

T/412

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

87125



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS
LÍNEA DE DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE BIOLÓGICOS

**“Efecto de la toxina Pet de *E. coli* enteroagregativa sobre
la proliferación celular y la secreción de citocinas en
células mononucleares de sangre periférica en
voluntarios sanos”**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
FARMACÉUTICAS**

PRESENTA
LUIS ARMANDO JIMÉNEZ ALVAREZ

TUTOR: DRA. JULIA PÉREZ RAMOS

ASESORES

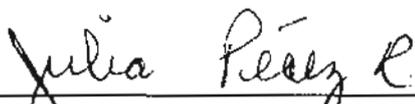
M. en C. TERESITA SAINZ ESPUÑES DRA. LAURA CASTRILLÓN RIVERA

MÉXICO, D.F.

JULIO 2004

Vo. Bo. del comité tutorial

TUTOR:


Dra. Julia Pérez Ramos

ASESORES:


M. en C. Teresita Sainz Espuñes


Dra. Laura Castrillón Rivera



Casa abierta al tiempo

Vo. Bo. de los sinodales

Dr. Carlos Alberto Eslava Campos

Dra. María Guadalupe Rico Rosillo

Agradecimientos

A Dios

A mi mamá Mari Cruz

A mis hermanos: Angelita y Marco Antonio

Doy mis más sinceras gracias a:

M. en C. Felipe Mendoza P., Dra. Lourdes M. Barrera R., Dra. Julia Pérez R., M. en C. Teresita Sainz E., y a la Dra. Laura Castrillón R.

Luis Amando Jiménez Álvarez

| | Págs. |
|--|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| MARCO TEÓRICO | 3 |
| Escherichia coli | |
| Clasificación de <i>E. coli</i> por mecanismos de Patogenicidad | |
| Mecanismos de defensa del hospedero contra la infección por enterobacterias | |
| Método para evaluar la respuesta inmune | |
| HIPÓTESIS | 21 |
| OBJETIVOS | 21 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 22 |
| Valoración de la proliferación de las células mononucleares de sangre periférica | |
| Evaluación de la expresión de citocinas extracelulares | |
| Evaluación de la expresión de citocinas intracelulares | |
| RESULTADOS | 31 |
| DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 39 |
| CONCLUSIONES | 43 |
| BIBLIOGRAFÍA | 44 |
| ANEXO | 51 |

Las enfermedades gastrointestinales en los países en vías de desarrollo ocupan los primeros lugares de mortalidad debida a complicaciones como la diarrea y la deshidratación, cabe destacar que la población más afectada durante la última década ha sido la infantil (Nataro, 1998).

En nuestro país en el año 2000 las defunciones por gastroenteritis ocuparon el décimo cuarto en la población general (INEGI, 2000).

Uno de los agentes etiológicos más importantes causantes de enteritis y otras infecciones intestinales es *Escherichia coli*.

E. coli es una bacteria que predomina en la flora normal del colón humano, este microorganismo coloniza el tracto gastrointestinal de los infantes a las dos horas de vida, queda confinada en el lumen intestinal como una bacteria benéfica, pero en caso de inmunosupresión en el huésped o cuando las barreras gastrointestinales han sido alteradas, las cepas de *E. coli* no patogénicas pueden desencadenar una infección.

Las infecciones producidas por cepas patogénicas pueden estar limitadas a la superficie de la mucosa o diseminarse a través del cuerpo. Algunas cepas de *E. coli* causan en el humano enfermedades intestinales como diarreas y extraintestinales como septicemias, meningitis y enfermedades del tracto urinario (Levine et al., 1984 y Vial et al., 1988).

Las diarreas son un problema de salud que afecta principalmente a la población infantil menor de 5 años. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) es una de las siete clases de *E. coli* que desencadena diarrea aguda, con cuadros de diarrea persistente, inflamación intestinal y sangrado que por sus características favorece la desnutrición de los niños que la presentan (Debroy et al., 1995).

Aunque se han empezado a dilucidar los mecanismos de patogenicidad de dicha bacteria, no se ha explorado ampliamente la participación de la respuesta inmune en el control y

eliminación de la misma, pero la utilización de algunos modelos *in vitro* e *in vivo* permiten reconocer algunas características de este fenómeno.

Se ha identificado un factor de virulencia importante dentro de los mecanismos de patogenicidad de EAEC una exotoxina denominada Pet (Plasmid Encoded Toxin), de naturaleza proteica (Eslava et al., 1998). Se han identificado anticuerpos IgA en el lavado intestinal e IgG en el suero antitoxina en un modelo experimental (Sainz et al. 2002).

En el presente trabajo, se pretende evaluar el efecto inmunomodulador que tiene la toxina Pet de EAEC sobre células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas de voluntarios sanos; a través de la proliferación de células de PBMC, activación de las células mononucleares, determinación de citocinas en sobrenadante de cultivo (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ ; Th1/Th2) y la determinación de citocinas intracelulares (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10) por la técnica Cytometric Bead Array, Kit (CBA, BD PharMingen) y así aportar conocimientos sobre los mecanismos de respuesta del huésped ante ella, lo que permitirá desarrollar inmunógenos que permitan interferir con los mecanismos patogénicos fundamentales.

Escherichia coli

El bacteriólogo alemán Theodore Escherich fue el primero en describir a la bacteria, denominándola *Bacterium coli commune*. Este investigador aisló la bacteria de las heces normales de un infante y aunque constantemente propuso su participación como agente causal de la diarrea, no fue sino hasta la década de los años cincuenta del presente siglo, cuando se estableció plenamente su participación como patógeno intestinal (Lior, 1994).

Es una especie del género *Escherichia* perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, anaerobio facultativo de la flora intestinal, gram negativo, no esporulado, generalmente con flagelos peritricos y fimbrias. Frecuentemente presenta una cápsula y algunas cepas producen colonias mucoides (Levine et al., 1984 y Vial et al., 1988).

Al identificarse los factores de virulencia se han logrado diferenciar las diversas cepas de *E. coli* a través de un análisis de serotipo. Los serotipos son determinados por los diferentes antígenos presentes en la superficie de la bacteria (O), en los flagelos (H) y en la cápsula (K) de la bacteria. Los antígenos fimbriales se han designado como (F). Un total de 175 antígenos (O) definen el serogrupo, y la combinación entre los antígenos somáticos (O) y de los flagelos (H) definen el serotipo (Nataro et al., 1998).

Clasificación de *E. coli* por mecanismos de patogenicidad

Algunas cepas de *E. coli* causan en el humano enfermedades intestinales (diarreas) y extraintestinales (septicemias, meningitis y enfermedades del tracto urinario). Los mecanismos de patogenicidad involucrados en la infección por *E. coli* incluyen la adherencia y colonización al epitelio de ciertas áreas del intestino; la producción de proteínas bacterianas (toxinas), liberadas una vez que la bacteria ha colonizado el intestino, con un efecto final en la estimulación en la secreción de agua y electrolitos (enterotoxinas) o la destrucción celular (citotoxinas); la invasión y reproducción bacteriana dentro del citoplasma de las células epiteliales del intestino permite la evasión de la respuesta inmune con el consecuente daño al hospedero. La habilidad de las cepas de

E. coli patógenas de adherirse y colonizar la mucosa intestinal a pesar del peristaltismo y de la flora normal del intestino se asocia entre otras a la presencia de fimbrias (Levine et al., 1984 y Vial et al., 1988). El estudio de los diferentes mecanismos de patogenicidad de estos microorganismos han permitido la clasificación en:

E. coli uropatógena (UPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroadherente difusa (DAEC) y *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Nataro, 1998).

Escherichia coli uropatógena (UPEC), es el principal agente causal de la mayoría de las Infecciones del Tracto Urinario (UTIs) son las cepas UPEC, las mujeres son las más afectadas. Algunas de las cuales incluyen: bacteriuria, cistitis y pielonefritis. Las cepas UPEC expresan varios factores de virulencia capaces de colonizar el tracto urinario y persistir en el desafío de la alta efectividad de la defensa del huésped. Los factores de virulencia asociados con UPEC incluyen: hemolisinas, factor necrozante citotóxico, aerobactina, sideróforos, cápsulas, lipopolisacárido (LPS) y estructuras filamentosas asociadas a adhesividad. Una estructura que tiene que ver con adhesividad es el llamado pili (fimbria) tipo P, que puede mediar la unión de la bacteria y la invasión a las células epiteliales de la vejiga. La invasión provee a las UPEC de un ambiente protector en el cual la bacteria puede replicarse o permanecer en un estado inactivo. Se ha demostrado que los uropatógenos pueden establecerse dentro del tejido de la vejiga aún con tratamiento antimicrobiano.

La infección por UPEC que presenta fimbrias tipo P con pili tipo 1 puede desencadenar un número de respuestas por parte del huésped que incluyen producción de citocinas, inflamación y la exfoliación de células epiteliales de la vejiga infectada. Estas UPEC presentan un número limitado de serogrupos O en UTIs estos incluyen: O1, O2, O4, O6, O7, O18 y O75; y también un pequeño número de antígenos capsulares: K, K1, K2, K3, K5, K12 y K13 que son más prominentes entre las UPEC (García-Mart, 1996 y Swenson et al., 1996).

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC), se caracteriza por elaborar dos diferentes toxinas: la termolábil (LT) y la termoestable (ST). El mecanismo de la enfermedad, incluye la existencia de dos plásmidos codificadores de dichas enterotoxinas. Las cepas pueden expresar sólo LT o sólo ST, o bien ambas. La toxina LT es similar en estructura química,

función y antigenicidad a la toxina producida por el *Vibrio cholerae*, es termolábil, provoca un incremento en los niveles de adenosinmonofosfato cíclico (AMPc) intracelular, de esta forma las células de las criptas intestinales aumentan la secreción de agua y electrolitos, con una consecuente disminución en la absorción en las vellosidades. La toxina ST aumenta los niveles de guanosinmonofosfato cíclico (GMPc), disminuye la actividad de la secreción del ión cloro e inhibe la absorción del cloruro de sodio en el fluido intestinal (Nataro et al., 1998).

Además de la elaboración de las enterotoxinas, las cepas ETEC producen proteínas fimbriadas, con las cuales se adhieren a receptores celulares específicos. Se han descrito cuando menos 15 diferentes tipos de estos factores adhesivos (Willshaw et al., 1990).

Escherichia coli enteropatogénica (EPEC), se caracteriza por producir la desaparición de microvellosidades y adherencia íntima entre la bacteria y la membrana celular del epitelio. Altera el citoesqueleto de las células epiteliales, hay acumulación de actina polimerizada la cual esta directamente relacionada a la adhesión de EPEC; las bacterias algunas veces forman una estructura de pedestal, que puede extenderse por arriba de las células epiteliales a 10 μm en forma de una estructura como pseudópodo (Jerse et al., 1990).

En cultivos de células HEp-2, el 80% de una colección importante de cepas EPEC se adhieren en forma de microcolonias sobre el citoplasma de las células, a esta forma de adherencia se le denominó localizada, característica que no es compartida por otros grupos de *E. coli* asociados a la producción de diarrea (Cravioto et al., 1979).

Estudios posteriores demuestran que existen cuando menos tres tipos de adherencia de *E. coli*, observados en cultivo de células HEp-2: 1) Localizada, caracterizada por la formación de microcolonias en la superficie celular; 2) Difusa, las bacterias se adhieren a toda la superficie celular; y 3) Agregativa, las bacterias forman cúmulos con apariencia de ladrillos apilados tanto en la superficie celular, como en el vidrio de la preparación (Vial et al., 1988).

Se ha propuesto que la adherencia de tipo localizado en las cepas EPEC tiene dos fases: una inicial mediada por adhesinas de tipo fimbriado, que permiten a la bacteria acercarse a sus receptores celulares y una segunda fase de adherencia íntima. Esta última se relaciona con el esfacelamiento del epitelio, pérdida de las microvellosidades y la formación de estructuras en forma de pedestal (Knutton et al., 1987).

Los cambios bioquímicos relacionados con estos procesos son los que probablemente inducen a la célula intestinal a secretar agua y electrolitos (cloro y potasio) al espacio intraluminal. El efecto fisiológico secundario a estas alteraciones, así como la deficiente absorción de líquidos por la falta de microvellosidades en segmentos importantes del intestino, son los principales responsables del cuadro de diarrea (Jerse et al., 1990).

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC). Se ha utilizado la asociación de EHEC con la etiopatogenia de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico, para definir a este grupo bacteriano (Tzipori et al., 1992). Las cepas responsables de estos cuadros tienen la capacidad para elaborar una o más citotoxinas. Las citotoxinas que produce el grupo enterohemorrágico de *E. coli* por sus características antigénicas y por su actividad sobre cultivos celulares; reciben dos diferentes denominaciones: citotoxina semejante a la de Shiga (SLT), por la característica que tiene una de las variedades de cruzar antigénicamente con la toxina de *Shigella dysenteriae* tipo q, y el término de verotoxina (VT), por su efecto citotóxico sobre monocapas de células Vero (Scotland et al., 1985).

Se conocen tres tipos de antígenos de las citotoxinas, dos de ellas afectan específicamente a humanos, refiriéndose como VT1 o SLT-I y VT2 o SLT-II y una variedad antigénica de VT2, que afecta a animales denominada Vte o SLT-IIv (Marquez et al., 1987).

La actividad específica de estas toxinas consiste en inhibir la síntesis de proteínas a través de interferir con la unión del aminoacil t-RNA con la subunidad 60S del ribosoma (Igarishi et al., 1987).

Escherichia coli enteroinvasiva (EIEC). La patogenicidad de esta cepa es idéntica a la de la bacteria *Shigella ssp.*, ambos microorganismos han mostrado la invasión del epitelio colónico y su fenotipo está mediado para ambos por un plásmido y un locus cromosomal. EIEC y *Shigella ssp.* elaboran una o más enterotoxinas importantes en la patogénesis diarreica. La patogénesis favorece: 1) La penetración al epitelio celular, 2) la lisis de la vacuola endocitada, 3) la multiplicación intracelular, 4) el movimiento direccional a través del citoplasma y 5) la extensión interna a las células epiteliales adyacentes. El sitio de acción de *Shigella ssp.* y EIEC es la mucosa colónica. En estudios histológicos las cepas de *Shigella* se establecen en las células epiteliales con la consecuente destrucción de la mucosa y la formación de abscesos. Estas alteraciones fueron atribuidas a la acción de

las citotoxinas, cuya actividad específica es la inhibición de la síntesis protéica (Hale, 1985).

Escherichia coli enteroadherente difusa (DAEC). Se reconoce a DAEC como una categoría independiente de *E. coli* potencialmente diarreogénica. Esta cepa predominantemente se asocia a enfermedades diarreicas en niños.

Levine demostró que el riesgo de diarrea se presenta entre 1 y 5 años, la razón de la asociación con la edad aún no se conoce. El modo de adquisición de DAEC no está determinado. Pocos estudios epidemiológicos y clínicos han permitido adecuar la descripción del síndrome clínico. La mayoría de los infectados con DAEC presentan diarrea con pérdida de agua, sin sangre y con presencia de leucocitos en las heces (Nataro et al., 1998).

