la secreción de IL-8 y de IL-1 por células del epitelio intestinal, después de que éstas han sido tratadas con verotoxinas, la toxina puede modular la producción de citocinas por las células enterocíticas; de tal forma, que la fracción B de la toxina Stx se une a las células epiteliales por el Gb3 (de la punta de la vellosidad foliar) y la fracción A por un mecanismo de regulación genética induce la síntesis de RNAm de la IL-8, por lo que los niveles de producción de la IL-8 aumentan, todo ello a expensas de cualquier daño sobre la célula, alteración que puede tener como objetivo aumentar la

respuesta inflamatoria local. Aunque inicialmente estas IL aumentarían la respuesta inflamatoria local con un aumento secundario de la secreción de IL-10 (Foss y col., 1999; Hessle y col., 2000).

Este mismo fenómeno puede ser provocado por la toxina Stx dentro del organismo, ya que como lo demostraron Foster y col., (2000), cuando la toxina se une a células mononucleares periféricas o bien a monocitos "in vitro", dichas células aumentaron la síntesis de IL1 y de TNF, que a su vez aumentan el daño mediado por las toxinas Stx. Curiosamente, los monocitos de humano expresan Gb3, pero son comparativamente más resistentes a las Stx (CP50% > 1.0 ug/ml) que las células Vero (CD50% 1.0 pg/ml), (Harlow y col., 1988).

Los efectos sobre el sistema inmune comentados anteriormente, son esquematizados en la figura 16.

A la fecha, no es posible diferenciar si el efecto de las toxinas es directo sobre los linfocitos o se requiere de una cadena de eventos que conducen a la destrucción de los linfocitos. Estudios in vitro han demostrado que la toxina STx2 es citotóxica para los linfocitos B humanos (Menge y col., 1994) y que la subunidad B puede inducir apoptosis en células B del Linfoma tipo Burkitt's (Marcato y col., 2002). Al parecer, todos estos efectos de disminución de la respuesta inmune en el hospedador pudieran relacionarse al establecimiento de las cepas patógenas, en forma crónica en portadores sanos, por lo que su destrucción sería menos eficiente y por ello incrementar la posibilidad de infectar otros hospedadores (Jan-Michael y col., 2000).

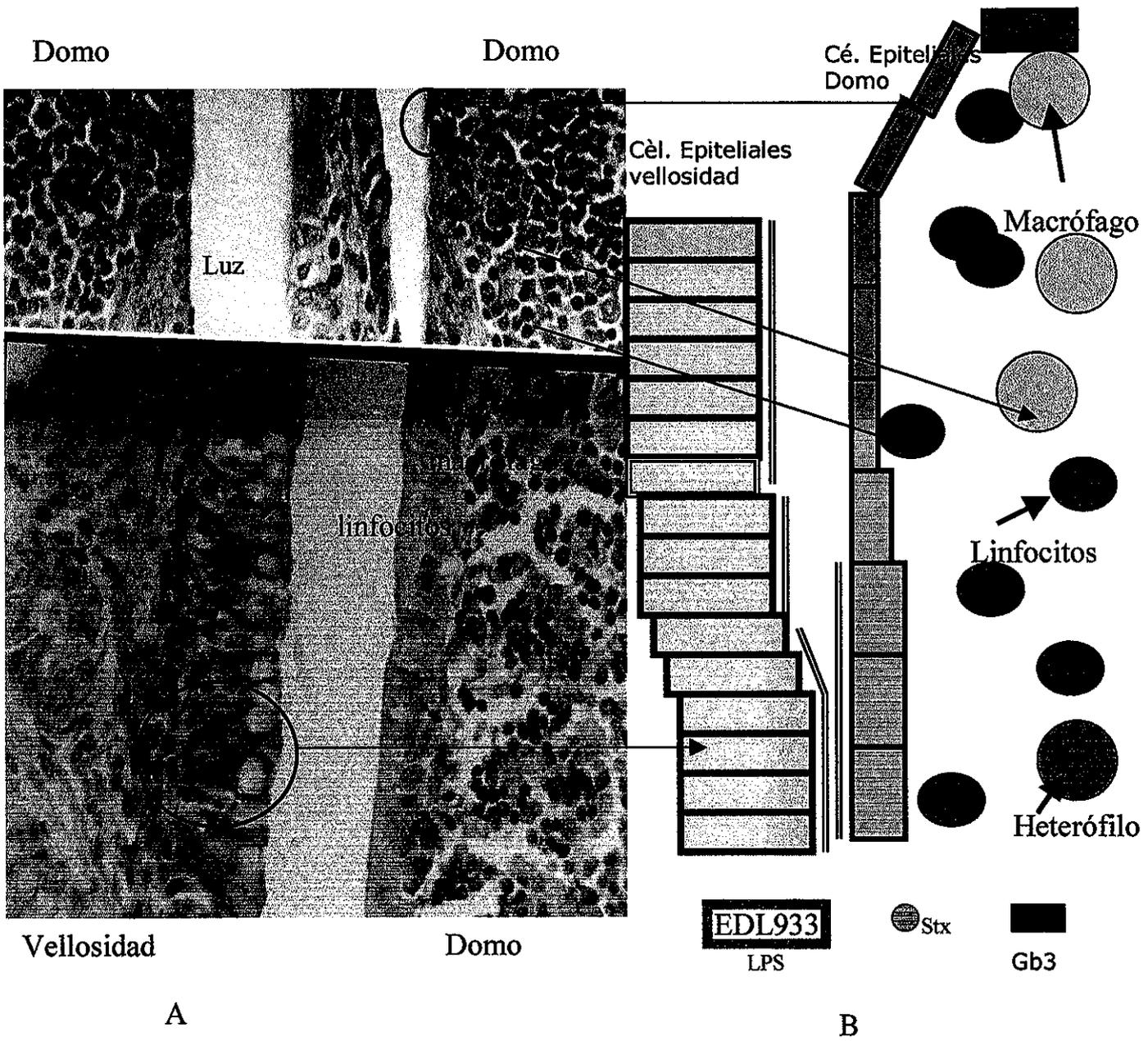


Fig 14 .- (A) Microfotografía del apéndice cecal de un conejo de 2 meses de edad, Mostrando el epitelio del Domo y la vellosoidad, así como la celularidad (B) Representación esquemática de los elementos observados en la microfotografía

