

11621
17



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**IDENTIFICACION DE LINFOCITOS AFECTADOS
DURANTE LA INFECCION EXPERIMENTAL EN EL
CONEJO POR *Escherichia coli*
ENTEROHEMORRAGICA.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
NORHAN/CORTES FERNANDEZ DE ARCIPRESTE**

ASESOR: DR. GUILLERMO VALDIVIA ANDA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

2003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Identificación de Linfocitos Afectados Durante la Infección
Experimental en el Conejo por Escherichia coli Enterohemorrágica.

que presenta la pasante: Norhan Cortés Fernández de Arcipreste
con número de cuenta: 09329462-3 para obtener el título de :
Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de mayo de 2003

PRESIDENTE	<u>Dr. Guillermo Valdivia Anda</u>	
VOCAL	<u>M.C. Juan Carlos del Río García</u>	
SECRETARIO	<u>M.C. Juan S. Barrientos Padilla</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MVZ. Esperanza García López</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MVZ. Hugo Ramírez Álvarez</u>	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

Deseo que sepas mamá que te agradezco todo lo que has hecho por mí, desde darme la vida, hasta lograr ser la persona que hoy te dice que te quiere muchísimo y que siempre voy a estar cerca de ti, gracias por tu cariño. TE QUIERO

A ti hermano, gracias, porque también me has apoyado de una manera que no podré agradecértelo ni en un millón de años. Sé que siempre podré contar contigo, así como júralo que yo estaré contigo en cualquier circunstancia. Además gracias por tener a Irania, esa niña tan linda que adoro con toda mi alma. TE QUIERO

Gracias Juan por haber guiado mi camino y apoyarme en la realización de esta tesis, así como en la realización de mis sueños como ser humano. TE QUIERO

Al Dr. Guillermo Valdivia, del cual he aprendido mucho en este tiempo, espero que esta tesis le haya dejado satisfecho, porque realice mi máximo esfuerzo para lograrlo.

A mis amigos de toda la carrera como Adriana (gracias, por tu apoyo incondicional), César, Emma y demás amigos que me apoyaron en las buenas y en las malas, los quiero.

Al M.V.Z. Germán Garrido, por todas sus enseñanzas y paciencia en la realización de esta tesis.

DEDICATORIAS

A ti Papi, que no estas presente en materia, pero sé que lo estas en espíritu acompañándome, a ti que no pudiste ver esta obra terminada, aquí esta para ti. TE QUIERO y nunca te olvidaré.

Mamá, por fin termine y espero disfrutes esto tanto como yo lo hago, estoy aquí por ti y sólo por ti.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

	Pág.
Introducción.....	1
Justificación.....	20
Hipótesis.....	20
Objetivo General.....	20
Objetivos Particulares.....	21
Material y Métodos.....	22
Resultados.....	30
Discusión.....	53
Conclusiones.....	63
Apéndice.....	65
Bibliografía.....	67

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.- Principales características de <i>E. coli</i>	Pág. 1
Cuadro 2.- Diagrama experimental con las cepas de <i>E. coli</i>	22
Cuadro 3.-Resultados de laboratorio de las pruebas de bioquímica y hematología en los conejos antes de la inoculación.	30
Cuadro 4.-Rangos normales de las pruebas de Bioquímica y Hematología encontrados en los conejos antes de la inoculación.	31
Cuadro 5.- Proporción de linfocitos en el apéndice cecal y bazo de conejos control con los diferentes anticuerpos monoclonales.	33
Cuadro 6.- Valores normales obtenidos con la prueba de inmunoperoxidasa en conejos sanos de dos meses de edad mencionados en el cuadro 2.	34
Cuadro 7.- Valores normales obtenidos con la prueba de inmunoperoxidasa en conejos sanos de dos meses de edad mencionados en el cuadro 2.	35
Cuadro 8.- Proporción de células positivas a la tinción con verde rápida - pironina "Y" en los dos conejos sanos.	35
Cuadro 9.- Valores normales encontrados en los conejos sanos de células plasmáticas con la tinción de verde rápido - pironina "Y" en el apéndice cecal.	36
Cuadro 10.- Valores normales encontrados en los conejos sanos de células plasmáticas con la tinción de verde rápido - pironina "Y" en el bazo.	36
Cuadro 11.- Proporción de linfocitos en el apéndice cecal y bazo del conejo inoculado con caldo soya tripticaseína (CST), con los diferentes anticuerpos monoclonales.	38
Cuadro 12.- Proporción de células positivas a la tinción con verde rápida - pironina "Y" en el conejo inoculado con caldo soya tripticaseína.	39
Cuadro 13.- Proporción de linfocitos identificados en el apéndice y bazo de conejos inoculados con la cepa de <i>E. coli</i> K12 con los diferentes anticuerpos monoclonales.	40
Cuadro 14.- Proporción de células positivas a la tinción con verde rápido - pironina "Y" en los conejos inoculados con la cepa de <i>Escherichia coli</i> K12.	41
Cuadro 15.- Proporción de células positivas a la tinción con verde rápido - pironina Y en los conejos inoculados con la cepa de <i>Escherichia coli</i> EDL933.	41
Cuadro 16.- Proporción de linfocitos en el apéndice y bazo de conejos inoculados con la cepa EDL933 con los diferentes anticuerpos monoclonales.	42
Cuadro 17.- T de student realizada comparando los datos de los conejos sanos y los conejos inoculados con CST, la cepa K12 y EDL 933 de <i>Escherichia coli</i> .	43
Cuadro 18.- Diferencias significativas entre los conejos inoculados con la cepa K12 y EDL933 de <i>Escherichia coli</i> .	44
Cuadro 19.- T de student realizada para los datos de las células plasmáticas marcadas en los conejos sanos comparando con los conejos inoculados con CST, la cepa K12 y EDL933 de <i>Escherichia coli</i> .	45
Cuadro 20.- T de student comparativa entre las cepas K12 y EDL 933 para las células plasmáticas.	45