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC). *E. coli* enteroagregativa es considerada el agente causal de la diarrea persistente (con más de 14 días de evolución) en niños de países en vías de desarrollo (Nataro et al., 1998; Pai et al., 1997 y Sang et al., 1997); también está asociada a brotes de diarrea en adultos (Morabito et al., 1998; Smith et al., 1997) y ha sido aislada de pacientes con SIDA (Mayer y Wanke, 1995; Polotsky et al., 1997 y Wanke et al., 1998). La EAEC incrementa la secreción de moco del intestino delgado, aunque no todos los organismos desarrollan diarrea, todos producen ese moco inusual, donde se encuentra un empaquetamiento denso de bacterias agregadas. El papel de la producción de moco en exceso en la patogénesis de EAEC aún no está claro, sin embargo la formación de una película pesada puede estar relacionada con la capacidad diarreica del organismo y quizá a su habilidad para causar colonización persistente (Hicks et al., 1996). EAEC se adhiere *in vitro* a las células HEp-2 formando un patrón característico de adherencia agregativa denominado "tabiques apilados", al examinar las propiedades de adherencia se subdivide su fenotipo en dos categorías: agregativa (AA) y difusa (DA). La adherencia AA es distinguida por una prominente autoaglutinación de las células de una bacteria con otra; esto ocurre frecuentemente sobre las superficie de las células HEp-2. El fenotipo difusamente adherente presenta una baja agregación y adherencia sobre la superficie de las células HEp-2 (Nataro et al., 1987). EAEC puede expresar 3 tipos de fimbrias involucradas en el patrón de adherencia agregativa. Nataro et al. (1992, 1993) identificaron una estructura fimbrial formadora de penacho de 2-3 nm diámetro, denominada fimbria de adherencia tipo 1 (AAFI), la cual es codificada en un

plásmido de 60 MDa. Las tipo II (AAFII), son morfológica y genéticamente diferentes a la de tipo I (Czesulin et al., 1997). Recientemente reportaron una nueva fimbria de adhesión agregativa denominada tipo III (AAF III) (Bernier et al., 2002).

Debroy et al. (1995) sugieren que las proteínas de membrana externa (OMP por sus siglas en inglés) son responsables de la adherencia agregativa de algunas cepas de EAEC. Wai et al. (1996) implican a una OMP de 38 kDa como responsable de la adherencia agregativa. Otros factores de virulencia expresados por EAEC incluyen una enterotoxina estable al calor (EAST-I) y una proteína (Pic) involucrada en la colonización intestinal (Henderson et al., 1999). Otra toxina proteica es secretada por EAEC no hemolítica, que inmunológicamente está relacionada con la hemolisina α de *E. coli*. El tratamiento de células HEP-2 con esta proteína causa elevación del calcio intracelular debido a la toma del extracelular del medio, probablemente por el flujo de este a través de un poro creado por la toxina, como lo hace la hemolisina, y por liberación del mismo calcio intracelular. No todos estos factores de virulencia se encuentran presentes en todas las cepas aisladas (Baldwin et al., 1992). Al utilizar modelos de íleon de ratas con sobrenadantes provenientes de cultivos de EAEC, Eslava et al (1998) identificaron una exotoxina denominada Pet (Plasmid Encoded Toxin), de naturaleza proteica con un peso molecular de 108 kDa aproximadamente que pertenece al tipo de proteínas autotransportadoras y es codificada en un plásmido de 60 MDa asociado con la adherencia agregativa. La toxina Pet es una serina-proteasa, ésta representa a la primera proteína de autotransporte con actividad de enterotoxina. Los tejidos intestinales expuestos a esta enterotoxina producen cambios histopatológicos caracterizados por un aumento en la liberación de moco, exfoliación de células y desarrollo de grietas en las criptas (Navarro-García et al., 1998); así como, la contracción del citoesqueleto y la pérdida de las fibras de actina de células HEP-2 y HT29.

Sin embargo, los efectos de Pet no son inhibidos por fármacos que alteran el citoesqueleto (colchicina, taxol, citocalasina D y palacidina), los efectos son dependientes de la actividad de serina proteasa. Cuando se muta la toxina en el dominio de serina proteasa, pierde actividad de proteasa y no produce efectos citopáticos, daños en el citoesqueleto o efecto enterotóxico. Esta toxina produce lesiones en modelos de asa ligada de íleon de rata con una severa respuesta inflamatoria aguda con un marcado acortamiento de las microvellosidades en las asas, las lesiones producidas por esta

proteína en rata son muy similares en las encontradas en el intestino de niños infectados con *E. coli* enteroagregativa y es reconocida por el suero de pacientes infectados con EAEC (Referido por Eslava et al., 1993).

La toxina Pet produce degradación de las cadenas α y β espectrina de los eritrocitos, esta degradación es dependiente de la dosis y del tiempo. Estos mismos efectos son observados en cadenas α -fodrina de células epiteliales HEp-2. Una proteína de 120 kD es obtenida como subproducto de la degradación (Villaseca et al., 2000).

La patogénesis de la infección por EAEC no está bien caracterizada. La utilización de algunos modelos *in vitro* e *in vivo* han permitido reconocer algunas características de este fenómeno tales como la formación de una gruesa capa de moco en el epitelio de la mucosa intestinal y la formación de un biofilm (Tzipori et al., 1992 y Hicks et al., 1996).

Vial et al (1988) demostraron, usando modelos de asa ligada de rata y de conejo inoculadas con EAEC, la producción de lesiones caracterizadas por el acortamiento y la necrosis hemorrágica de las microvellosidades acompañada de una respuesta inflamatoria leve de la submucosa, con edema e infiltración de mononucleares.

Empleando modelos animales, Sainz et al (2002) reportaron la presencia de alteraciones histológicas en el colon e íleon de ratones BALB/c inoculados con la cepa 042 de EAEC; observaron asimismo la hipersecreción de moco y un aumento significativo de las células caliciformes. También reportan agregados bacterianos en la superficie apical de las células del epitelio intestinal y la presencia de edema en la submucosa. En lavados intestinales obtenidos de animales infectados demostraron la presencia de anticuerpos IgA contra la toxina Pet; adicionalmente, detectaron anticuerpos IgG contra dicha toxina en el suero de los animales infectados.

Mecanismos de defensa del hospedero contra la infección por enterobacterias

El tracto gastrointestinal contiene numerosas células efectoras y reguladoras de origen linfoide y mieloide, que desempeñan un papel importante en la defensa del huésped contra infecciones entéricas. La función de estas células está cuidadosamente regulada para prevenir el daño que pudiese originar la respuesta inmune en contra de macromoléculas provenientes de la dieta y por productos de la flora normal. Los patógenos entéricos evaden los mecanismos de defensa del huésped con estrategias

tales como el ataque a los enterocitos, la invasión de la mucosa o la producción de toxinas, ocasionando una rápida respuesta inflamatoria (Malstrom et al., 1998).

La inmunidad se define como el estado de protección del organismo contra las enfermedades infecciosas y puede ser de componentes de baja especificidad y alta especificidad. Los componentes de baja especificidad comprenden a la inmunidad innata que provee la primera línea de defensa contra la infección; existen otros componentes de la inmunidad innata que se presentan antes del comienzo de la infección y constituye un tipo de mecanismo de resistencia a la enfermedad, no específica. Dentro de la inmunidad innata se encuentran las células fagocíticas, tales como macrófagos y neutrófilos, barreras tales como piel y una variedad de compuestos antimicrobianos sintetizados por el huésped (respuesta efectora). En contraste los componentes de alta especificidad están comprendidos por la inmunidad adaptativa, que posee cuatro atributos característicos: 1) Especificidad antigénica 2) diversidad, 3) memoria inmunológica y 4) reconocimiento de lo propio y lo no propio; esta inmunidad aparece dentro de los cinco o seis días después de la exposición al antígeno (Abbas, 2003).

Los linfocitos median los atributos de especificidad, diversidad, memoria y reconocimiento de lo propio y lo no propio. El sistema inmune adaptativo requiere cooperación entre linfocitos y células presentadoras de antígeno como son: macrófagos, linfocitos B, células de Langerhans y células dendríticas (Abbas, 2003).

Las células del sistema inmunitario se forman a partir de las células madre pluripotenciales, mediante dos vías de diferenciación:

La estirpe mieloide está constituida por monocitos, macrófagos y neutrofilos entre otros.

Las dos clases principales de linfocitos son las células T y las células B. Las células T se desarrollan a partir de sus precursores en el timo, mientras que las células B de los mamíferos se diferencian en el hígado fetal y en la médula ósea de los adultos (en las aves se diferencian en la bolsa de Fabricio).

Los linfocitos se producen en los órganos linfoides centrales o primarios (timo, y médula ósea de los adultos), algunas de estas células migran hasta los órganos linfoides secundarios (bazo; ganglios linfáticos; amígdalas; y tejido linfoide asociado a mucosas, MALT).

Hay dos subpoblaciones de linfocitos T: las células T cooperadoras y las células T citotóxicas es decir $CD4^+$ y $CD8^+$ respectivamente. El mejor marcador de las líneas celulares T es el receptor de las células T (TCR). Se conocen dos tipos de TCR: TCR-1 y TCR-2. TCR-1 es un heterodímero compuesto por dos polipéptidos γ y δ unido por un puente disulfuro (ver Fig. 1). TCR-2 es un heterodímero compuesto por dos polipéptidos α y β unidos por un puente disulfuro, ambos receptores se encuentran asociados con un conjunto de cinco polipéptidos; el complejo $CD3^+$ que incluyen miembros de la superfamilia de las Ig de alta homología llamados γ , δ , ϵ , además del 80 al 90 por 100 de los complejos contienen un homodímero unido por puentes disulfuro de una proteína denominada cadena ζ que no pertenece a la superfamilia de genes de las Ig. El 10 por 100 restantes de células T humanas expresan heterodímeros que constan de cadena ζ y expresan la cadena γ del $Fc\epsilon R1$ de alta homología; que conforman el complejo receptor de las células T (Kuby, 2003 y Abbas, 2003).

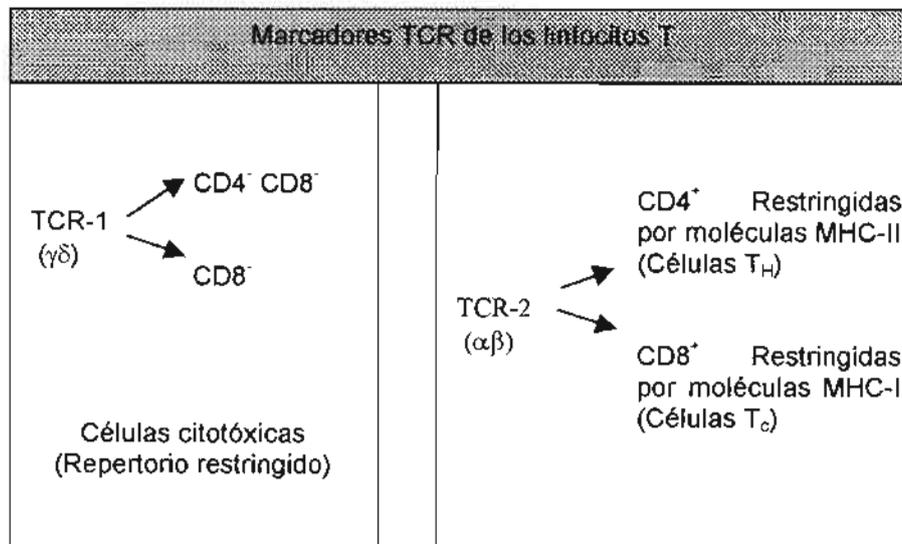


Fig. 1 Las subpoblaciones TCR-1 en células sanguíneas humanas representan <10% y las TCR-2⁺ >90%. MHC= Complejo principal de histocompatibilidad (Kuby, 2003 y Abbas, 2003).

Los linfocitos TCR-2 $CD4^+$ también se pueden clasificar de acuerdo a su patrón de secreción de citocinas de diferentes clonas de células Th (linfocitos T cooperadores). Se describen dos tipos de clonas de células T $CD4^+$. La subpoblación Th-1 secreta IL-2, IFN- γ y TNF- α ; la subpoblación Th-2 secreta IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Las células Th-1 llevan a

cabo funciones relacionadas con citotoxicidad y reacciones inflamatorias locales, en consecuencia estas células son importantes en la lucha contra los patógenos intracelulares (virus, bacterias y parásitos). Las células Th-2 estimulan con mayor eficiencia las células B para que proliferen y produzcan anticuerpos (ver Figura 2).

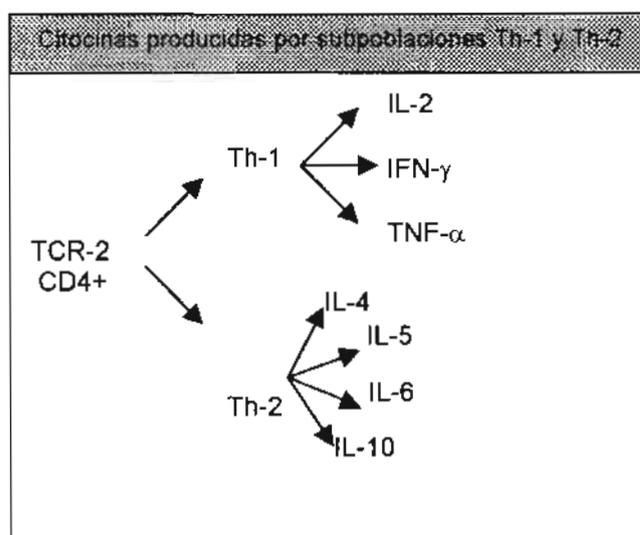


Fig. 2 Subpoblaciones celulares TCR-2 se pueden dividir en células Th-1 y Th-2 de acuerdo a las citocinas que producen (Kuby, 2003 y Abbas, 2003).

Existe una tercera población de linfocitos que no expresan receptores de antígeno y que se denominan células asesinas naturales (Natural Killer, NK). Descubiertas en 1975. Constituyen el 15% de los linfocitos sanguíneos. Las células NK precursoras linfoides de la médula ósea, son derivadas de células hematopoyéticas, son consideradas células efectoras de la inmunidad innata, actúan como primera línea de defensa antes de desarrollar inmunidad adaptativa por linfocitos B y T. Se caracterizan por su morfología, son linfocitos granulados grandes (LGG), presentan una mayor cantidad de gránulos azurófilos que las células granuladas T. Una forma precursora de las células NK son las denominadas NKPs.

Bajo condiciones normales las células NK están principalmente confinadas a sangre periférica, bazo y médula ósea, pero pueden emigrar al tejido inflamado en respuesta a diferentes sustancias quimiotractivas (Kuby, 2003 y Abbas, 2003).

El desarrollo de una respuesta inmune efectiva involucra células linfoides, células inflamatorias y células hematopoyéticas. La compleja interacción entre estas células es mediada por un grupo de proteínas designadas como citocinas que son secretadas por células de la inmunidad innata e inmunidad adaptativa y que denotan su papel en la comunicación celular es decir, median muchas de las funciones celulares.