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

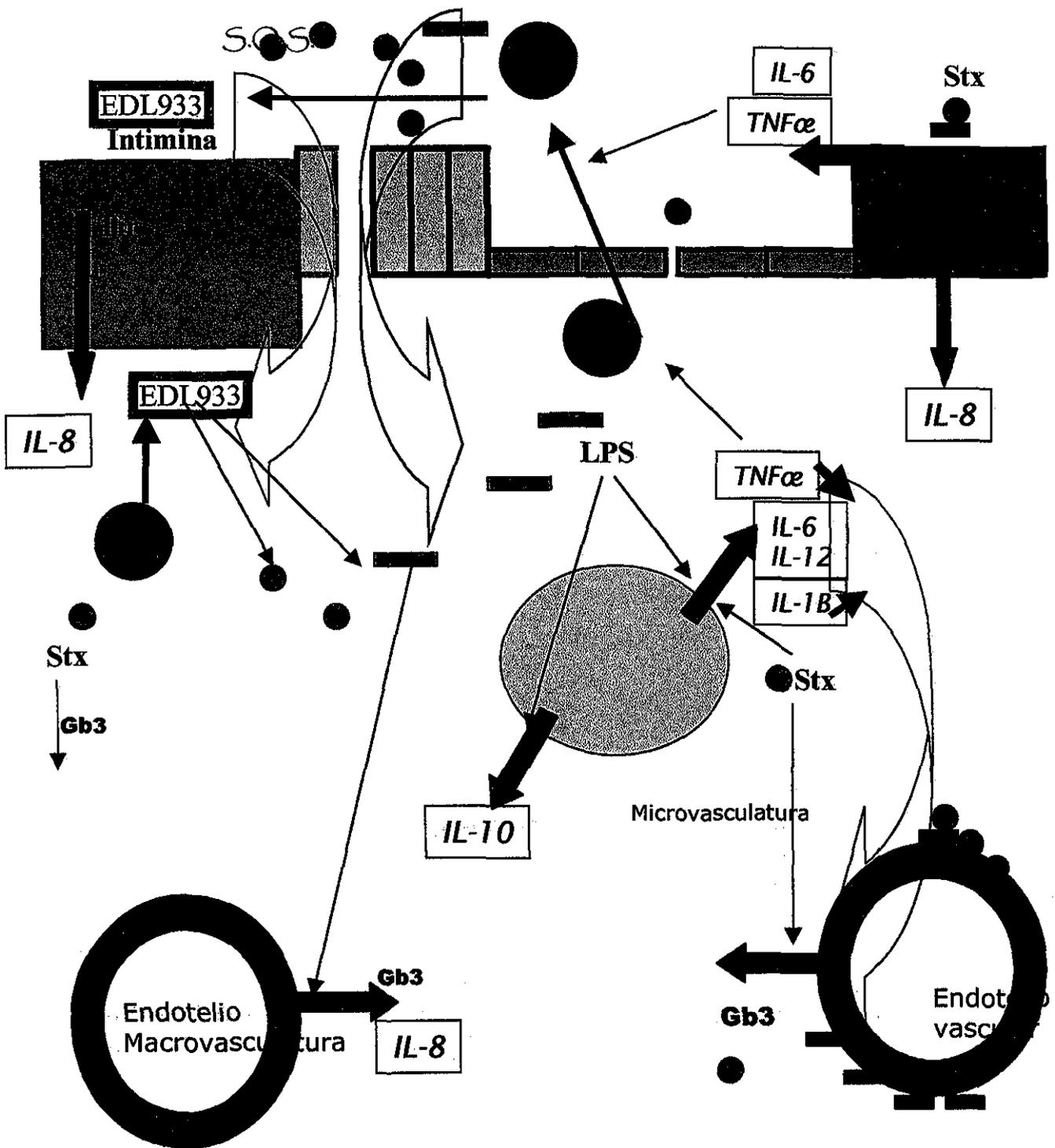


Figura 15.- Representación esquemática de los posibles eventos ocurridos sobre los receptores para las toxinas Stx.