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1.- Transmisión de <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	7
Fig. 2.- Método para la estandarización de la prueba.	25
Fig. 3.- Corte histológico del apéndice cecal teñido con H-E, en donde las letras indican los sitios de conteo de linfocitos en la vellosidad y los números en el nódulo. Tomada de Valdivia, 2002.	29
Fig. 4.- Técnica quirúrgica para la inoculación de <i>Escherichia coli</i> en apéndice cecal de conejo.	32
Fig. 5.- Fotografía de un corte histológico del apéndice cecal de un animal sano, teñido con H-E, en la cual se indican en que estructura del órgano se encuentran en mayor cantidad los diferentes tipos de anticuerpos monoclonales.	37
Fig. 6.- población de linfocitos marcados con CD4 en los diferentes órganos de los conejos inoculados.	46
Fig. 7.- población de linfocitos marcados con CD5 en los diferentes órganos de los conejos inoculados.	47
Fig. 8.- población de linfocitos marcados con CD25 en los diferentes órganos de los conejos inoculados.	48
Fig. 9.- población de linfocitos marcados con CD43 en los diferentes órganos de los conejos inoculados.	49
Fig. 10.- población de linfocitos B en los diferentes órganos de los conejos inoculados.	50
Fig. 11.- Corte histológico del bazo de un conejo sano con la reacción de inmunoperoxidasa, en el cuál las flechas indican las células marcadas con el anticuerpo monoclonal CD43.	51
Fig. 12.- Corte histológico del bazo de conejo inoculado con GST con la reacción de inmunoperoxidasa, en el cuál las flechas indican las células marcadas con el anticuerpo monoclonal CD43.	51

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

CARACTERÍSTICAS GENERALES.

El nombre de la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) proviene de su descubridor Theobald Escherich, es un habitante normal de la microbiota intestinal de los animales, pudiendo llegar a convertirse en uno de los más importantes patógenos emergentes cuando las condiciones son las adecuadas para su crecimiento. Las enfermedades más comunes causadas por *Escherichia coli*, son infecciones del tracto digestivo, del tracto urinario, septicemia, mastitis, síndrome urémico hemorrágico (SUH), enfermedad edematosa porcina, enfermedad edematosa bovina y colitis hemorrágica (CH), además de que su importancia también radica en la zoonosis, lo que puede ocasionar SUH, CH, púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) (Schaechter y col, 1993; Salyers y col, 1994; Valdivia, 1995; Begue y col, 1998; Donohue-Rolfe y col, 1999; Menge y col, 1999; Blanco y col, 2000).

E. coli, es un bastón corto, Gram negativo, forma colonias lisas, circulares, convexas, con bordes bien diferenciados, es anaerobia facultativa, crece en el medio diferencial /selectivo como lo es el agar MacConkey; esta bacteria tiene las características mostradas en el cuadro 1.