Las citocinas se definen como polipéptidos de bajo peso molecular o glicoproteínas que regulan numerosas funciones celulares y permiten señales autocrinas paracrinas y endocrinas. Las citocinas son producidas en respuesta a microbios y otros antígenos, diferentes citocinas estimulan diversas respuestas de células que participan en la inmunidad e inflamación. Las citocinas regulan muchas rutas que intervienen en la respuesta inflamatoria del huésped en sepsis. La influencia en la diferenciación celular, proliferación y activación y en las respuestas proinflamatorias y anti-inflamatorias, permite al huésped reaccionar apropiadamente contra los patógenos (Kuby, 2003) .

Una citocina particular puede unirse a receptores de la membrana de la misma célula que la secreta, acción llamada autocrina; puede unirse a receptores de células blanco cercanas a las células que la producen, acción llamada paracrina; en pocos casos también puede unirse a receptores de células blanco en lugares distantes del cuerpo, acción llamada endocrina. Las citocinas regulan la intensidad y duración de la respuesta inmune por estimulación o inhibición de la activación, proliferación, y/o diferenciación de varias células y por la regulación de la secreción de anticuerpos u otras citocinas (ver Tabla I). Las citocinas poseen atributos tales como: ser pleiotropicas (una citocina da diferentes efectos biológicos en diferentes células blanco), ser redundantes (dos o más citocinas que median funciones similares), presentar sinergismo (combinación de efectos de dos citocinas en cual se ve incrementada la actividad celular), presentar antagonismo (los efectos de una citocina inhiben o contrarrestan los efectos de otra) y efecto de cascada (cuando la acción de una citocina en una célula blanco induce que se produzca otra o más citocinas, y éstas inducen a otras células blanco a producir otras) lo cual permite que ellas regulen la actividad celular de una forma coordinada e interactiva (Kuby, 2003 y Abbas, 2003).

Desde el punto de vista de su participación en mecanismos de daño tisular, las citocinas que participan en la inmunidad natural conducen a las células efectoras de la inflamación, a reaccionar en forma inespecífica en respuesta hacia un antígeno, con participación

mínima o nula de anticuerpos específicos. Las células T que producen este tipo de respuestas, se conocen como células T del tipo Th-1, y se distinguen de la tipo Th-2 porque estas últimas producen primordialmente las citocinas en las que participan los anticuerpos como los principales protagonistas. En el caso de una respuesta inmunológica se activan ambos tipos de células pero tiende a existir predominio de una de las dos formas de respuesta, ya que uno y otro tipo de células producen citocinas que mutuamente pueden inhibir sus funciones (citocinas tipo Th1 como el IFN- γ inhibe la producción de la IL-10 citocina Th-2 y viceversa). Cuando se pierde el balance entre la actividad de uno y otro tipo de células, estos circuitos inhibitorios determinan que exista predominio franco de uno de los dos tipos de respuesta.

Tabla I. Ejemplos de citocinas de la inmunidad innata e inmunidad adaptativa.

| Citocina | Tamaño | Fuente celular | Células Blanco y efectos |
|--|--|---|---|
| Interferón- γ (IFN- γ) | Subunidades de 50 kDa (glicosilado) Homodímero de 21-24 kDa | Células Th-1; células CD8 ⁺ ; células NK | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Activación de macrófagos. ➤ Aumenta expresión de MHC-I y MHC-II; ➤ Aumenta la presentación de antígeno ➤ Diferenciación de células T y B |
| Factor de Necrosis Tumoral - α (TNF- α) | 17 kD; secretado como Homotrímero de 51 kDa | Macrófagos células T | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Activa células endoteliales: inflamación y coagulación ➤ Activa neutrófilos; ➤ Hipotálamo: fiebre ➤ Hígado: síntesis de proteína de fase aguda ➤ Músculo, grasa: catabolismo ➤ Varios tipos celulares: apoptosis |
| Interleucina 10 (IL10) | Homodímero de 34-40 kDa o subunidades de 18 kDa | Macrófagos células T TH ₂ | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Macrófagos: inhibición de producción de IL-12, ➤ expresión de coestimuladores y moléculas MHC-II ➤ Células B: proliferación ➤ Control en la homeóstasis ➤ Proliferación de células T |
| Interleucina 5 (IL5) | Homodímero de 45-50 kDa o subunidades de 20 kDa | Células TH ₂ | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Preactivación de células T, ➤ activación de eosinófilos |
| Interleucina 4 (IL4) | 18 kDa | Células TH ₂ Células madre | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Células T: diferenciación Th-2, ➤ proliferación y preactivación de células T ➤ Células B: Cambio de Isotipo IgE |
| Interleucina 2 (IL2) | 14-17 kDa | Células T | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Células T: activación, proliferación, incremento en la síntesis de citocinas; aumento potencial en apoptosis ➤ Células NK: proliferación y activación ➤ Células B: proliferación y síntesis de anticuerpos |

Abreviaturas: kDa, kilodaltones; MHC, Complejo Principal de Histocompatibilidad; IgE, Inmunoglobulina E; NK, Natural Killer

Para estudiar la participación de la respuesta inmune en infecciones por *E. coli* es importante considerar que el tracto gastrointestinal contiene numerosas células efectoras y reguladoras de origen linfoide y mieloide, que desempeñan un papel importante en la defensa del huésped contra infecciones entéricas. La función de estas células está cuidadosamente regulada para prevenir el daño que pudiese originar la respuesta inmune en contra de macromoléculas provenientes de la dieta y por productos de la flora normal.

El balance entre la función de defensa del huésped y la tolerancia inmunológica en el sistema inmune del intestino es regulado por la producción de citocinas reguladoras de estos tejidos inmunes asociados a mucosa (MALT) (McDermott, 1994). La aparición de inflamación en enfermedades gastrointestinales de animales deficientes de citocinas como la interleucina-10, el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) y la interleucina-2 (Kuhn et al., 1993; Kulkarni et al., 1993 y Sadlack et al., 1993) sugiere la participación de éstas en la conservación de dicho balance.

El tracto gastrointestinal se encuentra revestido por las mucosas que constituyen una de las barreras anatómicas que separan el interior del organismo del medio externo y por ello, interaccionan continuamente con infinidad de agentes exógenos (Mcl. Mowat, A. et al., 1997); como resultado de la constante presión ejercida por la fuerte carga antigénica exógena (Brandtzaeg, P., 1998) el MALT (Kraehenbuhl et al., 1992) cuenta con dos mecanismos de defensa que participan en la homeostasis inmunitaria como son la tolerancia y la exclusión inmune, cuya regulación permite la disminución o la inducción respectivamente (Brandtzaeg, P., 1998) de la respuesta inmune del MALT.

En un estudio realizado con diferentes cepas de *E. coli* (enteropatogénica y enterohemorrágica) demostraron que la bacteria completa y/o el lisado de éstas inhiben selectivamente la expresión de citocinas (IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- γ) de linfocitos de sangre periférica estimuladas con mitógenos (Klapproth et al., 1995).

En estudios posteriores se han identificado productos derivados de EPEC que inhiben la producción de citocinas por linfocitos de la lámina propia en humanos, lo que sugiere que ciertos productos bacterianos alteran la homeostasis inmune el tracto gastrointestinal a través de la inhibición de la producción de citocinas regulatorias que podrían contribuir a la patogénesis bacteriana (Klapproth et al., 1995 y Malstrom et al., 1998).

Posteriormente se han hecho estudios en poblaciones murinas en donde se demuestra la inhibición de la producción de IL-2, IL-4 e IFN- γ , sin embargo, la producción de IL-10 aumentó. Además se logró evidenciar que el mecanismo de inhibición no es consecuencia de la apoptosis ni de efectos secundarios de IL-10 ni de TGF- β (Malstrom et al., 1998).

Para poder evaluar la producción de citocinas intracelulares o en sobrenadantes de linfocitos estimulados con diferentes sustancias o productos bacterianos o inclusive bacterias completas como la *E. coli*, se cuenta con una nueva metodología que ha sido de gran utilidad que es la citometría de flujo (Suni et al., 1998; Nomura et al., 2000 y Wilco de Jager et al., 2003).

Método para evaluar la respuesta inmune

La citometría de flujo es un método cuantitativo que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido que producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz (Shapiro, 2003 y Longobardi, 1992). El citómetro de flujo mide el tamaño celular relativo, la complejidad celular relativa o granularidad y la intensidad de fluorescencia relativa, agrupando las células en poblaciones bien definidas.

El citómetro de flujo consta de tres sistemas: el fluidoico, el óptico y el electrónico.

El sistema fluidoico transporta partículas en una corriente del rayo del láser. El sistema óptico consiste de láseres que iluminan las partículas en la corriente de la muestra y filtros ópticos que dirigen las señales luminosas resultantes a los detectores apropiados. El sistema electrónico convierte las señales luminosas detectadas en señales electrónicas que pueden ser procesadas por la computadora.

Cualquier partícula o célula entre 0.2-150 micrómetros es apropiado para el análisis por citometría de flujo (ver Fig.3).

La luz es desviada cuando incide en una partícula. La cantidad de luz desviada depende de las propiedades físicas de la partícula, principalmente su tamaño y densidad.

La luz desviada en un ángulo de 0.5° a 5° con respecto al eje del rayo del láser es denominada: luz con desviación frontal (Forward scatter, FSC). Un segundo tipo de luz desviada es colectada en un ángulo de 90° con respecto al eje del rayo del láser es denominada: luz con desviación lateral (Side scatter, SSC). Los linfocitos, monocitos y

granulocitos pueden ser separados y reconocidos claramente por sus características de tamaño (SSC) y granularidad (FSC) (Shapiro, 2003 y Longobardi,1992).

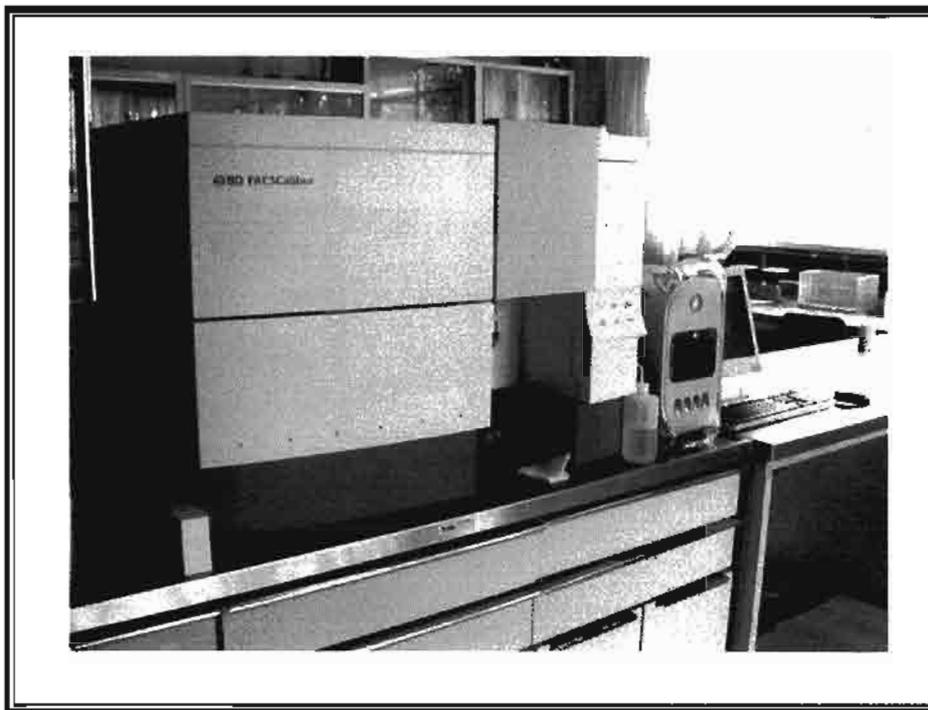


Fig. 3 Citómetro de flujo BD FACSCalibur consta de dos rayos láser que tienen la capacidad de detectar cuatro fluorocromos.

Los fluorocromos más comúnmente usados en citometría deben ser excitables, esto es absorber a 488 nm, ya que esta es la longitud de onda de los láser de Argón. El isotiocianato de fluoresceína (FITC) es el fluorocromo más utilizado en la actualidad, su espectro de absorción es a una longitud de 488 nm. Como a 488 nm se obtiene una alta excitación, a esta longitud de onda se obtiene una alta emisión. Es posible utilizar más de un fluorocromo simultáneamente si ambos pueden ser excitados a 488 nm y si las longitudes de onda en su máximo de emisión no están muy cercanas entre ellas. La combinación de FITC y ficoeritrina (PE) reúne las características mencionadas. En la actualidad existen citómetros de flujo que detectan doce o más fluorocromos distintos simultáneamente (Shapiro, 2003 y Longobardi,1992).

La mayoría de las células fluorescen a un bajo nivel (530 nm para FITC y 570 nm para PE) cuando son iluminadas por la luz del láser. Ello se debe a que los constituyentes celulares son capaces de absorber energía de la luz del láser y la liberan en forma de

fluorescencia. Esto es denominado autofluorescencia, por que no se requiere agregar ningún colorante fluorescente a la célula. Los fijadores como glutaraldehído y formaldehído emiten fluorescencia en un muy amplio espectro de emisión, de manera no específica. Por lo anterior se debe tener en cuenta cuando se selecciona un agente fijador para células que se analizarán mediante citometría de flujo, especialmente no es conveniente utilizar concentraciones altas (Shapiro, 2003 y Longobardi,1992).

Los citómetros en general detectan tres tipos de señales: FSC, SSC y fluorescencia. Cualquiera de estos parámetros puede ser utilizado para crear una ventana o región electrónica. Esto permite que se separen diferentes subpoblaciones de una mezcla de varias poblaciones, de tal manera que los subsecuentes análisis podrán realizarse exclusivamente de la subpoblación dentro de la ventana (ver Fig. 4; Shapiro, 2003 y Longobardi,1992).