Estimula

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

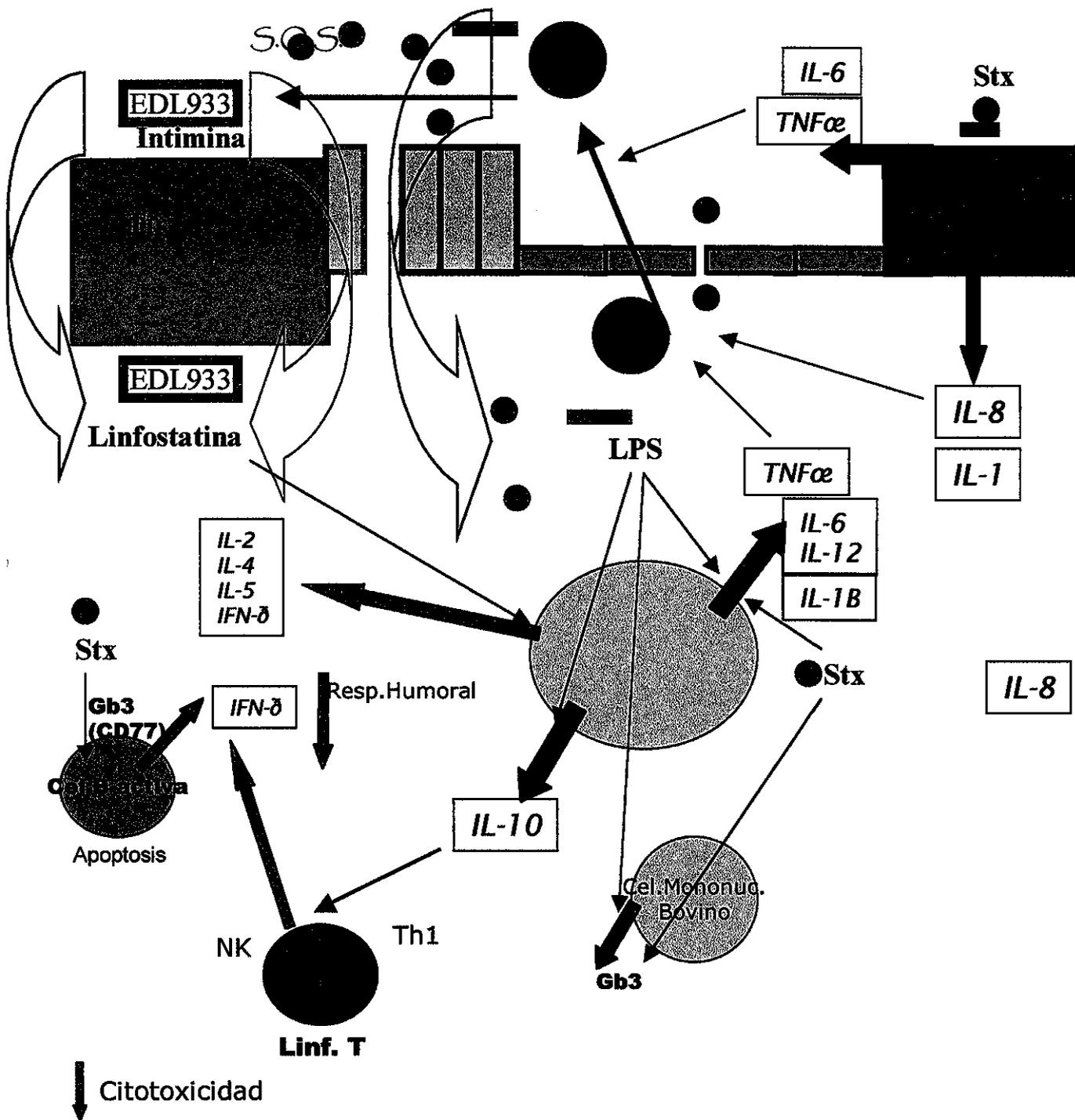


Figura 16.- Representación esquemática del efecto sobre el sistema Inmune por la inoculación ene el AC de *E. coli* EDL933.

Estimula **→** Inhibe **→**

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFIA

Arderiu, X.F., M.J. C. Castiñeiras y J.M. Q. Compañó. 1998. Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Editorial Reverté, España, Vol. 1, pp 3-105.

Archer, O.K., and J.C. Pierce. 1954. The developmental biology of the lymphoid tissue in the rabbit. Lab. Invest. **13**, pp. 259.

Azim, T. F., Qadri, S. Ahmed, M.S. Sarker, R.C. Halder, J.Hamadani, A. Chowdhury, M.A. Wahed, M.A. Salam and M.J. Albert. 1996. Lipopolysaccharide-specific antibodies in plasma and stools of children with *Shigella*-associated leukemoid reactions and hemolytic-uremic syndrome. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, **3**: (6) 701-705.

Barret, T.J., M.E. Potter, and I.K. Wachsmuth. 1989. Bacterial endotoxin both enhances and inhibits the toxicity of shiga like toxin II in rabbits and mice. Infect. Immun **57** (11) : 3434-3437

Baveye, S., E. Elass, D.G. Fernig, C. Blanquart, J. Mazurier and D. Legrand . 2000. Human Lactoferrin Interacts with Soluble CD14 and Inhibits Expression of Endothelial Adhesion Molecules, E-Selectin and ICAM-1 , Induced by the CD14 – Lipopolysaccharide Complex. Infect. Immun. **68**(12): 6519-6525

Brunton, J.L.1994. In Recent advances in Verocytotoxin producing *Escherichia coli* Infections, Proceedings of the 2nd International Symposium and Workshop on Verocytotoxin (Shiga like toxin) producing *Escherichia coli* Infections, Bergamo, Italy, 27-30 June 1994; M.A. Karmali and A.G. Goglio Editors, 1994. ELSEVIER, pp 211-214

Buret, A., M.E. Olson, D. G. Gall and J.A.Hardin. 1998. Effects of Orally Administered Epidermal Growth Factor on Enteropathogenic *Escherichia coli* Infection in Rabbits, Infect. Immun. **66**(10): 4917-4923 .