Cuadro 1.- Principales características de *E.coli*

Arginina	(-)	Movilidad	(+)
Citrato	(-)	Ornitina	(±)
Catalasa	(+)	Fenilalanina	(-)
Glucosa	(+)	Sacarosa	(±)
Gas	(+)	Ureasa	(-)
H ₂ S	(-)	Indol	(+)
Lisina	(-)	Lactosa	(-)

La identificación de las variedades patogénicas de la bacteria se puede realizar de diferentes formas: Por cultivo y aislamiento de la bacteria, pruebas bioquímicas, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), serotipificación y separación inmunomagnética utilizada en la actualidad según los estudios realizados por Blanco y col (2000). La serotipificación es evidenciando a los antígenos existentes en cada variedad de la bacteria, estos antígenos son: (Gyles y col, 1986; Valdivia, 1995; Donohue-Rolfe y col, 1999).

Ag "O", este se refiere al lipopolisacárido (LPS) de la membrana celular.

Ag "H", se refiere a las proteínas del flagelo.

Ag "K", son los polisacáridos presentes en la cápsula.

Ag "F", proteínas de las fimbrias

FACTORES AUXILIARES DE VIRULENCIA

Se han demostrado una gran variedad de estructuras presentes en *E. coli* en cuanto a los factores de virulencia de la bacteria, como lo son la membrana celular, cápsula, pilis y sus productos de secreción en los que se incluyen las enterotoxinas, citotoxinas, hemolisinas y aerobactinas, entre otras (Gyles y col, 1986).

La cápsula es un polisacárido que interviene en la colonización del intestino, contribuye en la formación de microcolonias que producen un daño severo al epitelio intestinal, puede evitar que la bacteria sea fagocitada y presentar pocos antígenos al sistema inmune del hospedador; la membrana celular que es un lipopolisacárido (LPS), se ve implicada principalmente en variedades de *E. coli* invasivas cuando los complejos de ataque formados por la activación del complemento son depositados a gran distancia de la membrana citoplasmática que va a destruir. El LPS estimula a los macrófagos y otras células que producen citocinas causando graves daños en el hospedero; la inducción del factor de necrosis tumoral (TNF) e interleucina 1 (IL-1) por el LPS provoca alteraciones que pueden ser visibles como la fiebre, coagulación intravascular diseminada y septicemia; también interviene en la inhibición bactericida, además de inhibir al complejo C6 del complemento (Gyles y col, 1986).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Existen dos tipos de fimbrias; las fimbrias de tipo 1 se caracterizan porque la D-manosa inhibe la hemoaglutinación y se denominan antígenos F1, las fimbrias de tipo 2 no es inhibida por la D-manosa, por ejemplo los antígenos fimbriales K88 y K99 que se denominan F4 y F5 respectivamente (Gyles y col, 1986; He y col, 1996; Pérez, 2002).

Las enterotoxinas vinculadas a la *E. coli* son de dos tipos, termolábiles (LT) y termoestables (ST), en la primera su principal acción es estimular a la adeniliclasa en las células del epitelio intestinal provocando una hipersecreción de agua y electrolitos a la luz intestinal; también aumenta la permeabilidad vascular y eleva los niveles del monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) en los tejidos, estos cambios de niveles del AMPC, después de la exposición a la LT pueden ser utilizados para analizar a esta toxina. El modo de acción de esta toxina en el intestino es el mismo utilizado por la toxina del cólera. La enterotoxina termoestable (ST) tiene peso molecular bajo y es capaz de inducir diarreas, existen dos subgrupos de la ST, STa o STI y STb o STII; La STa se caracteriza por ser soluble en metanol y tener la habilidad de inducir la acumulación de fluidos en el intestino del ratón que recibió la toxina vía oral o intragástrica. Este tipo de ST puede ser producida por *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) de humano, bovino o porcino, STa provoca una rápida elevación de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) en las células epiteliales del intestino, pero esta acción es rápidamente contrarrestada si la STa es removida. La STb es producida por ciertas variedades de ETEC porcina, usualmente se encuentra asociada con la enterotoxina STa, LT o STa y LT; es insoluble en metanol e inactiva en los experimentos realizados con ratones recién nacidos, esta es activa en el intestino de ratones, ratas, vacas y conejos. Estas enterotoxinas también tienen una función neutralizante de anticuerpos, provocando un incremento de prostaglandinas E₂ (PGE₂) en las células de la mucosa intestinal teniendo como resultado abundante diarrea (Gyles y col, 1986).