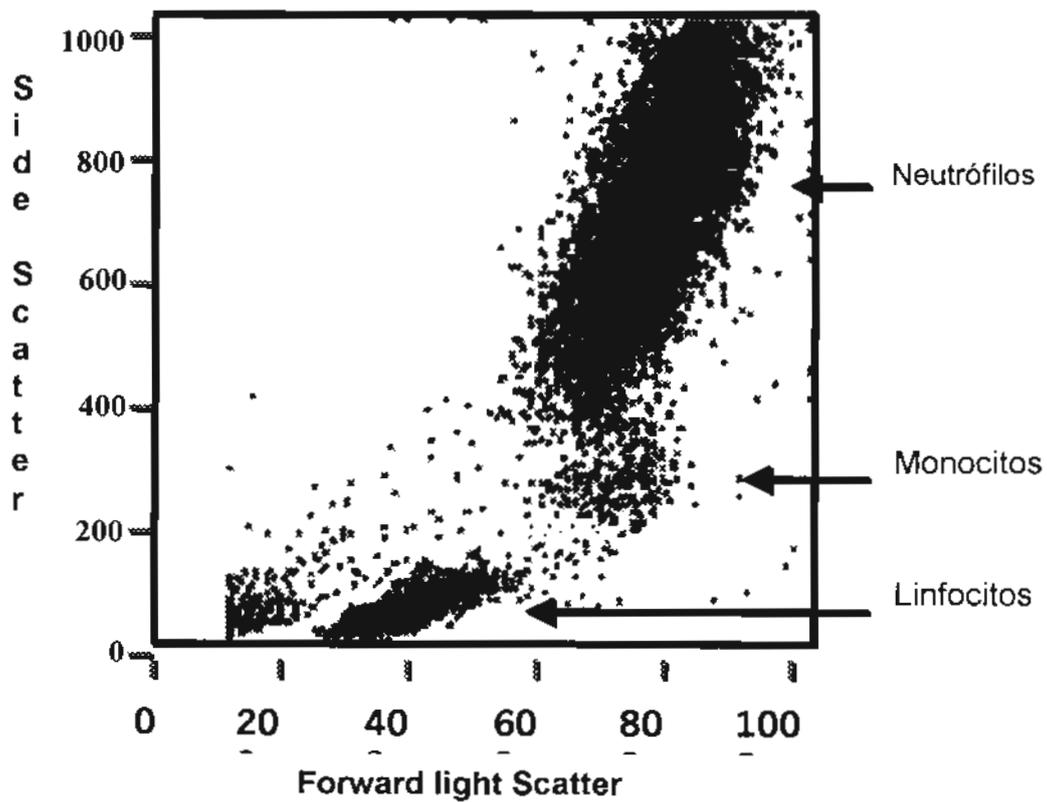


Fig. 4 Gráfica de puntos del citómetro de flujo donde se muestra la ubicación de las poblaciones celulares de neutrófilos, monocitos y linfocitos (cada punto representa una célula).

Actualmente el citómetro de flujo tiene varias aplicaciones clínicas entre ellas destacan: Inmunofenotipo de linfocitos CD3,CD4,CD8 (Para control de SIDA); inmunofenotipo de linfocitos T, B y NK; enumeración de reticulocitos; cuantificación de células CD34+ (Transplantes); tipificación de leucemias; análisis de ciclo celular (DNA) tumores y cáncer; tipificación de linfomas y mielomas; detección de glóbulos blancos residuales en productos sanguíneos (glóbulos rojos y plaquetas) y activación de plaquetas (Shapiro, 2003 y Longobardi,1992).

Según Shapiro (2003) y Longobardi (1992) el citómetro de flujo también tiene aplicación en la investigación de: inmunofenotipo de linfocitos, proliferación celular, identificación de citocinas, activación celular, análisis de ciclo celular, identificación de otro tipo de moléculas de superficie e intracelulares, apoptosis, flujo de calcio y ph intracelular.

Hoy en día es factible adquirir estuches comerciales como Cytometric Bead Array (CBA) BD PharMingen que permite cuantificar detectar simultáneamente IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ (Th-1/Th-2) en una misma muestra con una sensibilidad de 20 pg/mL-5000 pg/mL, otras ventajas que ofrece esta metodología son: el requerir menos volumen de muestra que el ELISA convencional, menor tiempo en la determinación y sensibilidad similar a la del ELISA convencional. Permite hacer determinaciones en cultivos de tejido, sobrenadantes, plasma con EDTA y suero (de acuerdo a las especificaciones del instructivo del estuche comercial CBA, BD PharMingen y Carson et al., 1999).

El principio del CBA es el uso de perlas con diferentes intensidades de fluorescencia las cuales están cubiertas con los anticuerpos específicos para: IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ (el primero corresponde al más brillante y el último al menos brillante). Se procede hacer una mezcla de las seis poblaciones de perlas de las diferentes citocinas, para formar una suspensión que permita la detección de múltiples analitos solubles en un pequeño volumen de muestra. El sistema CBA, BD amplifica la fluorescencia de analitos solubles y por último son leídas en el canal FL3 del citómetro de flujo marca BD FACS™. Las perlas cubiertas con los anticuerpos de las citocinas son unidas con el fluorocromo PE (ficoeritrina), se incuban con estándares recombinantes o muestras de prueba para formar un complejo. Las perlas se adquieren en el citómetro de flujo y los resultados son graficados, se utiliza un Software de análisis CBA BD (ver Fig. 5).

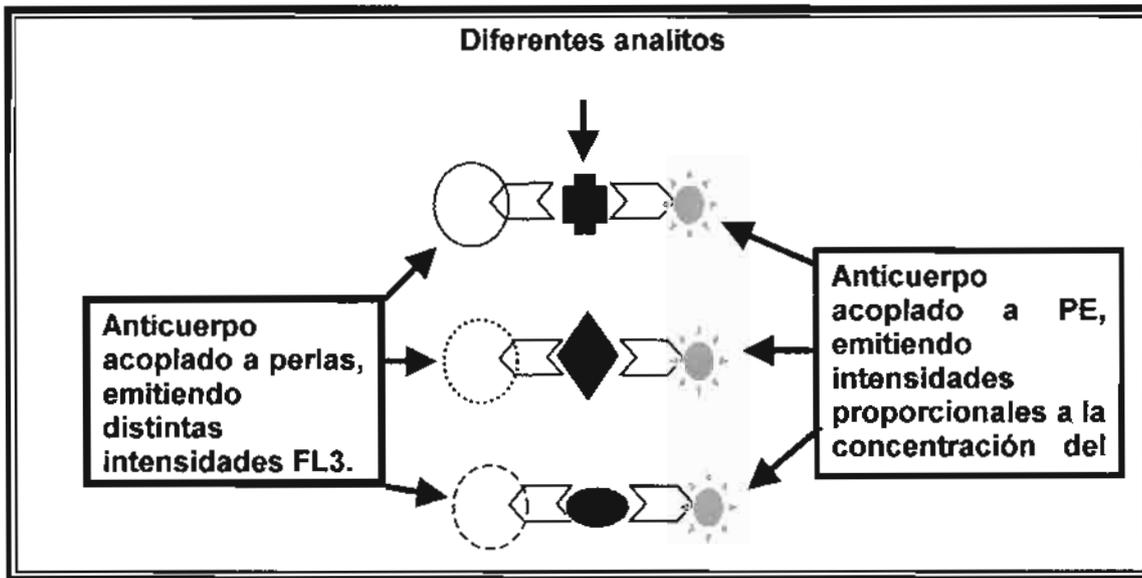


Fig. 5 Muestra las perlas acopladas a los anticuerpos y a los fluorocromos y éstos a su vez al analito.

Las ventajas atribuidas a este sistema son las siguientes:

1. Requiere un volumen de muestra de 1 a 6 veces menor que la cantidad necesaria para el ELISA convencional debida a la detección de seis analitos en una sola muestra.
2. Un solo grupo de estándares diluidos es utilizado para generar una curva estándar para cada analito.
3. No es necesario replicar muestras para cada perla, un evento adquirido es considerado una prueba replicada.
4. Los experimentos en el CBA toman menor tiempo que en una sola prueba de ELISA y provee resultados que podrían requerir normalmente seis ELISAs convencionales (de acuerdo a las especificaciones del instructivo del estuche comercial CBA, BD PharMingen y Carson et al., 1999).

HIPÓTESIS

Pet toxina de EAEC activa la secreción de citocinas Th-2 (IL-4, IL5 e IL-10) en PBMC de individuos sin cuadro clínico de diarrea.

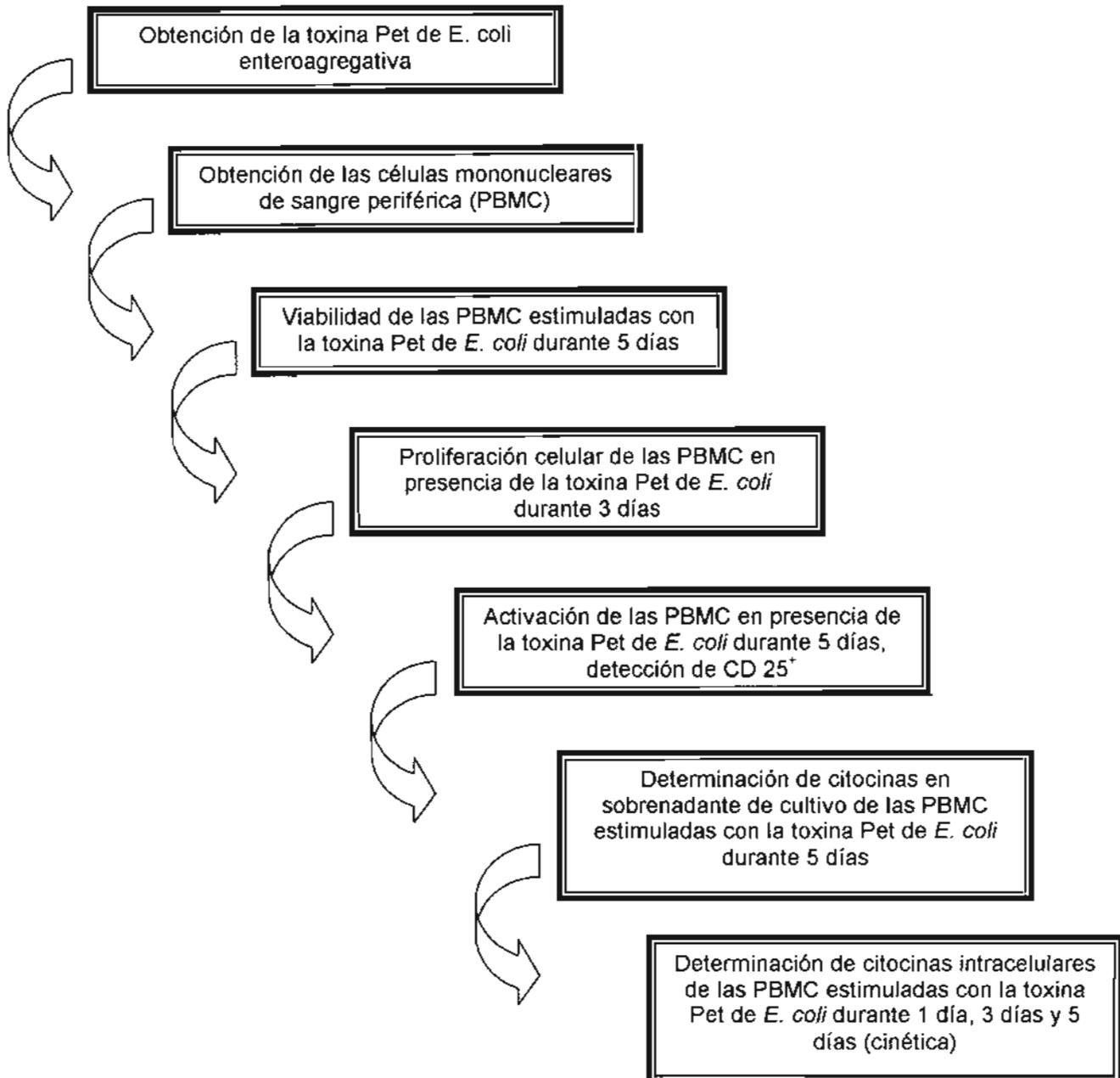
OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos de la toxina Pet de EAEC sobre la proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y la secreción de IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-5, IL-4 e IL-2 (Th-1-Th-2).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Valorar la proliferación de PBMC de voluntarios sanos en respuesta a la estimulación con la toxina Pet de *E. coli* enteroagregativa.
2. Evaluar la expresión de citocinas; IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-5, IL-4 e IL-2 en sobrenadante de PBMC de voluntarios sanos en respuesta a la estimulación con Pet de *E. coli* enteroagregativa.
3. Evaluar la expresión de citocinas intracelulares; IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 de PBMC de voluntarios sanos en respuesta a la estimulación con Pet de *E. coli* enteroagregativa.

Diagrama de flujo de las actividades durante la etapa experimental.



Valoración de la proliferación de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

La cepa pCEFNI (*E. coli* HB101) hiperproductora de Pet resistente a ampicilina (50 µg/mL) fue proporcionada por el Dr. Carlos Alberto Eslava Campos del Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para obtener la toxina Pet de *E. coli*. Se utilizó el procedimiento descrito por Villaseca et al. (2000). Se preparó un preinóculo de la bacteria que se creció en caldo Luria Bertani pH 7.2 durante 18 h a 37 °C, de este se agregaron 200 µL a matraces Erlenmeyer de 500 mL con 200 mL de caldo Luria Bertani pH 7.2 adicionado con ampicilina 50 µg/mL, se incubó de 18 a 24 h a 37 °C con agitación. El cultivo bacteriano se centrifugó a 12000 x g por 20 min. a 4 °C y se descartó el paquete bacteriano. Se precipitó el sobrenadante a 4 °C con sulfato de amonio sólido hasta alcanzar una saturación del 75%, se agregó lentamente con agitación suave durante 2 h y se dejó toda la noche en reposo a 4 °C. El precipitado se recuperó por centrifugación a 12000 x g por 30 min. a 4 °C. El precipitado se resuspendió y se dializó contra una solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.07 M pH 8.2 a 4 °C por tres días con dos cambios de 4 L de la solución amortiguadora de fosfatos por día. Posteriormente la diálisis se eluyó en una columna de Q-sefarosa y después se sometió a cromatografía de líquidos (FPLC) columna mono S HR 5/5. Se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford y se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% para evaluar la pureza de la proteína.

Para estimular células mononucleares se procedió a obtener 20 mL de sangre periférica de varios donadores sanos. Las PBMC se extrajeron con una jeringa humedecida con heparina. La sangre se diluyó con dos volúmenes de PBS (20 mL de sangre y 40 mL de PBS). Se colocaron 3 mL de Ficoll-Paque™ PLUS (Gibco, BRL densidad 1.077) en 10 tubos cónicos de 15 mL y se adicionaron 6 mL de sangre diluida y se centrifugaron a temperatura ambiente a 300 x g por 30 min. (sin freno). Con la ayuda de una pipeta Pasteur se aspiraron los linfocitos de la interfase (entre Ficoll y plasma), se colocaron en tubos Falcon de 50 mL y se adicionó PBS hasta llenar el tubo y se centrifugó a 514 x g por 10 min. a 4 °C (para eliminar el Ficoll). Se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células nuevamente en PBS hasta llenar el tubo Falcon y se centrifugó a 514 x g por 10 min. a 4 °C, se decantó el sobrenadante, se agregaron 2 mL de medio

RPMI-1640 incompleto. La viabilidad se determinó con azul de tripano 0.4% de la siguiente manera, en un tubo eppendorf de 1.5 mL se agregaron 90 μ L de una solución de azul tripano al 0.4% y 10 μ L de la suspensión de células mononucleares.

Se colocaron 10 μ L de la suspensión anterior en una cámara de Neubauer y se procedió a contar las células. Las células teñidas de azul son células muertas y las no teñidas son células vivas ya que no dejan penetrar el colorante (Coligan et al., 1992).