Burland, V., Y. Shao, N.T. Perna, G. Plunkett, H.J. Sofia and F.R. Blattner. 1998. The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7 , Nucleic Acids Research, **26** (18): 4196-4204.

Calderwood, S.B. 1994. In Recent advances in Verocytotoxin producing *Escherichia coli* Infections, Proceedings of the 2nd International Symposium and Workshop on Verocytotoxin (Shiga like toxin) producing *Escherichia coli* Infections, Bergamo, Italy, 27-30 June 1994; M.A. Karmali and A.G. Goglio Editors. ELSEVIER, pp 119-122

Cheeke, P.R., 1987. Alimentación y nutrición del conejo. Ed. Acribia SA España, pp28-29

Cornick, N.A., S.L. Booher, and H.W. Moon. 2002. Intimin Facilitates Colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in Adult Ruminants. *Infect. and Immun.* **70**(5): 2704-2707.

Cripps, A.W., M. Gleeson. 2000. Ontogeny of mucosal Immunity and Aging. In: *Mucosal Immunology*, Ed. Ogra, P.L., M.E. Lamm, J. Bienemstock, J. Mestecky, W. Strober, J.R. McGhee. 2^a Ed., pp 253-266.

Crowther J.R. 2001. *The ELISA Guidebook*, Humana Press, Totowa, New Jersey. pp 83-114.

Dahan, S., V. Busuttil, V. Imbert, J.F. Peyron, P. Rampal, and D. Czerucka. 2002. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infection Induce Interleukin-8 Production via Activation of Mitogen Activated Protein Kinases and the Transcription Factors NFB and AP-1 in the T84 Cells. *Infect. Immun.* **70** (5):2304-2310.

Dean-Nystrom, E.A., J.F.L. Pohlenz, H.W. Moon, and A.D. O'Brien. 2000. *Escherichia coli* O157:H17 Causes More Severe Systemic Disease in Suckling Piglets than in Calostrum Deprived Neonatal Piglets. *Infect. Immun.* **68**(4): 2356-2358 .

Deutscher M.P. Ed. 1990 *Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology*, Vol. 182, pp 19-83 Academic Press, USA.

Devenish, J., C. Gyles, and J. LaMarre , 1997 Binding of Verotoxin to Porcine Glomeruli and to Protein Receptor on the surface of Vero Cells 3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verotoxin) producing *Escherichia coli* Infections, June 22-26, Baltimore Mariland

Donohue, R.A., I. Kondova, S. Oswald, D. Hutto, and S. Tzipori. 2000. *Escherichia coli* O157:H7 Strains That Express Shiga Toxin (Stx)2 Alone are More Neutropic for Gnotobiotic Piglets Than Are Isotypes Producing Only Stx1 or Both Stx1 and Stx2. *J. Infect. Dis.* **181**: 1825-1829.

Ebel, F., C. Deibel, A.U. Kresse, C.A. Guzman, and T. Chakraborty. 1996. Temperature and medium dependent secretion of proteins by Shiga toxin producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **64**(11): 4472-4479 .

Eisenhauer, P.B, P. Chaturvedi, A.J. Ritchie, J.S. Pober, T.G. Cleary, and D.S. Newburg. 2001. Tumor Necrosis Factor Alpha Increase Human Cerebral Endothelial Cell Gb3 and Sensitivity to Shiga Toxin. *Infect. Immun.*, **69** (3): 1889-1894.

Elliott, S.J., C.B. O'Connell, A.Koutsouris, C. Brinkley, M.S. Donnenberg, G.Hecht, and J.B. Kaper. 2002. A Gene from the Locus of Enterocyte Effacement That is Required for Enteropathogenic *Escherichia coli* To Increase Tight-Junction Permeability Encodes a Chaperone for EspF. *Infect. Immun.*, **70** (5): 2271-2277.

Enami, M., N. Nakasone, Y. Honma, S.Kakinohana, J. Kudaka, M. Iwanaga. 1999 FEMS Microbiology Letters **179** 467-472

Estrada, F.E., L.Peralta, P. Rivas. 1982. Manual de Técnicas Histológicas, 1ª Ed. , pp 27-70 , AGT Editor S.A. México.

Foss, D.L., M.J. Zilliox, and M.P. Murtaugh. 1999. Differential Regulation of Macrophage Interleukin-1 , IL-12 and CD80-CD86 by Two Bacterial Toxins , Infect. Immun. , **67** (10) : 5275-5281.

Foster, G.H., C.S. Armstrong, R. Sakiri, and V.L. Tesh. 2000. Shiga Toxin Induced Tumor Necrosis Factor Alpha Expression : Requirement for toxin Enzymatic Activity and Monocyte Protein Kinase C and Protein Tyrosine Kinases. Infect. Immun. , 5183-5189 **68**:9.

Foster, D.B., A.M. Milh, M. Huesca, and A. Lingwood. 2000. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Induce Apoptosis witch augments Bacterial Binding and Phosphatidylethanolamine Exposure on the Plasma Membrane Outer laflet , Infect. Immun. **68** (6) 3108-3115

Fujii, J., Y. Kinoshita, T. Kita, A. Higure, T. Takeda , N. Tanaka, and S. Yoshuda. 1992. Magnetic Resonance imagen and histopathological study of brain lesions in rabbit given intravenous verotoxin 2. Infect. Immun. , **64** (12): 5053-5060.

Fujii, J., Y. Kinoshita, T. Yutsudo, H.Taniguchi, Obrig T., and S. Yoshida. 2001. Toxicity of Shiga Toxin 1 in the Central Nervous of Rabbits, Infect. Immun. , **69**(10): 6545-6548.