La verotoxina (VT) o "Shiga like toxin" (SLT) o toxina semejante a *Shiga*, ha sido asociada a la enfermedad del edema en cerdos, el nombre de verotoxina deriva de su afinidad por destruir células Vero en un cultivo y el nombre SLT es porque tiene una relación antigénica en cuanto a su función con la toxina de *Shigella dysenteriae*; estas toxinas VT son codificadas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

en el genoma bacteriano por la lisogenización con bacteriófagos, de los que se han estudiado principalmente 2 tipos que son diferentes tanto morfológicamente como genotípicamente, al mediar 2 toxinas con diferencias antigénicas, estos dos fagos, al igual que sus toxinas se han llamado VT1 (SLT I) Y VT2 (SLT II). Los fagos fueron extraídos de una cepa del serotipo O157:H7 (EDL933) aislada de un humano y nombrada como EDL933 y han sido introducidos en una cepa de *E. coli* de laboratorio denominada K12 C600 con esto se obtuvieron la lisogenizadas 933J y 933W productoras de VT1 y VT2 respectivamente. Cabe aclarar que la mayoría de las cepas apatógenas fermentan el sorbitol, a excepción de la EDL933 (O157:H7), por lo cuál es fácil su identificación en la presentación de infecciones (Gyles y col, 1986; Valdivia, 1995; Pérez, 2002).

Todas las Verotoxinas o "Shiga-like toxins" tienen subunidades de proteínas A-B, siendo una A y cinco B, sus acciones principales son la inhibición de la síntesis de proteínas atacando a la subunidad 28s del RNA ribosomal; provocan daño al endotelio vascular, así como edema, hemorragias y trombosis, se sugiere que la síntesis de la toxina se auxilia de algunos factores como la bilis, tripsina y agentes antimicrobianos que pudiesen estar presentes en el intestino. Los diversos tipos de citotoxinas que produce la bacteria entre ellas las que dañan a las células Vero (VT) son las que más se han estudiado (Gyles y col, 1986; Richarson y col, 1992; Valdivia, 1995).

E. coli produce diferentes tipos de toxinas como el factor citotóxico necrotizante (CFN1 y CFN2), éste provoca necrosis de la piel del conejo y células multinucleadas con redondeamiento en cultivos de células HeLa, CHO o Vero; estas cepas se han aislado de niños y bovinos (Valdivia, 1995).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CLASIFICACIÓN

Las cepas de *E. coli* causante de diarrea en humanos se han clasificado en base a sus factores auxiliares de virulencia en Patotipos de los cuáles se derivan:

A) Enteropatógena (EPEC).- Se adhiere a las células mucosas del intestino delgado, hay pérdida de las microvellosidades y en ocasiones llegan a penetrar a las células, la infección por este tipo de *E. coli* provoca diarrea acuosa, habitualmente autolimitada, pero puede ser crónica. Las cepas se identifican mediante la tipificación del antígeno O y en ocasiones el antígeno H. Este grupo se ha subdividido de acuerdo al patrón de adherencia que presentan en cultivos celulares. Provoca el fenómeno de "attachment and effacement" (A/E) dónde, se "borran" las vellosidades del borde de cepillo, esto es debido al rearrreglo de la actina cuando la bacteria se adhiere resultando una formación como de pedestal de la microvellosidad debajo de la bacteria (Schachter y col, 1993; Salyers y col, 1994; Begue y col, 1998).

B) Enterotoxigénica (ETEC).- Es causa común de la "diarrea del viajero" y diarreas en lactantes en países "subdesarrollados", la infección producida es similar a la del cólera pero generalmente estas diarreas no son tan severas. Algunas cepas producen exotoxina termolábil (LT). La LT produce cruce antigénico con la toxina de *Vibrio cholerae*. Otra toxina que producen ya sea sola o junto con la LT es la exotoxina termoestable (ST_a); existe otra toxina termoestable ST_b, la cuál estimula la secreción de agua independientemente de un nucleótido cíclico. Estas cepas no son invasivas, sin embargo su principal modo de ataque son sus toxinas (Schachter y col, 1993; Salyers y col, 1994; Begue y col, 1998).

C) Enteroinvasiva (EIEC).- Produce una enfermedad muy parecida a la Shigelosis, porque invaden la mucosa intestinal de manera semejante y provocando disentería, el mecanismo de acción es produciendo proteínas de membrana externa que están relacionadas con la invasión a la mucosa. No fermentan la lactosa y carecen de motilidad (Schachter y col, 1993; Salyers y col, 1994; Begue y col, 1998).