Antes de llevar a cabo la proliferación celular se verificó si existía efecto tóxico de Pet sobre PBMC. Para esto se colocaron en placas de cultivo de 12X8 pozos por sextuplicado 2×10^5 células en 200 μ L de medio RPMI-1640 por pozo y se estimularon con la toxina Pet a diferentes concentraciones; 1.25, 2.50, 10.00, 20.00, 50.00 μ g/mL y se destinaron tres pozos con PBMC únicamente (sin estímulo), como testigo negativo. Medio RPMI-1640 completo (aminoácidos esenciales 0.1 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, suero fetal bovino al 10%, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, HEPES 20 mM y antibiótico-antimicótico: 10.000 unidades/mL de penicilina G de sodio, 10.000 μ g/mL de sulfato de estreptomina y 25 μ g/mL de anfotericina B como fungicida). Las células se mantuvieron a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5%, durante 5 días. Cada 24 h las células recuperadas, se lavaron con RPMI-1640 incompleto y se centrifugaron a 400 x g a 4 °C durante 10 min. y se procedió a contar con azul tripano al 0.4% en la cámara de Neubauer como se describió anteriormente; se contaron células totales vivas y muertas (Coligan et al., 1992).

Para evaluar el grado de proliferación de las células mononucleares de sangre periférica en presencia de la toxina Pet; se colocaron por triplicado 2×10^5 células en 200 μ L de medio RPMI-1640 completo por pozo y se estimularon con Pet a diferentes concentraciones; 1.25, 2.50, 5.00, 10.00, 20.00, 50.00 μ g/mL; con fitohemaglutinina (mitógeno, PHA) 10 μ g/mL, como testigo positivo y se destinaron tres pozos con PBMC únicamente (sin estímulo), como testigo negativo. Medio RPMI-1640 completo (aminoácidos esenciales 0.1 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, suero fetal bovino al 10%, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1mM, HEPES 20mM y antibiótico-antimicótico: 10.000 unidades/mL de penicilina G de sodio, 10.000 μ g/mL de sulfato de estreptomina y 25 μ g/mL de anfotericina B como fungicida). Las células se mantuvieron a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5%. Para medir la estimulación las células se marcaron a

las 48 h con 3H timidina (3HTdr) 81 mCi/pozo (5 Ci/mmol, Amersham y se cosecharon 24 h después sobre filtros de fibra de vidrio. La radioactividad incorporada se midió en un contador de centelleo (Minaxi β , Tri Carb $\text{\textcircled{R}}$, 4000 series, United Technologies Packard). Los resultados obtenidos se expresaron como el índice de estimulación, que se define como: conteo geométrico por minuto de las células estimuladas con el antígeno (Pet) o mitógeno dividido entre el conteo geométrico por minuto de células testigo no estimuladas (Coligan et al., 1992).

Evaluación de la expresión de citocinas extracelulares

Para evaluar la expresión de citocinas extracelulares se colocaron en placas de cultivo de 12X8 pozos por triplicado 2×10^5 células en 200 μL de medio RPMI-1640 completo por pozo y se estimularon con la toxina Pet a diferentes concentraciones: 1.25, 2.50, 5.00, 10.00, 20.00, 50.00, 100.00 $\mu\text{g/mL}$ y se destinaron tres pozos con PBMC sin estímulo, como testigo negativo. Medio RPMI-1640 completo (aminoácidos esenciales 0.1 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, suero fetal bovino al 10%, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, HEPES 20 mM y antibiótico-antimicótico: 10.000 unidades/mL de penicilina G de sodio, 10.000 $\mu\text{g/mL}$ de sulfato de estreptomina y 25 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B como fungicida). Las células se mantuvieron a 37 °C en atmósfera de CO_2 al 5 %, durante 5 días. Al finalizar el tiempo de estimulación se recuperaron las células cada tres pozos por tubo, se centrifugó a 400 x g a 4 °C durante 10 min. para recuperar el sobrenadante.

Para determinar la concentración de citocinas humanas se elaboró una curva estándar para cada una de las citocinas a diferentes concentraciones (20, 40, 80, 156, 312, 625, 1250, 2500, 5000 pg/mL). La curva estándar permitió interpolar las intensidades de fluorescencia de las muestras y de esta manera saber la concentración de citocinas en el sobrenadante. Al sobrenadante del cultivo se le agregó un sistema de anticuerpos marcados con fluorocromos (perlas) con diferentes intensidades de fluorescencia (más brillante---IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α , e IFN- γ --- menos brillante). Los anticuerpos se unieron a las citocinas encontradas en el sobrenadante y emitieron diferentes intensidades de fluorescencia proporcional a la concentración del analito; de esta manera se determinaron cualitativamente y cuantitativamente. Se utilizó un testigo positivo α -

CD3⁺CD28⁺ 5 µg/mL y 10 µg/mL respectivamente que simula la activación de linfocitos T *in vivo* (de acuerdo a las especificaciones del instructivo del estuche comercial CBA, BD PharMingen; Carson et al., 1999 y Wilco de Jager et al., 2003).

Las muestras se adquirieron y analizaron en un citómetro de flujo (BD FACSCalibur) con el software Cell Quest versión 3.3; se ubicó la población de linfocitos y se abrió una ventana en el gráfico de puntos FSC (luz con desviación frontal) contra SSC (luz con desviación lateral) la adquisición se realizó a 10 000 eventos. Los resultados se expresan en pg/mL y se realizó por duplicado.

Evaluación de la expresión de citocinas intracelulares

Identificación de citocinas intracelulares de las PBMC estimuladas con la toxina Pet de *Escherichia coli* enteroagregativa. Se colocaron en placas de cultivo de 6X4 pozos por octuplicado 2×10^6 células en 1000 µL de medio RPMI completo por pozo y se estimularon con la toxina Pet a diferentes concentraciones; 1.00, 10.00, 100.00 µg/mL. Medio RPMI-1640 completo (aminoácidos esenciales 0.1 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, suero fetal bovino al 10%, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, HEPES 20 mM y antibiótico-antimicótico: 10.000 unidades/mL de penicilina G de sodio, 10.000 µg/mL de sulfato de estreptomina y 25 µg/mL de anfotericina B como fungicida). Las células se mantuvieron a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5 %, durante 1, 3 y 5 días para todas las concentraciones de la toxina Pet con el propósito de realizar una cinética y poder determinar la concentración de citocinas IL-2 FITC, 20 µL/10⁶ células; IL-4 PE, 20 µL/10⁶ células; IL-10 PE, 16 µL/10⁶ células e IFN-γ FITC, 20 µL/10⁶ células; a diferentes tiempos. Al finalizar el tiempo de estimulación se les agregó brefeldina (la cual inhibe el transporte de citocinas del aparato de Golgi a la membrana de la célula), 10 µg/mL por cada 2.5×10^6 células por 4 h; para concentrar las citocinas y poder detectarlas a niveles de concentración más elevados.

Para poder identificar el tipo celular que sintetiza la citocina primero se realizó una inmunotinción de las proteínas de superficie y posteriormente se realizó la inmunotinción de las citocinas intracelulares junto con sus testigos positivos .

Marcaje de las proteínas de superficie

Se resuspendieron las células de tal manera que en cada tubo eppendorf de 1.5 mL quedaran 500 000 células, se bloquearon con IgG humana para evitar pegado inespecífico y se marcaron con los siguientes anticuerpos monoclonales: CD8⁺ FITC, 20 $\mu\text{L}/10^6$ células; CD3⁺ PE, 20 $\mu\text{L}/10^6$ células; CD4⁺ PerCP; CD69⁺ APC (Alofococianida), 20 $\mu\text{L}/10^6$ células. Se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron con paraformaldheido al 1%. Los anticuerpos CD3⁺ se utilizaron para identificar los linfocitos T, los CD4⁺ para identificar las células cooperadoras, los CD8⁺ para identificar las células citotóxicas y el CD69⁺ (receptor temprano de activación de linfocitos T que se expresa dentro de las primeras 24 h de estimulación; ver tabla II).

Marcaje intracelular de las citocinas

A los tubos eppendorf de 1.5 mL que contienen las células que se destinaron para marcarlas intracelularmente (no fijadas en paraformaldheido) se les agregó Citofixcitoperm (saponina y brefeldina), detergente que permite permeabilizar la membrana de las células, e IgG para bloquear intracelularmente. Posteriormente se lavaron dos veces con Perm/wash 1X (saponina) y se marcaron intracelularmente con los siguientes anticuerpos monoclonales: IL-2 FITC; IL-4 PE; IL-10 PE e IFN- γ FITC (el primer tubo se utilizó para autofluorescencia y para el tubo 2 isotipos IgG1a FITC, 16 $\mu\text{L}/10^6$ células; IgG2b PE, 16 $\mu\text{L}/10^6$ células y IgG1a PerCp, 16 $\mu\text{L}/10^6$ células (ver tabla II); por último se fijaron en paraformaldheido al 1%. Las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo (BD FACSCalibur) y los resultados se expresan en porcentajes de subtipos de linfocitos CD4⁺ que secretan determinada citocina (Jung et al, 1992 y Kallas et al., 1998).

En la tabla IV se muestra el procedimiento para la determinación de proteínas de superficie y de citocinas intracelulares de las PBMC estimuladas con la toxina Pet de *Escherichia coli*.

Tabla II. Preparación de las muestras para la detección del antígeno de superficie e intracelular.

| Tubo | Anticuerpos monoclonales | | | |
|------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | FL1 | FL2 | FL3 | FL4 |
| 1 | Control de Autofluorescencia | Control de Autofluorescencia | Control de Autofluorescencia | Control de Autofluorescencia |
| 2 | IgG1a Control de isotipo | IgG2b Control de isotipo | IgG1a Control de isotipo | IgG1a Control de isotipo |
| 3 | CD8 ⁺ | CD3 ⁺ | CD4 ⁺ | |
| 4 | CD8 ⁺ | | CD4 ⁺ | CD69 ⁺ |
| 5 | IL-2 | IL-10 | CD4 ⁺ | |
| 6 | IL-2 | IL-10 | CD4 ⁺ | |
| 7 | IFN- γ | IL-4 | CD4 ⁺ | |

FL1: Isotiocianato de fluoresceína (FITC), FL2: Ficoeritrina (PE), FL3: Proteína de clorofila peridina (PerCP) y FL4: Aloficocianida (APC).

Testigos positivos

Se utilizaron dos testigos positivos de células Hick comerciales: Hick 1 (Human intracelular cytokine-1 de PBMC, células testigo positivo para citocinas intracelulares humanas estimuladas para expresar niveles detectables de IL-2, IFN- γ y TNF- α) y Hick 2 (Human intracelular cytokine-2 de PBMC, células testigo positivo para citocinas intracelulares humanas activadas para expresar niveles detectables de IL-3, IL-4, IL-10, IL-13 y GM-CSF). Se procedió a marcar las células con IL-2, IL-4, IL-10, e IFN- γ . Las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo (BD FACSCalibur) y los resultados se expresan en porcentajes de subtipos de linfocitos CD4⁺ que secretan determinada citocina.

Para la detección del receptor de IL-2 (CD25⁺) como un marcador de activación de linfocitos T, se colocaron en placas de cultivo de 12X8 pozos por triplicado 2×10^5 células en 200 μ L de medio RPMI-1640 completo por pozo y se estimularon con la toxina Pet a diferentes concentraciones: 1.25, 2.50, 5.00, 10.00, 20.00, 50.00, 100.00 μ g/mL y se destinaron tres pozos con PBMC sin estímulo, como testigo negativo. Medio RPMI-1640 completo (aminoácidos esenciales 0.1 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, suero fetal bovino al 10%, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, HEPES 20 mM y

antibiótico-antimicótico: 10.000 unidades/mL de penicilina G de sodio, 10.000 µg/mL de sulfato de estreptomina y 25 µg/mL de anfotericina B como fungicida). Las células se mantuvieron a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5 %, durante 5 días.

Al finalizar el tiempo de estimulación se recuperaron las células cada tres pozos por tubo, cada pozo se lavó con 400 µL de PBS, se centrifugó a 400 x g a 4 °C durante 10 min. para recuperar las células. El sobrenadante no se descartó para ser utilizado en el ensayo de citocinas. Se les agregó IgG a las células para bloquear y así poder evitar pegado inespecífico, posteriormente se procedió a marcar las proteínas de la superficie celular con anticuerpos monoclonales: CD3⁺ FITC (Isotiocianato de fluoresceína, lectura a 530 nm), 20 µL/10⁶ células; CD4⁺ PE (Ficoeritrina, lectura a 560 nm), 20 µL/10⁶ células; CD8⁺ PerCP (Proteína de clorofila peridina, lectura a 650 nm), 20 µL/10⁶ células; CD4⁺ PerCP, 20 µL/10⁶ células; y CD25⁺ PE, 20 µL/10⁶ células, se incubó en la oscuridad durante 25 min. a 4°C, terminado el tiempo se realizaron dos lavados con PBS, por cada lavado se procedió a centrifugar a 400 x g a 4 °C durante 10 min. y por último se fijaron con paraformaldehído al 1% (ver Tabla III), el ensayo se realizó por duplicado. Los anticuerpos CD3⁺ se utilizaron para identificar los linfocitos T de los linfocitos B, los CD4⁺ para identificar las células cooperadoras, los CD8⁺ para identificar las células citotóxicas y los CD25⁺ se utilizaron para detectar las células T que se encuentran activadas (Coligan et al., 1992).

Las muestras se adquirieron y se analizaron en un citómetro de flujo (BD FACSCalibur) con el software Cell Quest versión 3.3; se ubicó la población de linfocitos y se abrió una ventana en el gráfico de puntos FSC (luz con desviación frontal) contra SSC (luz con desviación lateral) la adquisición se realizó a 10 000 eventos. Los resultados se expresan en %CD4⁺CD25⁺ es decir, porcentajes de linfocitos T CD4⁺ que expresan el marcador de activación (RIL-2) CD25⁺.

Tabla III. Preparación de las muestras para la detección del antígeno de superficie.

| Tubo | Anticuerpos monoclonales | | | Concentración de Pet $\mu\text{g/mL}$ |
|------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | FL1 | FL2 | FL3 | |
| 1 | Autofluorescencia Control negativo | Autofluorescencia Control negativo | Autofluorescencia Control negativo | |
| 2 | IgG1a Control de isotipo | IgG1a Control de isotipo | IgG1a Control de isotipo | |
| 3 | CD3 ⁺ | CD4 ⁺ | CD8 ⁺ | |
| 4 | CD3 ⁺ | CD25 ⁺ | CD4 ⁺ | |
| 5 | CD3 ⁺ | CD25 ⁺ | CD4 ⁺ | 1.25 |
| 6 | CD3 ⁺ | CD25 ⁺ | CD4 ⁺ | 2.50 |
| 7 | CD3 ⁺ | CD25 ⁺ | CD4 ⁺ | 5.00 |
| 8 | CD3 ⁺ | CD25 ⁺ | CD4 ⁺ | 10.00 |
| 9 | CD3 ⁺ | CD25 ⁺ | CD4 ⁺ | 20.00 |
| 10 | CD3 ⁺ | CD25 ⁺ | CD4 ⁺ | 50.00 |
| 11 | CD3 ⁺ | CD25 ⁺ | CD4 ⁺ | 100.00 |

FL1: Isotiocianato de fluoresceína (FITC), FL2: Ficoeritrina (PE) y FL3: Proteína de clorofila peridina (PerCP).