Gyles, C.L. and C.O. Thoen 1986, Pathogenesis of Bacterial Infections in animals , Iowa State University Press/Ames, USA. Pp 115-131.

Gyles C.L. 1994. In Recent advances in Verocytotoxin producing *Escherichia coli* Infections, Proceedings of the 2nd International Symposium and Workshop on Verocytotoxin (Shiga like toxin) producing *Escherichia coli* Infections, Bergamo, Italy, 27-30 June 1994; M.A. Karmali and A.G. Goglio Editors. ELSEVIER, pp 233-240.

Ham, A.W. Tratado de Histología, 1975. Ed. Interamericana, México pp 631-636.

Harlow E , D. Lane. 1988 .Antibodies a Laboratory Manual , Cold Spring Harbor Laboratory USA

Hessle, C., B. Andersson, and A.E. Wold.2000. Gram Positive Bacteria are Potent Inducer of Monocytic Interleukin-12 (IL-12) while Gram Negative Bacteria Preferentially Stimulate IL-10 Production. *Infect. Immun.* , **68** (6): 3581-3586 .

Heumann, D., Y. Adachi, D. Le Roy, N. Ohno, T. Yadomae, M.P. Glauser and T. Calandra. 2001. Role of Plasma, Lipopolysaccharide-Binding Protein and CD14 in Response of Mouse Peritoneal Exudate Macrophages to Endotoxin. *Infect. Immun.* **69**: 378-385.

Huang, L.Y., A.M. Krieg, N.Eller, and D.E. Scott 1999. Induction and Regulation of Th1 Inducing Cytokines by Bacterial DNA, Lipopolysaccharide , and Heat-Inactivated Bacteria.. *Infect. Immun.* , **67**(12): 6257-6263

Hubertus, P.A. J., C. S.T. Hii, G.L. Hodge, and A. Ferrante. 2001, Synthesis and surface expression of CD14 by human endothelial cells. , *Infect. Immun.* **69**: 479-485.

Hughes, A., K. Stricklett, and D.E. Kohan. 1998. Cytotoxic effect of Shiga toxin-1 on human proximal tubule cells. *Kidney Int.*, 54:2, pp 426-437.

Hughes, R.A., Widdicombe J. 1962. The output of lymphocytes from the lymphatic system of the rabbit. *J.Physiol. (London)*, **132**: 384

Hurley, P.B., M. Jacewicz, C.M. Thorpe, L.L. Lincicome, A.J. King, G.T. Keusch, and D.W.K. Acheson.1999. Shiga toxins 1 and 2 Translocate Differently across Polarized Intestinal Epithelial Cells, *Infect. Immun.* **67** (12): 6670-6677

Hurley, B. P., C.M. Thorpe, and D.W.K. Acheson. 2001. Shiga Toxin Translocation across Intestinal Epithelial Cells Is Enhanced by Neutrophil Transmigration , *Infect. Immun.* **69** (10) : 6148-6155.

Isogai, E., H. Isogai, K. Kimura, S. Hayashi, T. Kubota, N. Fujii and K. Takeshi. 1998 Role of tumor necrosis factor alpha in gnotobiotic mice infected with *Escherichia coli* O157:H7 strain. *Infect. Immun.* **66** (1) :197-202

Jacewicz, M.S., D.W.K. Acheson, D.G. Binion, G.A. West, L.L. Lincicome, C. Fiocchi and G.T. Keusch.1999. Response of Human Intestinal Microvascular Endothelial Cells to Shiga Toxins 1 and 2 and Pathogenesis of Hemorrhagic Colitis. *Infect. Immun.* , **67** (3): 1439-1444.

Jan- Michael, A.K., I.C.A. Scaletsky, B.P. McNamara, L. L. Ching, C. Malstrom, S.P. James and M.S. Donnenberg.2000 A Large Toxin from Pathogenic *Escherichia coli* Strains That Inhibits Lymphocyte Activation, *Infect. Immun.* **68**(4): 2148-2155

Kang, G., A.B. Pulimood, R.Koshi, A.Hull, D. Acheson, P. Rajan, G.T. Keusch, V.I. Mathan, and M. M. Mathan. 2001. A Monkey Model for Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infection. *J. Infect. Dis.* **184**: 206-210.

Karmali, M.A., A.G.G. Goglio. 1994. Editores, Recent Advances in Verocytotoxin Producing *Escherichia coli* Infections. Proceedings of the 2nd International Symposium and Workshop on Verocytotoxin (Shiga like toxin)- producing *Escherichia coli* infections, Bergamo Italy , Elsevier.

Karpman, D., H. Cornell, M. Svensson, F. Scheutz, P. Alm, and C. Svanborg. 1997. The Role of Lipopolysaccharide and Shiga – Like Toxin in a mouse model of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *J. Infect. Dis.* **175**(3): 611- 620

Karpman, D., A. Håkansson, M. R. Perez, C. Isaksson, E. Carlemalm, A. Caprioli, and C. Svanborg 1998. Apoptosis of Renal Cortical Cells in the Hemolytic-Uremic Syndrome: In Vivo and In Vitro Studies *Infect Immun*, p.636-644, **66**: 2

Kavi, J., I. Chant, M. Maris, and P.E. Rose . 1987. Cytopathic effect of Verotoxin on Endothelial cells. *Lancet* **2**: 1035

Keith, L.M. 1988. *Embriología Clínica*, 3^a Ed., Interamericana, pp 254-270

Kita, E., Y. Yunou, T. Kurioka, H.Harada, S. Yoshikawa, K. Mikasa, and N. Higashi. 2000. Pathogenic Mechanism of Mouse Brain Damage Caused by Oral Infection with Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* O157:H7 . *Infect. Immun.*, **68** (3): 1207-1214.