D) Enteroagregativa (EAggEC).- Causa diarrea aguda y crónica en niños de países en desarrollo. Tiene una capacidad única de adherirse a células Hep-2 en un patrón que se ha

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

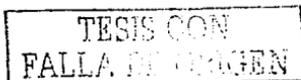
denominado adherencia agregativa, no invaden células epiteliales, produce una hemolisina y se menciona que su adherencia se debe a genes codificados en plásmidos (Schaechter y col, 1993, Salyers y col, 1994; Begue y col, 1998).

E) Enterohemorrágica (EHEC).- Produce la llamada Verotoxina, llamada así por afectar a las células de la línea Vero, que causa el síndrome urémico hemolítico (SUH), el cual puede llegar a producir insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia. Esta toxina tiene algunas propiedades parecidas a la toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1, sin embargo las dos toxinas son antigénica y genéticamente distintas. El serotipo más común que produce la toxina es el O157:H7, este no fermenta el sorbitol como las demás *E. coli*. Provoca colitis hemorrágica que puede prevenirse con la cocción adecuada de la carne de bovino. Es de importancia mencionar que este tipo de bacteria no produce ninguna de las toxinas LT ni ST, pero tiene otros factores de virulencia como el LPS. Provoca la lesión llamada "attachment and effacement" (A/E) vista también en las cepas de EPEC (Schaechter y col, 1993; Salyers y col, 1994; Begue y col, 1998).

MODO DE TRANSMISIÓN DE EHEC

Se sabe que el bovino es un reservorio de la cepa O157:H7 (EDL993), debido a que frecuentemente se han reportado los aislamientos de la bacteria en leche, carne fresca, además de encontrarse en el cerdo, aves, cornero, vegetales, agua y embutidos; demostrándose que algunas cepas aisladas de los bovinos producen las VT1 y VT2 por lo que se asocia la enfermedad al consumo de la llamada comida rápida siendo el principal factor causante de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. Aunque la enfermedad de colitis hemorrágica se menciona que es autolimitante, no se saben los mecanismos para tener un control de esta. Los estudios realizados en los bovinos han demostrado la existencia de receptores para la VT en el epitelio gastrointestinal, pero no se han encontrado en la vasculatura, por lo que se observa la aparente resistencia del bovino a los efectos sistémicos de la toxina (Salyers y col, 1994; Begue y col, 1998; Menga y col, 1999; Elaine y col, 2002).

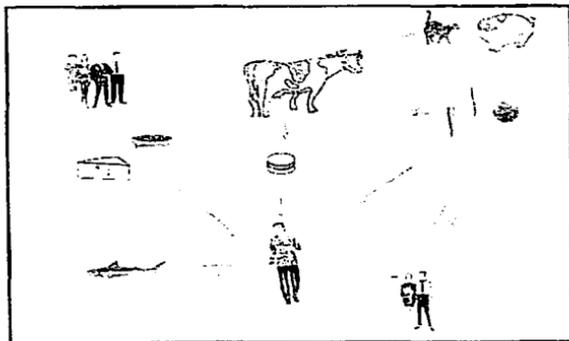
La transmisión persona a persona por vía fecal-oral también es muy importante en una segunda fase, infectándose frecuentemente los familiares (Blanco y col, 2000). Los animales



pequeños son más sensibles a la infección llegando a morir a causa de las diarreas sanguinolentas que presentan y en los seres humanos los niños y ancianos son más susceptibles aumentando esto en el verano (Valdivia, 1995; Konadu y col. 1999; Blanco y col, 2000).

Los animales se infectan con *E. coli* debido al contacto con el excremento acumulado en los corrales y el contacto con otros animales. El hacinamiento es otro de los factores de transmisión de la enfermedad, así como el agua y alimentos contaminados; muchos de los lechones, perros, etc. se contagian por la misma madre (fig. 1). Se menciona una fuente primaria para la infección como causante de zoonosis (Blanco y col, 2000).

Fig. 1.- Transmisión de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)



Vías de transmisión de *E. coli* enterohemorrágica. las flechas que conectan las diversas figuras indican la dirección de la contaminación. El principal reservorio es el ganado bovino, pero otros animales como el cerdo o las mascotas (perro y gato) pueden también actuar de reservorios. A partir de estos animales, el ser humano puede infectarse directamente mediante alimentos lácteos o cárnicos o por la contaminación de vegetales. Los humanos contaminados pueden contagiar a otros directamente o a través de la contaminación de alimentos. También la contaminación fecal de las aguas o la falta de higiene en el procesamiento industrial puede explicar la presencia de esa bacteria en los pescados (Figura tomada de cienciahoy.com).