Valoración de la proliferación de las células mononucleares de sangre periférica

Obtención de células mononucleares de sangre periférica

La técnica de separación por gradiente de densidad con Ficoll-Paque™ PLUS (Gibco, BRL densidad 1.077) permitió que de la sangre completa se obtuvieran células mononucleares de sangre periférica. El dato teórico de valores normales de linfocitos extraídos en sangre completa es: por cada 20 mL de sangre se obtienen 20×10^6 células/mL (Abbas, 2003) de acuerdo a los resultados en nuestros ensayos por cada 20 mL de sangre se obtuvo un promedio de 13×10^6 células/mL, es decir el 65% de rendimiento, dicho rendimiento es un dato con respecto al teórico relativamente bajo, éste puede ser debido a la variabilidad biológica entre los seres vivos, alguna patología por parte del donante y a la manipulación de las células durante el desarrollo de la técnica entre otras; es decir las células se pierden entre cada lavado con PBS debida a la decantación por inversión.

Viabilidad de células mononucleares humanas estimuladas con Pet

Para descartar que la toxina Pet no tenga algún efecto citotóxico sobre las PBMC se llevó a cabo un ensayo de viabilidad de las células monocíticas estimuladas con Pet.

La viabilidad de las células mononucleares no se modifica y presenta un comportamiento similar en las células no tratadas que en las estimuladas con las diferentes concentraciones de Pet, resultados que indican que no existe ningún tipo de efecto que altere los resultados por muerte o daño celular (tabla IV).

Tabla IV. Porcentaje de viabilidad de PBMC estimuladas con la toxina Pet de *E. coli* enteroagregativa.

| Toxina Pet [µg/mL] | 1 ^{er} día % viabilidad | 2 ^o día % viabilidad | 3 ^{er} día % viabilidad | 4 ^o día % viabilidad | 5 ^o día % viabilidad | Promedio % viabilidad |
|--------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| 0.00 | 100.0 | 80.0 | 80.9 | 90.0 | 94.1 | 89.0 |
| 1.25 | 85.7 | 80.0 | 90.0 | 83.3 | 84.2 | 84.6 |
| 2.50 | 82.6 | 88.8 | 81.8 | 88.8 | 89.5 | 86.3 |
| 10.00 | 85.0 | 86.3 | 90.0 | 82.6 | 85.7 | 85.9 |
| 20.00 | 86.3 | 82.6 | 88.8 | 82.6 | 84.2 | 84.9 |
| 50.00 | 80.0 | 86.6 | 88.8 | 94.4 | 86.4 | 87.2 |

Proliferación de células mononucleares de sangre periférica en presencia de Pet

El ensayo de proliferación se llevó a cabo para detectar o identificar si la toxina Pet de *E. coli* tenía actividad mitogénica pero al comparar las lecturas de las cuentas por minuto de las células estimuladas con PHA y con Pet resulta que las cuentas por minuto de esta última son muy bajas. Por lo tanto la toxina Pet de *E. coli* no tiene actividad mitogénica sobre las PBMC. Este dato coincide con los resultados de viabilidad que mostraron que el número de células se mantiene constante después de ser estimuladas con diferentes concentraciones de Pet, durante 3 días (ver tabla V).

Tabla V. Índices de estimulación de los resultados de proliferación en PBMC humanas estimuladas con la toxina Pet.

| Toxina Pet [µg/m] | IE |
|-------------------|--------|
| 1.25 | 0.8325 |
| 2.50 | 0.8787 |
| 5.00 | 0.7166 |
| 10.00 | 0.9373 |
| 20.00 | 0.7318 |
| 50.00 | 0.5720 |
| PHA [10µg/mL] | 82.5. |

IE = Índice de estimulación; IE = Cuentas por minuto con mitógeno/ Cuentas por minuto sin mitógeno; $\delta = 0.1059$; $n = 3$

Evaluación de la expresión de citocinas extracelulares

Determinación de citocinas en sobrenadante de cultivo de las PBMC con Pet

Para cuantificar la posible participación de Pet en la expresión de citocinas se realizó una curva estándar para cada una de ellas como se aprecia en la figura 6.

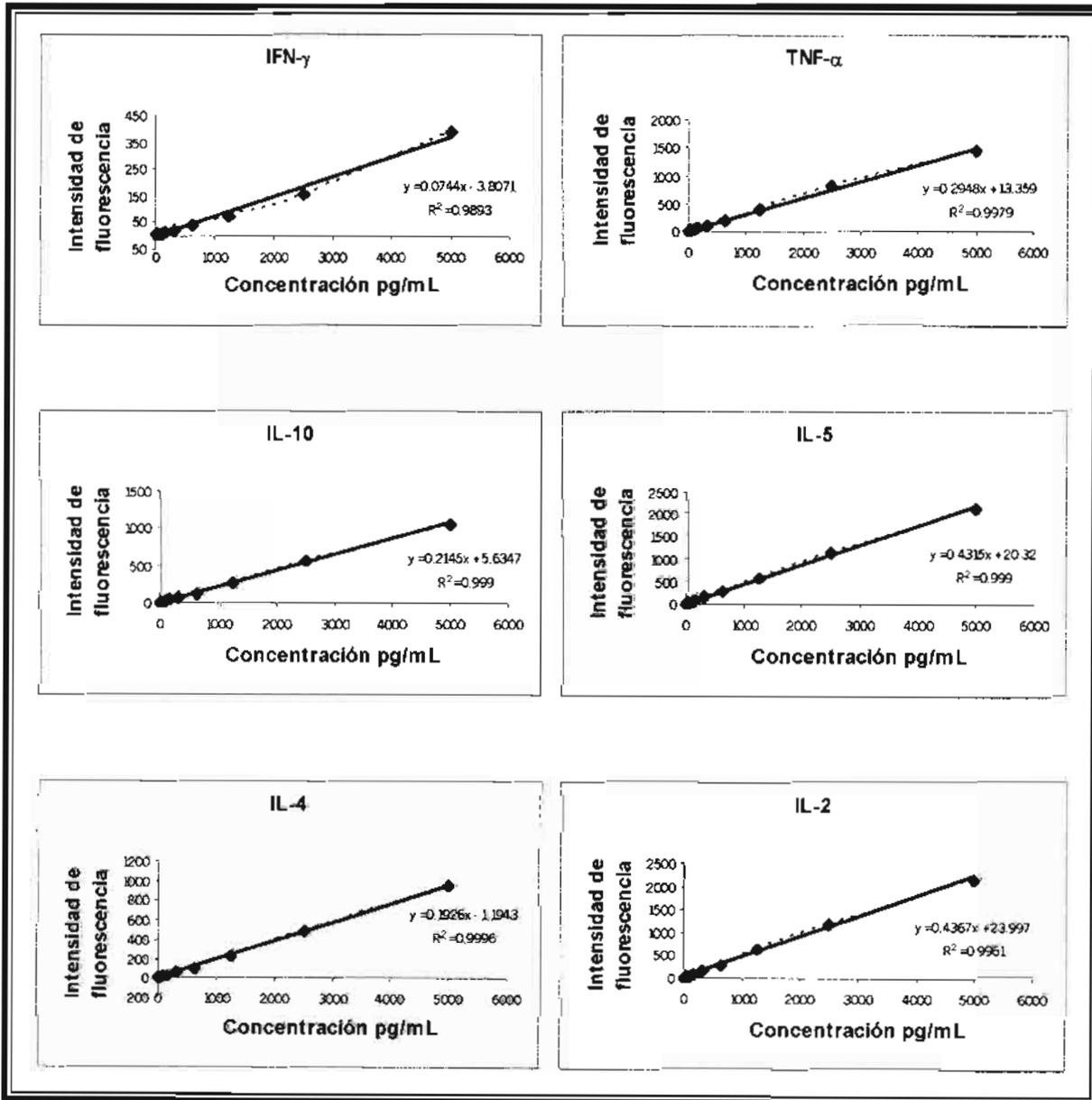


Fig. 6 Gráficos de curvas estándar de citocinas tipo Th-1: IFN- γ , TNF- α , IL-2, y tipo Th-2: IL-4, IL-5 e IL-10.

Al realizar el análisis de los resultados de activación de interleucinas inducidas por Pet se observó que únicamente se expresó IL-10, durante 5 días. Dicha expresión fue independiente de la concentración de Pet con un ligero incremento en las células estimuladas con 100 µg/mL de toxina. Las otras interleucinas se mantuvieron por debajo del límite de detección como se precia en la tabla VI.

Tabla VI. Cuantificación de citocinas en sobrenadante por CBA en PBMC estimuladas con la toxina Pet.

| Toxina Pet [µg/mL] | IFN-γ [pg/mL] | TNF-α [pg/mL] | IL-10 [pg/mL] | IL- 5 [pg/mL] | IL- 4 [pg/mL] | IL- 2 [pg/mL] |
|--------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 1.25 | <20 | <20 | 656.4 | <20 | <20 | <20 |
| 2.50 | <20 | <20 | 490.4 | <20 | <20 | <20 |
| 5.00 | <20 | <20 | 587.2 | <20 | <20 | <20 |
| 10.00 | <20 | <20 | 531.0 | <20 | <20 | <20 |
| 20.00 | <20 | <20 | 636.6 | <20 | <20 | <20 |
| 50.00 | <20 | <20 | 940.0 | <20 | <20 | <20 |
| 100.00 | <20 | <20 | 1046.7 | <20 | <20 | <20 |
| 0.0 | <20 | <20 | <20 | <20 | <20 | <20 |
| α-CD3 ⁺ CD28 ⁺ | >5000 | >5000 | 974.4 | 273.2 | 16.6 | 539.3 |

Identificación de citocinas intracelulares en PBMC estimuladas con Pet

El gráfico de puntos representado en la figura 7 muestra dos poblaciones de linfocitos con diferentes tamaños y diferente complejidad, es decir con diferentes características fenotípicas, es por esto que se procede hacer el análisis de ambas poblaciones.

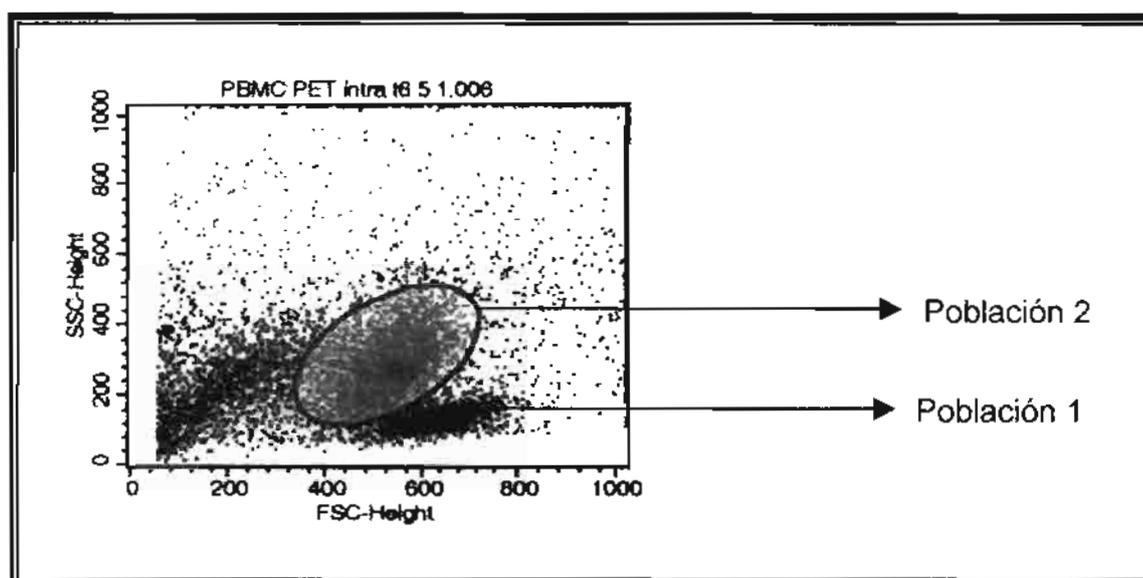


Fig. 7 Gráfico de puntos de Foward scatter vs Side scatter con dos poblaciones linfocitarias que se encontraron en la misma muestra con diferentes características fenotípicas.

Los resultados de la tabla VII muestran el análisis de la determinación de citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ intracelulares de las PBMC estimuladas con la toxina Pet de *Escherichia coli*, población 1 de la ventana de linfocitos. Al realizar el análisis de resultados de la población 1 se observa que la única citocina que se expresa es la IL-10 en células CD4⁺ al quinto día.

Tabla VII. Identificación de citocinas intracelulares en PBMC estimuladas con la toxina Pet durante 1, 3 y 5 días; población 1.

| Población 1 | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|------------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Toxina Pet [μ g/m] | 1 día | | | | 3 días | | | | 5 días | | | |
| | %CD4 ⁺ IFN- γ | %CD4 ⁺ IL-2 | %CD4 ⁺ IL-4 | %CD4 ⁺ IL-10 | %CD4 ⁺ IFN- γ | %CD4 ⁺ IL-2 | %CD4 ⁺ IL-4 | %CD4 ⁺ IL-10 | %CD4 ⁺ IFN- γ | %CD4 ⁺ IL-2 | %CD4 ⁺ IL-4 | %CD4 ⁺ IL-10 |
| 1.0 | ND | 2.25 | ND | 0.56 | ND | 0.30 | ND | 0.24 | ND | 0.75 | ND | 0.4 |
| 10.0 | ND | 1.42 | ND | 0.57 | ND | 0.22 | ND | 0.16 | ND | 0.68 | ND | 0.94 |
| 100.0 | ND | 0.47 | ND | 0.36 | ND | 0.85 | ND | 0.04 | ND | 2.4 | ND | 5.07 |
| Testigos positivos | | | | | | | | | | | | |
| | %CD4 ⁺ IFN- γ | | %CD4 ⁺ IL-2 | | %CD4 ⁺ IL-4 | | %CD4 ⁺ IL-10 | | | | | |
| Hick 1 | 74.69 | | 43.30 | | ND | | ND | | | | | |
| Hick 2 | ND | | ND | | 6.51 | | 0.87 | | | | | |

ND: No detectable.

Los resultados de la tabla X muestran el análisis de la determinación de citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ intracelulares de las PBMC estimuladas con la toxina Pet de *Escherichia coli*, población 2 de la ventana de linfocitos. Al realizar el análisis de resultados de la

población 2 se observa que se expresa la IL-2 al tercero y quinto día así también como la IL-10 al quinto día.

No se presentó activación de linfocitos T por el receptor de activación temprana CD69⁺ al igual que el receptor de CD25⁺.