Konowalchuck, J., J. I. Speirs, and S. Stavric. 1977. Vero response to cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **18**: 775-779

Koshi, R., M.M. Mathan, and V.I. Mathan. 1997. 3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verotoxin) producing *Escherichia coli* Infections, June 22-26, Baltimore Mariland

Lai Xin-He, J.G. Xu, S. Melgar, and B.E. Uhlin. 1999. An apoptotic response by J774 macrophage cells is common upon infection with diarrhegenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* ,172: 29-34

Larsson, R., D. Rocksén, B. Lilliehöök, A. Jonsson, and A. Bucht. 2000. Dose-Dependent Activation of Lymphocytes in Endotoxin Induced Airway Inflammation , *Infect. Immun.* **68**(12): 6962-6969.

Lelouard, H., H. Reggio, C. Roy, A. Sahuquet, P.Mangeat, and P. Montcourrier. 2001. Glycocalyx on Rabbit Intestinal M Cells Displays Carbohydrate Epitopes from Muc2. *Infect. Immun.* **69**(2): 1061-1071.

Lindgren, S.W., J.E. Samuel, C.K. Schmitt, and A.D. O'Brien , 1994. The specific activities of Shiga Like toxin type II (SLT-II) and SLT-II related toxins of enterohemorrhagic *Escherichia coli* differ when measured by Vero cell cytotoxicity but not by mouse lethality. *Infect. Immun.* , **62**(2):623-631, ASM, USA.

Lingwood, C.A. 1994. Verotoxin Recognition of its Glycolipid Receptor, Globotriaosylceramide: Role in Pathogenesis , in, Recent Advances in Verocytotoxin Producing *Escherichia coli* Infections. Proceedings of the 2nd International Symposium and Workshop on Verocytotoxin (Shiga like toxin)-producing *Escherichia coli* infections, Bergamo Italy , Elsevier, : Karmali M.A., A.G.G. Goglio . Editores

Liu, J., T Akahoshi, T. Sasahana, H. Kitasato, R. Namai, T. Sasaki, M. Inoue and H. Kondo. 1999. Inhibition of neutrophil apoptosis by Verotoxin 2 Derived from *Escherichia coli* O157:H7, *Infect. Immun.* **67** (11): 6203-6205

Louise, C.B. and T.G. Obrig. 1992. Shiga toxin – associated hemolytic uremic syndrome: combined cytotoxic effects of shiga toxin and lipopolysaccharide (endotoxin) on human vascular endothelial cells in vitro. *Infect. Immun.* **60**:4 1536 –1543. USA

Louise, C.B., M.C. Tran, and T.G. Obrig. 1997. Sensitization of human umbilical vein endothelial cells to Shiga toxin : involvement of Protein kinase C and NF – KappaB. *Infect. Immun.* **65** (8): 3337-3344

Luna L. 1968. General References in Histopathologic Techniques in : Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology, Mc Graw Hill Inc, USA.

Malstrom, C., and S. James. 1998. Inhibition of Murine Splenic and Mucosal Lymphocyte Function by Enteric Bacterial Products, *Infect. Immun.* **66** (7): 3120-3127.

Marcato, P., G. Mulvey, and G.D. Armstrong. 2002. Cloned Shiga Toxin 2B subunit Induces Apoptosis in Ramos Burkitt's Lymphoma B Cells. *Infect. Immun.* **70**:3 , pp. 1279-1286.

Maroeska, D., W.M. Loo, A.E. Heuvelink, E. Boer, J. Nauta, J. van der Walle, and L.P.W.J.Heuvel. 2001, Vero Cytotoxin Binding to Polimorphonuclear Leukocytes among Households with Children with Hemolytic Uremic Syndrme. *J. Infect. Dis.* **184**: 446-450.

Melton, C.A.M., J.E. Rogers, and A.O. Brien 1997. Virulence of Shiga Toxin producing *E. coli* (STEC) in an mouse model correlates with toxin activation, 3rd International Symposium and Workshop on Shiga toxin (Verocitotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections , Baltimore , Marylan USA.

Menge, C., L.H. Wieler, T. Schlapp, and G. Baljer .1999. Shiga Toxin 1 from *Escherichia coli* Blocks Activation and Proliferation of Bovine Lymphocyte Subpopulations In Vitro. *Infect. Immun.* **67** (5): 2209-2217.

Michinaga O., K. Shimizu, K. Nomoto, M. Takahashi, M. Watanuki, R. Tanaka, T. Tanaka, T. Hamabata, S. Yamasaki, and Y. Takeda. 2001. Protective Effect of *Lactobacillus casei* Strain Shirota on Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 Infection in Infant Rabbits , (2001) *Infect. Immun.* **69** (2) : 1101-1108.

Monroy, C.M.L.1973. Consideraciones Anatómicas Macro y Microscópicas del Apéndice cecal del conejo, Tesis de Licenciatura , UNAM, Méx.

Mukherjee, J.; K. Chios, D. Fishwild, D. Hudson, S. O'Donnell, S. M. Rich, A. Donohue-Rolfe, and S. Tzipori 2002. Human Stx2-Specific Monoclonal Antibodies Prevent Systemic Complications of *Escherichia coli* O157:H7 Infection. *Infect. and Immun.*, p. 612-619, **70**: 2

Mulvey, G., R. Vanmaele, M. Mrazek, M. Cahill. 1998 Armstrong. Affinity purification of Shiga like toxin I and Shiga like toxin II . *Journal of Microbiology Methods* **32**: 247-252.