Tabla VIII. Determinación de citocinas intracelulares en PBMC estimuladas con la toxina Pet de *Escherichia coli* durante 1, 3 y 5 días; población 2.

| Población 2 | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| Toxina Pet [µg/mL] | 1 día | | | | 3 días | | | | 5 días | | | |
| | %CD4 ⁺ IFN-γ | %CD4 ⁺ IL-2 | %CD4 ⁺ IL-4 | %CD4 ⁺ IL-10 | %CD4 ⁺ IFN-γ | %CD4 ⁺ IL-2 | %CD4 ⁺ IL-4 | %CD4 ⁺ IL-10 | %CD4 ⁺ IFN-γ | %CD4 ⁺ IL-2 | %CD4 ⁺ IL-4 | %CD4 ⁺ IL-10 |
| 1.0 | ND | ND | ND | ND | ND | 7.63 | ND | 0.20 | ND | 4.33 | ND | 1.32 |
| 10.0 | ND | ND | ND | ND | ND | 10.49 | ND | 0.26 | ND | 6.62 | ND | 1.24 |
| 100.0 | ND | ND | ND | ND | ND | 18.28 | ND | 0.40 | ND | 18.63 | ND | 2.91 |
| Testigos positivos | | | | | | | | | | | | |
| | %CD4 ⁺ IFN-γ | | | %CD4 ⁺ IL-2 | | | %CD4 ⁺ IL-4 | | | %CD4 ⁺ IL-10 | | |
| Hick 1 | 74.69 | | | 43.30 | | | ND | | | ND | | |
| Hick 2 | ND | | | ND | | | 6.51 | | | 0.87 | | |

ND: No detectable.

Para el análisis de la población 2 tampoco se presentó activación de linfocitos T por el receptor de activación temprana CD69⁺ al igual que el receptor de CD25⁺.

Para la detección del receptor de IL-2 (CD25⁺) como un marcador de activación de linfocitos T. La respuesta inmune por parte del huésped ante un antígeno se puede ver manifestada a través de la activación celular reflejada en proliferación celular, secreción de citocinas y la expresión de receptores de superficie. Para establecer si la toxina Pet de *E. coli* activaba las PBMC se determinó si en la superficie de las células se expresaba la proteína CD25⁺; que es receptor de IL-2. Pero al no existir diferencias en los porcentajes de CD4⁺CD25⁺ de las células estimuladas a todas las concentraciones de la toxina Pet con respecto al testigo negativo (sin estímulo), fue indicativo de que no se presentó la expresión del receptor de IL-2 (CD25⁺). Probablemente las células monocíticas humanas estimuladas con Pet sean activadas por un receptor diferente al de IL-2, se propone realizar ensayos con otros receptores de activación de linfocitos T.

En la figura 8 se muestran dos gráficas de puntos representativas de todas las obtenidas en el ensayo de activación de PBMC estimuladas con Pet, donde la población celular de interés se localiza en el cuadrante superior derecho de las dobles positivas y cada punto representa una célula, las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo BD

FACSCalibur a 10 000 eventos. Como se muestra no hay activación de células CD4⁺ ya que no presentan receptores IL-2 (ver fig. 8 y tabla IX).

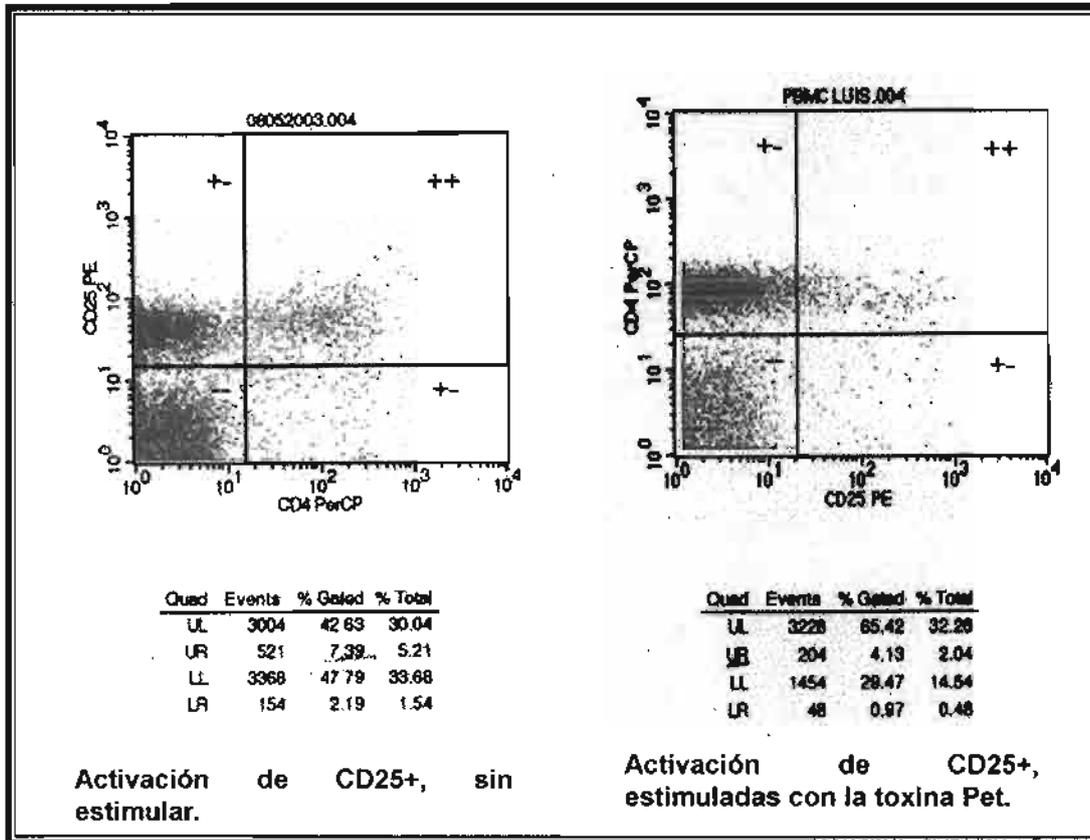


Fig. 8 Gráficos de puntos de células CD4⁺ vs CD25⁺ con la toxina Pet (antígeno) y sin la toxina Pet. UL= (-,+), UR= (+,+), LL= (-,-) y LR= (+,-). Se observa para los dos en el cuadrante de las dobles positivas (UR) que se expresan prácticamente los mismos porcentajes de células (7.39% sin Pet y 4.13% con la toxina Pet a una concentración de 10.00 µg/mL), es decir no hay activación por receptores CD25⁺. La figura es representativa para las demás concentraciones de la toxina Pet debido a que los otros gráficos de puntos son semejantes a este.

Tabla IX. Porcentaje de células CD4+ que expresan el receptor CD25+ (RIL-2) en PBMC estimuladas a diferentes concentraciones de la toxina Pet, durante 5 días con la toxina Pet.

| Concentración de la toxina Pet, $\mu\text{g/mL}$ | % CD4 ⁺ CD25 ⁺ |
|--|--------------------------------------|
| 1.25 | 5.40 |
| 2.50 | 5.11 |
| 5.00 | 6.23 |
| 10.00 | 4.13 |
| 20.00 | 5.00 |
| 50.00 | 6.36 |
| 100.00 | 5.14 |
| Testigo negativo (sin estímulo) | 7.39 |

El ensayo se realizó por duplicado se presentan promedios, n= 2.

El haber encontrado que la toxina Pet de *E. coli* no tiene efecto citotóxico y actividad mitogénica en PBMC posiblemente el tipo de daño celular sea a nivel intracelular tal y como lo describen Villaseca et al. (2000) "la toxina Pet produce degradación de las cadenas α y β espectrina de los eritrocitos, α -fodrina de células epiteliales HEp-2" y Navarro-García et al. (1998) atribuyen a que "la enterotoxina Pet produce cambios en citoesqueleto y la pérdida de las fibras de actina de células HEp-2 y HT29".

La *E. coli* es una bacteria gram-negativa que contiene una membrana externa y uno de sus componentes es el lipo-polisacarido (LPS) el cual presenta una potente actividad mitogénica sobre los linfocitos T (Cario et al., 2000 y Brousseau et al., 1999). La falta de actividad mitogénica por parte de la toxina Pet sobre las PBMC sugiere que la toxina no estaba contaminada con LPS.

En condiciones normales, las respuesta inflamatoria elimina la agresión patógena y elimina los componentes tisulares lesionados, la respuesta inflamatoria puede conducir a la pérdida de la función del órgano y tejido .

La activación de la respuesta inflamatoria puede producir tres resultados distintos: en condiciones ideales se elimina al agente patógeno, la respuesta inflamatoria se resuelve y el tejido recupera su arquitectura y funciones normales. Por otro lado, si el agente no es eliminado hay un proceso inflamatorio crónico que conlleva a la destrucción del tejido ocasionada por los productos de las células inflamatorias, por otro lado si el tejido sufre un daño irreversible la arquitectura del tejido es sustituida por una cicatriz. La tercera posibilidad es que las células inflamatorias no eliminen el agente extraño y la reacción inflamatoria persiste conduciendo a la fibrosis y cicatrización, por lo tanto el proceso inflamatorio es importante en la eliminación del agente extraño (Fantone et al., 1990).

Vial et al (1988) demostraron, usando modelos de asa ligada de rata y de conejo inoculadas con EAEC, la producción de lesiones como el acortamiento y la necrosis hemorrágica de las microvellosidades acompañada de una respuesta inflamatoria leve de

la submucosa, con edema e infiltración de mononucleares. La utilización de algunos modelos *in vitro* e *in vivo* han permitido reconocer algunas características de la patogénesis de la infección por EAEC como la formación de una gruesa capa de moco en el epitelio de la mucosa intestinal y la formación de un biofilm (Tzipori et al., 1992 y Hicks et al., 1996).

Eslava et al. (1993), refieren que una proteína con actividad toxigénica producida por EAEC produce lesiones en modelos de asa ligada de íleon de rata con una severa respuesta inflamatoria aguda con un marcado acortamiento de las microvellosidades en las asas, las lesiones producidas por esta proteína en rata son muy similares en las encontradas en el intestino de niños infectados con *E. coli* enteriagregativa y es reconocida por el suero de pacientes infectados con EAEC.

Estos autores al trabajar con la bacteria completa y con una proteína con actividad toxigénica (aún no se le identificaba por el nombre de Pet) empiezan a dilucidar que la infección por EAEC es un proceso inflamatorio que se acompaña de una gruesa capa de moco en el epitelio de la mucosa intestinal y la formación de un biofilm, esto empieza a sugerir que las células del sistema inmune que participan son células polimorfonucleares y macrófagos y que las citocinas participantes en esta respuesta son citocinas pro-inflamatorias (Th-1) tales como: IL-1, IL-2, IL-8, IFN- γ y TNF- α .

Posteriormente Steiner et al. (1997) encuentran que niños infectados con EAEC y con diarrea persistente, presentan una alta concentración de lactoferrina fecal (FLF), IL-8 e IL-1 β por células epiteliales intestinales Caco-2, marcadores de inflamación intestinal.

Eslava et al. (2003) refieren que “una proteína con actividad toxigénica producida por EAEC llamada Pet con actividad de serina proteasa induce en macrófagos la expresión de IL-1 β , IL-6, IL-8 a las 24 h. Los resultados de estos estudios sugieren que la presencia de marcadores de inflamación intestinal en heces de pacientes infectados por EAEC podrían estar asociados con la producción de la toxina Pet.

Empleando modelos animales, Sainz et al. (2002) demostraron la presencia de anticuerpos IgA contra la toxina Pet, en lavados intestinales obtenidos de animales infectados; adicionalmente, detectaron anticuerpos IgG contra dicha toxina en el suero de los animales infectados.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la única citocina secretada al sobrenadante por parte de las PBMC estimuladas con Pet de EAEC fue la IL-10. La IL-10 se expresa principalmente en células hematopoyéticas e incluye linfocitos T y B, monocitos y macrófagos (Barclay et al. 1997).

Las citocinas que secretan las células Th-1 son consideradas esencialmente pro-inflamatorias y las de Th-2 depresoras de la inflamación, existen reportes que la IL-10 posee las dos funciones, sin embargo las células Th-2 también sintetizan citocinas que dirigen las células B hacia su diferenciación, promoviendo así la producción de anticuerpos (Mocellin et al. 2003). Inhibe la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-2, TNF- α , IFN- γ , GM-CSF; citocinas Th-1) por la inhibición de las moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 y antígenos de histocompatibilidad (MHC-II), recientemente se ha descubierto que promueve la actividad de las células NK, la principal función de la IL-10 es limitar la intensidad de la respuesta inmune, en consecuencia se le atribuyen efectos regulatorios en la homeostasis (Barclay et al., 1997, Conti Pio et al., 2002 y Pestka et al., 2004).

De acuerdo a los resultados obtenidos por Eslava et al. (2003) los macrófagos producen citocinas tipo Th-1 estimuladas con Pet a las 24h (respuesta inmunitaria tipo inespecífica). Los ensayos realizados en este trabajo son congruentes con lo anterior después de haberse montado la respuesta inespecífica se deduce que al cabo de 5 días se monta la respuesta específica (inmunidad adaptativa) reflejada en la producción de citocinas tipo Th-2 como por ejemplo la IL-10 con una función de tipo regulatorio por parte de los linfocitos estimulados con Pet, también son congruentes con los estudios de Sainz et al. (2002) al encontrar en suero de ratones infectados con la bacteria completa, anticuerpos IgG contra la toxina Pet. Se sugiere otra explicación acerca de la IL-10 encontrada, la toxina Pet probablemente evade los mecanismos de defensa del huésped y de esta manera se favorece la colonización de *E. coli*.

Al haberse encontrado IL-10 a 5 días de estimulación con Pet sobre PBMC en sobrenadante de cultivo se procedió a realizar una cinética a diferentes tiempos de estimulación de Pet pero a nivel intracelular.

Se analizaron dos poblaciones de linfocitos CD4⁺ encontrándose IL-10 a 5 días en ambas poblaciones. Los valores de IL-2 para la población 1 y 2 se consideran muy bajas con

respecto al testigo positivo, esto indicaría que quizá la IL-10 inhibe la síntesis de IL-2 e IL-4 e IFN- γ . De esta manera se ha corroborado el resultado obtenido en la determinación de citocinas en sobrenadante de cultivo de PBMC estimuladas con la toxina Pet de *E. coli*. Aun así, aunque la población analizada ésta dentro de la región de linfocitos, no existen suficientes evidencias para asegurar que la producción de IL-10 se deba a linfocitos y no a otras poblaciones celulares como los monocitos. Por lo tanto se propone realizar ensayos de identificación de citocinas tanto en sobrenadante como intracelularmente en tiempos más cortos *in vitro*.

La toxina Pet de *E. coli* enteroagregativa no tiene efecto mitogénico sobre células mononucleares de sangre periférica y tampoco presenta un efecto de tipo tóxico.

Como hemos visto en este estudio *in vitro*, existe un aumento en la producción de IL-10 por células PBMC estimuladas con dicha toxina durante 5 días a nivel extracelular e intracelular. No existen elementos suficientes para considerar que el balance inmunitario producido por esta toxina presente un perfil Th-2, por esta razón, los resultados aún no son concluyentes.