Nelson, S., S. Richardson, C. Lingwood, M. Petric, and M. Karmali .1994. In Recent advances in Verocytotoxin producing *Escherichia coli* Infections, Proceedings of the 2nd International Symposium and Workshop on Verocytotoxin (Shiga like toxin) producing *Escherichia coli* Infections, Bergamo, Italy, 27-30 June 1994; M.A. Karmali and A.G. Goglio Editors, 1994. ELSEVIER, pp 233-240.

Nataro, J.P., and Kaper. J.B. 1998. Diaheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 142-201.

Orden, J.A., J.A. Ruiz Santa-Quiteria, D. Cid, S. García, R. Sanz y R. De la Fuente 1998 .Verotoxin- producing *Escherichia coli* (VTEC) and eae-positive non VTEC in 1-30 days old diarrhoeic dairy calves. *Veterinary Microbiology* **63** : 239-248.

O'Brig, T.G. , P.J. Del Vecchio , M.A. Karmali, M. Petric, T.P. Moran, and T.K. Judge. 1987. Pathogenesis of Haemolytic Uremic Syndrome. *Lancet* **2**: 697

Pai, C.H., J.K. Kelly, and G.L. Meyer, 1986. Experimental Infection of infant rabbits with verotoxin-producing *Escherichia coli* *Infect. Immun.* **51**(1): 16-23

Palacios, M.M.A. 1992. Detección de citotoxina (SLTIIv) en cepas de *Escherichia coli* de origen porcino, Tesis ENCB, IPN, México.

Panes, J. and D. N. Granger. 1998 Leukocyte Endothelial Cell Interactions: Molecular Mechanisms and Implication in Gastrointestinal Disease. *Gastroenterology* **114**: 1066-1090.

Paton, A.W., E. Voss, P.A. Manning, and J.C. Paton 1998 Antibodies to lipopolysaccharide block adherence of Shiga toxin Producing *Escherichia coli* to human intestinal epithelial (Henle 407) cells. *Microb. Pathog.* **24**(1): 57-63.

Paton, J.C., and Paton. A.W. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 450-479.

Pospisil, R., G.O. Young-Cooper, R.G. Mage. 1996. Superantigen-like unconventional Ag-Ab interaction: "positive" Selection of rabbit appendix B-cells. *Vet. Immunology and Immunopathology* **54**: 21-22

Puente, J.L., and B.B. Finlay. 2001. Pathogenic *Escherichia coli*. in Principles of Bacterial Pathogenesis, Ed. E. A. Groisman, Academic. Press, pp.387-456.

Ramegowda, B., and V.L. Tesh. 1996. Differentiation-associated toxin receptor modulation, cytokine production, and sensitivity to Shiga-like toxins in human monocytes and monocytic cell lines. *Infect. Immun.* **64**:4 1173-1180.

Ren, J., I. Utsunomiya, K. Taguchi, T. Ariaga, T. Tai, Y. Ihara, T. Miyatake. 1999. Localization of verotoxin receptors in nervous system. *Brain Research* **825** : 183-188

Richardson, S.E., M.A. Karmali, L.E. Becker, C. R. Smith. 1988. The histopathology of the hemolytic uremic syndrome associated with verocytotoxin producing *Escherichia coli* infections. *Hum. Pathol* , **19**(9) 1102-108.

Richardson, S.E., T.A. Rotman, V. Jay, C.R. Smith, L.E. Bcker, M. Petric, N.F. Olivieri, and M.A. Karmali. 1992. Experimental Verocytotoxemia in rabbits, *Infect. Immun.* , **60**(10): 4154-4167.

Roitt, I.M., J. Brostoff and Male D.K. 1989 *Immunology*, J.B. Lippincott Company Philadelphia USA 9.1-11.10.

Ross, M., H., E.J. Reith y Romrell L.J. 1992 *Histología Texto y Atlas Color*, Ed. Médica Panamericana S.A. de C.V. pp. 438-451 México.

Sanford, P.A. 1984. *Fisiología del Aparato Digestivo*. Ed. el Manual Moderno , México pp 155-180.

Sansonetti, P.J., C. Egile, and C. Wenneras 2001. Shigelosis: From Disease Symptoms to Molecular and Cellular Pathogenesis. in Principles of Bacterial Pathogenesis, Ed. E. A. Groisman, Academic. Press, pp.336-387.

**ESTA TESIS NO SALI
DE LA BIBLIOTECA**

Sherman, P., R. Soni, and M. Karmali. 1988 Attaching and Effacing Adherence of Vero Cytotoxin-Producing *Escherichia coli* to Rabbit Intestinal Epithelium "in vivo" *Infect. Immun.* 56: 756-761.

Shibolet, O., A. Shina, S. Rosen; T.G. Cleary, M. Brezis, and S. Ashkenazi 1997. Shiga toxin induce medullary tubular injury in isolated perfused rat kidneys. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* , 18:1 , pp 55-60.

Sjogren, A., R Neill, D. Rachmilewitz, D. Fritz, J. Newland, D. Sharpnack, C. Colleton, J. Fondacaro, P. Gemski, and E. Boedeker 1994. Role of Shiga-like toxin I in bacterial enteritis: comparison between isogenic *Escherichia coli* strains induced in rabbits *Gastroenterology*, Vol 106, 306-317.