Por otra parte, los hallazgos obtenidos en el presente trabajo se deben evaluar con cierta reserva ya que, solamente uno de los muchos factores de patogenicidad de EAEC, la toxina Pet, fue utilizada en la estimulación de las células mononucleares de sangre periférica. El conocimiento del balance real entre el poder patogénico de esta bacteria será igual a la suma de todo su arsenal con posible acción tóxica sobre el huésped y la respuesta de estimulación, mantenimiento y control de los mecanismos innatos y específicos del huésped, principalmente a nivel de mucosas intestinales que es el sitio en donde se establece dicho balance.

- Abbas Abul K. And Lichtman. Cellular and Molecular Immunology. 5ª edición. Edit. Saunders. 2003, USA. pp. 3-39, 243-274.
- Baldwin J. T. et al. 1992. Enteroagregative *Escherichia coli* strain secrete a heat labile toxin antigenically related to *Escherichia coli* hemolysin. Infection and Immunity. 60:2092-2095.
- Barclay Neil A., Brown Marion H. et al. The leucocyte Antigen (facts book). 2ª edition. Edit. Academic Press. 1997. San Diego California. pp 486-509.
- Bernier Christine et al. 2002. Identification of an Aggregative Adhesion Fimbria (AAF) Type III –Encoding Operon in Enteroaggregative *Escherichia coli* as a Sensitive Probe for Detecting the AAF- Encoding Operon Family. Infect. Immun. Vol. 70, No. 8:4302-4311.
- Brandtzaeg, P. 1998. Development and basic mechanisms of human gut immunity. Nutr.Revs.; 56; S5-S18.
- Brousseau Pauline, Payette Yves, Tryphonas Helen, Boermans Herman, Flipo Denis and Fournier Michel. Manual of immunological methods. CRC Press. 1999. USA. pp 77-86.
- Cario Elke., Rosenberg Ian M. et al. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing toll-like receptors. The J. of Immunology. 164:996-972.
- Carson Richard T., Vignali Dario A. A. 1999. Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. J. of Immunological Methods. 227:41-52.
- Coligan John E., Margulies David H., Shevach Ethan M. and Strober Warren. Current Protocols in Immunology. Edit. John Wiley & Sons, Published by Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. 1992, USA. Pags. 3.1- 7.9.

- Conti Pio et al. 2002. IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. *Immunology Letters*. 86:123-129.
- Cravioto, A., R. J. Gross, S. M. Scotland and B. Rowe. 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr. Microbiol.* 3:95-99.
- Czeczulin J.R., S. Balepur, S. Hicks, A. Phillips, R. Hall, M. H. Kothary, F. Navarro-García, and J. P. Nataro. 1997. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 65:4135-4145.
- Debroy, C. J. Yealy, R. A. Wilson, M. K. Bhan and R. Kumar. 1995. Antibodies raised against the outer membrane protein interrupt adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 63:2873-2879.
- Eslava C., F. Navarro-García, J.R. Czeczulin, I.R. Henderson, A. Cravioto and J.P. Nataro. 1998. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 66:3155-3163.
- Eslava C. et al. 1993. Identification of a protein with toxigenic activity produced by Enteroaggregative *Escherichia coli*. 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology, Atlanta, Georgia USA. Abstract B-4.
- Eslava C. et al. 2003. Pet toxin de enteroaggregative *Escherichia coli* induce the expression of different interleukines from macrophages. 103rd General Meeting of the American Society for Microbiology, Washington, DC USA. Abstract E-100.
- Fantone CJ. and Ward AP. Inflamación en patología. Eds. Rubin E., Farber LJ. Ed. Médica Panamericana. 1990. pp. 33-59.
- García-Mart. 1996. Molecular evidence supporting the existence of two major groups in uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 14:231-244.
- Hale, T., E. Oaks and S. B. Formal. 1985. Identification and antigenic characterization of virulence-associated, plasmid-coded proteins of *Shigella spp.* And enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 50:620-629.

- Henderson J., Czczulin J., Eslava C., Noriega F., and Nataro J. 1999. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 67:5587-5596.
- Hicks S. , D. C. Candy and A. D. Phillip. 1996. Adhesion of Enteroagregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa *in vitro*. *Infection and Immunity.* 64:5751-5760.
- Igarishi K. T. Ogasawara and Ito K. 1987. Inhibition of elongation factor 1 dependent aminoacyl-tRNA binding to ribosomes by shiga-like toxin I (VT1) form *Escheichia coli* 0157:H7 and by shiga toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* 44:91-94.
- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Estadística del Sector Salud 2000.
- Jerse A. E. and Kaper J. B. 1994. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by EAF plasmid. *Infect. Immun.* 59:4302-4309.
- Jung Thomas, Schauer Uwe, Heusser Christoph, et al. 1992. Detection of Intracellular cytokines by flow cytometry. *J. of Immunological Methods.* 159:197-207.
- Kallas Esper G., Gibbons David C., et al. 1999. Detection of Intracellular Antigen-Specific Cytokines in Human T Cell Populations. *The Journal of Infectious Diseases.* 179:1124-1131.
- Klapproth J., Donnenberg M., Abraham J., Mobley H., James S. 1995. Products of enteropathogenic *Escherichia coli* inhibit lymphocyte activation and lymphokine production. 1195. *Infect. Immun.* 63:2248-2254.
- Kraehenbuhl J.P., and M.R. Neutra. 1992. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol. Revs.* 72:853-879.
- Knutton S., Lloyd D. R. and McNeish A. S. 1987. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultures human intestinal mucosa. *Infect. Immun.* 55:56-77.
- Kuby Janis et al. *Immunology.* 5ª edición. Edit. Freeman. 2003, USA. pp. 1-23, 276-298.
- Kuhn R., Lohler J., Renick D., Rafewsky K and Muller W. 1993 Interleukin-10 deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75:263-274.

- Kulkarni A., Huh C., Becker D., Geiser A., Lyght M., Flanders K., Roberts A., Sporn M., Ward J., and Karlsson. 1993. Transforming growth factor BI null mutation in mice cause excessive inflammatory response and early death. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90: 770-774.
- Levine M., Ristaino M., Marley G., Smyth C., Knutton S., Boedeker E., Black R., Young C., Clements M., Cheney C., and Patnaik. 1984. Coli surface antigens 1 and 3 of colonization factor antigens II-positive enterotoxigenic *E. coli*: morphology, purification, and immune response in human. *Infect Immun.* 44:409-420.
- Lior H. 1994. Clasification of *Escherichia coli* . In: Gyles C. L: (Ed.). *Escherichia coli* in domestic animals and humans. C: A. B: International Wallingford, Oxon, Ox10, 8DE. UK. 7-45.
- Longobardi GA. Flow Cytometry. First Principles. New York, NY:Willey-Liss, 1992.
- MacDermott R. 1994. Alterations in mucosal immune system in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Med Clin. North Am.* 78:1207-1231.
- Malstrom C. and James S. 1998. Inhibition of Murine Splenic and Mucosal Lymphocyte Function by Enteric Bacterial Products. *Infect Immun.* 66:3120-3127.
- Marquez L. et al. 1987. *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of siga-like toxin II. *FEMS Microbiol. Lett.* 44:33-38.
- Mayer, H. B. and C. A. Wanke. 1995. Enteraggregative *Escherichia coli* as a possible cause of diarrhea in an HIV-infected patient. *N. Engl. J. Med.* 332:273-274.
- Mocellin Simone et al. 2003. The dual role of IL-10. *Trends in Immunology.* Vol.24 No. 1: 36-43.
- Mc I.Mowat, A., and J. Viney . 1997. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol. Revs.*; 156:145-166.
- Nataro, J.P., J.B. Kaper, R. Robins-Browne, P. Vial, and M.M. Levine. 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 6:829-831.

- Nataro J. P., Y. Deng, D. R. Maneval, A. L. German, W. C. Martin and M. M. Levine. 1992. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cell and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect. Immun.* 60:2297-2304.
- Nataro J. P., Yikang D., J. A. Giron, S. J. Savarino, M. H. Kothary and R. Hall. 1993. Aggregative adherence fimbrial I expression in enteroaggregative *Escherichia coli* requires two unlinked plasmid regions. *Infect. Immun.* 61:1126-1131.
- Nataro J. P. and J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:142-201.
- Navarro-Garcia, F., C. Sears, C. Eslava, J. M. Villaseca, R. López Revilla, J. R. Czeuczulin. 1998. *In vitro* effect of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. and Immun.* 66:3149-3154.
- Navarro-Garcia, F., C. Sears, C. Eslava, A. Cravioto, and J.P. Nataro. 1999. Cytoskeletal effects induced by Pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 67:2184-2192.
- Nomura Laurel E. et al. optimization of whole blood antigen-specific cytokine assay for CD4⁺ T cells. 2000. *Cytometry* 40:60-68.
- Pai, M., G. Kang, B.S. Ramakrishna, A. Venkataraman, and J. Muliyl. 1997. An epidemic diarrhea in south India caused by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Indian J. Med. Res.* 106:7-12.
- Pestka Sidney et al. 2004. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 22:929-79.
- Polotsky, Y. J. P. Nataro, D. Kotler, T. J. Barret and J M. Orenstein. 1997. HEp-2 cell adherence patterns, serotyping and DNA analysis of *Escherichia coli* isolates from eight patients with AIDS and chronic diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 35:1952-1958.
- Sadlack B., Merz H., Schorlr H., Schimpl A., and Horack I. 1993. Ulcerative colitis like disease in mice with a disrupted interleukine-2 gene. *Cell* 75:253-261.

- Sainz, T., Pérez J., Fresan M. C., Flores V., Jimenez L., Hernandez U., Herrera I., and C. Eslava. 2002. Histological alterations and immune response induced by Pet toxin during colonization with enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) in a mouse model infection. *J. Microbiol.* 40:91-97.
- Sang, W. K., J. O. Oundo, J.K. Mwituria, P. G. Waiyaki, M. Yoh, T. Ilidia, and T. Honda. 1997. Multidrug-resistant enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in Kenyan children. *Emerg. Infect. Dis.* 3:373-374.
- Scotland S. M., Smith H. R. and Rowe B. 1985. Two distinct toxins active on Vero cells from *Escherichia coli* 0157. *Lancet* II. 885-886.
- Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry*. 4th edition. New Jersey: Willey-Liss, Hoboken, 2003.
- Smith, H. R., T. Cheasty, and B. Rowe. 1997. Enteroaggregative *Escherichia coli* and outbreaks of gastroenteritis in UK. *Lancet*. 350:814-815.
- Steiner T. S. et al. 1997. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. *The Journal of Infectious Diseases*. 177:88-96.
- Suni Maria A., Picker Louis J. and Maino Vernon C. 1998. Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry. *J. of Immunological Methods*. 212:89-98.
- Swenson, D.L., Bukanov, N.O., Berg, D.E. & Welch, R.A. 1996. Two pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* J96: Cosmid cloning and sample sequencing. *Infection and Immunity* 64:3736-3743.
- Tzipori, S., J. Montanaro, R.M. Robins-Browne, P. Vial, R. Gibson, and M.M. Levine. 1992. Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in gnotobiotic piglet gastroenteritis model. *Infect. Immun.* 60:4751-4760.
- Vial, P., R. Robins-Browne, H. Lior, V. Prado, J.B. Kaper, J.P. Nataro, D. Meneval, A. Elsayed, and M.M. Levine. 1988. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *J. Infect. Dis.* 158:70-79.

- Villaseca J. M. , F. Navarro-García, G. Méndez Hernández, J. P. Nataro, A. Cravioto and C. Eslava. 2000. Pet, toxin from enteroaggregative *E. coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption. *Infect and Immun.* 68:5920-5927.
- Wai S. N., A. Takade and K. Amaku. 1996. The hydrophobic surface proteins layer of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 135:17-22.
- Wanke, A. A., J. Gerior, V. Blais, H. Mayer and D. Acheson. 1998. Successful treatment of diarrhoea disease associated with enteroaggregative *Escherichia coli* in adults infected with human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.* 178:1369:1372.
- Wilco de Jager et al. Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells. 2003. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 10 (1):133-139.
- Willshaw, G. A., M. M. McConnell, H. R. Smith, B. Rowe. 1990. Structural and regulatory genes for *coli* surface associated antigen 4 (CS4) are encoded by separate plasmid in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of serotype 025:H42. *FEMS Microbiol. Lett.* 68:225-260.

PBS para Citometría

| | |
|---|--------|
| Fosfato de Sodio dibásico, Na ₂ HPO ₄ (anhidro) | 1.15 g |
| Fosfato de Sodio monobásico, NaH ₂ PO ₄ (anhidro) | 0.23 g |
| Cloruro de Sodio, NaCl (anhidro) | 9.00 g |

- Colocar en 900 mL de agua desionizada
- Agitar hasta solubilizar
- Ajustar pH a 7.2-7.4
- Aforar a 1000 mL
- Filtrar

PBS para Cultivo Celular

| | |
|---|--------|
| Fosfato de Sodio dibásico, Na ₂ HPO ₄ (anhidro) | 1.19 g |
| Fosfato de Sodio monobásico, NaH ₂ PO ₄ (anhidro) | 0.22 g |
| Cloruro de Sodio, NaCl (anhidro) | 8.76 g |

- Colocar en 900 mL de agua desionizada
- Agitar hasta solubilizar
- Ajustar pH a 7.2-7.4
- Aforar a 1000 mL
- Filtrar
- Esterilizar por autoclave

p-Formaldehído al 1% (solución fijadora)

| | |
|----------------|--------|
| p-Formaldehído | 1.00 g |
|----------------|--------|

- Colocar en 90 mL de PBS para Citometría
- Solubilizar a 70° C, durante 1 hora
- Ajustar pH a 7.2-7.4
- Aforar a 100 mL
- Filtrar

RPMI 1640 (Incompleto)

| | |
|---|---------|
| RPMI 1640 (con L-glutamina sin NaHCO ₃) | 10.40 g |
| Bicarbonato de Sodio, NaHCO ₃ | 2.00 g |

- a) Colocar en 900 mL de agua desionizada
- b) Agitar hasta solubilizar
- c) Ajustar pH a 7.2-7.4
- d) Aforar a 1000 mL
- e) Esterilizar por filtración

f) RPMI-1640 (completo)

Para preparar 200 mL:

| | |
|---------------------------|-----------|
| RPMI 1640 incompleto | 172.80 mL |
| Aminoácidos esenciales | 1.00 mL |
| Aminoácidos no esenciales | 2.00 mL |
| Piruvato de Sodio | 2.00 mL |
| L-glutamina | 0.20 mL |
| Hepes | 2.00 mL |
| Antibióticos | 2.00 mL |
| Suero Fetal Bovino | 20.00 mL |

Azul Tripano 0.4%

| | |
|--------------|--------|
| Azul Tripano | 0.40 g |
|--------------|--------|

- a) Colocar en 90 mL de PBS de cultivo
- b) Solubilizar
- c) Aforar a 100 mL con PBS de cultivo
- d) Filtrar