Stephen, J., R.A. Pietrowski. 1986. Bacterial Toxins. American Society for Microbiology. 2^a Ed. Pp37-38. USA

Stevens, M.P., O. Marchès, J.Campbell, V. Huter, G. Frankel, A. D. Phillips, E. Oswald, and T. S. Wallis 2002. Intimin, Tir, and Shiga Toxin 1 Do Not Influence Enteropathogenic Responses to Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Bovine Ligated Intestinal Loops. *Infect. and Immun.*, p. 945-952, 70: 2

Sugatani, J., T. Igarashi, M. Shimura, T. Yamanaka, T. Takeda, and M. Miwa. 2000. Disorders in the immune response of T- and B- Cells in mice administered intravenous verotoxin 2. *Life Sciences* 67 : 1059-1072 , 2000.

Taga, S., K. Carlier, Z. Mishal, C. Capoulade, M. Mangeney, Y. Lécluse, D. Coulaud, C. Tétaud, L. L. Pritchard, T. Tursz, and J. Wiels. 1997. Intracellular Signaling Events in CD77-Mediated Apoptosis of Burkitt's Lymphoma Cells . *Blood*, 90: 7 (October 1), pp. 2757-2767.

Thorpe, C.M., B.P. Hurley, L.L. Lincicome, M.S. Jacewicz, G.T. Keusch, and D.W.K. Acheson. 1999. Shiga Toxin Stimulate Secretion of Interleukin-8 from Intestinal Epithelial cells. *Infect. Immun.* 67 (11) : 5985-5993.

Tijssen, P. 1993. Practice and theory of Enzyme immunoassays, In: Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Volumen 15, 8th impresión. Burdon R.H. and Knippenberg P.H. Ed. Elsevier Science Publishers B.V. pp 297-384.

Tomohiro, K., R.L. Owen. 2000. Structure and function of Intestinum a Mucosal Epithelium. In: Mucosal Immunology, ed. Ogra, P.L., M.E. Lamm, J. Bienemstock, J. Mestecky, W. Strober, J.R. McGhee. 2^a Ed., pp 115-132.

Tzipori, S., K. I. Wachsmuth, C. Chapman, R. Birner, J. Brittingham, C. Jackson, and J. Hogg. 1986. Studies on the pathogenesis of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. *J. Infect. Dis.* **154**:712-716

Tzipori, S., H. Karch, K.I. Wachsmuth, R.M. Robins-Browne, A.D. O'Brien, H. Lior, M.L. Cohen, J. Smithers, and M.M. Levine 1987. Role of a 60 Megadalton Plasmid and Shiga-Like Toxins in the Pathogenesis of Infection Caused by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Gnotobiotic Piglets . *Infect. Immun.* **55**: 3117-3125.

Van de Kar, N.C., L.A. Monnens, M.A. Karmali, and V.W. van Hinsbergh. 1992. Tumor necrosis factor and interleukin -1 induce expresión of the verotoxin receptor globotriaosylceramide on human endotelial cells: implications for the patogenesis of the hemolytic uremic sindrome. *Blood*, **80** (11) : 2755-2764.

Valdivia, A.G. 1995 Desarrollo de un modelo animal en el conejo para el estudio de Verocitotoxinas de *Escherichia coli* , Tesis de Grado , FESCuautilan UNAM, Méx.

Valdivia, A.G., J.A. Montaraz, and J.L. Tortora-Perez 1997. Limphotoxic effects of verocytotoxin producing *E. coli* in rabbit caecum . 3rd International Symposium and Workshop on Shiga toxin (Verocitotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections , Baltimore , Marylan USA

Wadolowski, E. A., J. A. Burris, and A. D. O'Brien. 1990. Mouse model for colonization and disease caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* **58**:2438-2445

Wagner, P.L., D.W.K. Acheson, and M.K. Waldor.1999. Isogenic Lysogens of diverse Shiga Toxin 2 Encoding Bacteriophages Produce Markedly Different Amounts Of Shiga Toxin. *Infect. Immun.* , **67**(12) : 6710-6714

Wagner, P.L., D.W.K. Acheson and M.K. Waldor ,2001. Human Neutrophils and their products Induce Shiga Toxin Production by Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **69**(3): 1934-1937.

Wells, C.L. , M.A. Elisabeth, Westerlo V., R.P. Jechorek, H.M. Haines, and S.L. Erlandsen , 1998. Cytochalasin - induced Actin Disruption of polarized Enterocytes can Augment Internalization of Bacteria. *Infect. Immun.* **66**(6): 2410-2419

Wolski, V.M., A.M. Soltyk, and J.L. Brunton 2001. Mouse Toxicity and Cytokine Release by Verotoxin 1B Subunit Mutants, *Infect. Immun.* , **69**(1): 579-583

Yoxall, A.T. and J.F.R. Hird 1980. Physiological Basis of Small Animal Medicine, Blackwell Scientific Publications; Great Britain, pp71-126

Zhang, H., D.W. Niesel, J.W. Peterson, and G.R. Klimpel. 1998. Lipoprotein Release by Bacteria: Potential Factor in Bacterial Pathogenesis, *Infect. Immun.*, **66**(11): 5196-5201 .

Zoja, C., D. Corna, C. Farina, G. Sacchi, C. Lingwood, M.P. Doyle, VV Padhye, M. Abbate, and G. Remuzzi. 1992. Verotoxin glycolipid receptors determine the localization of microangiopathic process in rabbits given verotoxin- 1. *J. Lab. Clin. Med.* **120**:2 , pp 229-238.