PATOGENIA

La bacteria al ser ingerida en cantidades infectantes, lo que puede ser de menos de 100 bacterias, llega al intestino donde sus verotoxinas son liberadas y fijadas a los receptores celulares formados por glicolípidos (Gb3 o Gb4). Estas toxinas inhiben la síntesis de proteínas al inactivar catalíticamente la subunidad ribosomal 28S, inhibiendo el factor de elongación, lo que lleva a la muerte celular; al llegar a la vasculatura las células endoteliales sintetizan el factor de coagulación VIII por lo que al estar de forma anormal provoca una trombocitopenia, coagulación intravascular local y una acumulación de fibrina en el SNC, en tubo digestivo y riñón. Además sus fimbrias plasmídicas codificadas por el gen CDV419 unen a las bacterias al intestino y por medio de unas proteínas en su membrana externa llamadas intiminas (codificadas por el gen eae) provocan lo que se denomina el A/E, borrando las microvellosidades intestinales (Schachter y col, 1993; Begue y col, 1998; Blanco y col, 2000; Pérez, 2002)

La EHEC es la más común en infecciones de niños en países desarrollados, predominando la diarrea como síntoma; la diarrea puede considerarse que se produce en dos partes, la primera se realiza con la colonización del intestino que se produce de manera intensiva y la acción del LPS. Se menciona que el pili de la bacteria juega un papel esencial en la colonización y el fenómeno de A/E en la superficie del epitelio intestinal. Después de la diarrea le sigue una anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia, disfunción renal y en raras ocasiones complicaciones neurológicas, principalmente en los adultos, rara vez se llega a presentar en los niños. Los factores principales en la colonización incluyen la edad, el pH gástrico y la presencia en el intestino de anticuerpos específicos. La microvasculatura renal expresa grandes cantidades de Gb3, por lo que es altamente susceptible a las toxinas de *E. coli*. El daño al endotelio vascular es debido a la circulación de las exotoxinas de la bacteria, las endotoxinas y citocinas que el huésped produce como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1- β (IL-1 β), los cuales juegan un papel importante en la activación de las células endoteliales por medio de las toxinas. Algunos estudios reportan que el receptor Gb3 es muy sensible a la verotoxina 1, debido a la activación por el LPS o citocinas, aunque suele haber una discusión en cuanto a esto, ya que autores como Van Setten (1997) en sus estudios

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

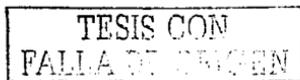
realizados con el TNF- α , sugiere que es este el que logra la mayor sensibilización en la microvasculatura renal (Richardson y col, 1992; Brown y col, 1997; Stefan y col, 1998; Konadu y col, 1999).

Se sabe que estas verotoxinas provocan un decremento de linfocitos especialmente los T, aunque también se afectan en menor grado los linfocitos B, en los cuales se estimula el fenómeno de apoptosis (Marcato y col, 2001; Watson y col, 1996); en contraste, cabe mencionar que la toxina Stx no provoca muerte celular, pero impide el aumento de la actividad metabólica de estos, por lo cual no hay una respuesta satisfactoria inmunológica debido a la ausencia de IgG anti-Stx. Se cree que las variedades de *E. coli* que provocan diarrea no causan infecciones en el sistema urinario ni meningitis; en algunos estudios hechos en España los métodos empleados para la detección de las cepas del serotipo O157:H7 utilizan los medios de MacConkey-sorbitol con telurito y cefixima, no obstante se han encontrado cepas que no son capaces de crecer en presencia de telurito y cefixima y cepas fermentadoras de sorbitol. Las cepas fermentadoras de sorbitol pertenecen al serotipo O157:H7, para poder detectar el resto de los serotipos se identifican la producción de verotoxinas por técnicas fenotípicas (citotoxicidad en células Vero y HeLa), genotípicas (hibridación, PCR) o inmunológicas como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (Blanco y col.2000).

Se ha demostrado que el LPS de *E. coli* productora de VT, aumenta el daño sobre células endoteliales en cultivo, además de que el efecto es aumentado por mediadores de la inflamación como el TNF - α , la IL - 1, o la linfotoxina TNF - β , se piensa que esto se debe a la unión más específica de la toxina a las células (Valdivia, 2002).

DESARROLLO DE MODELOS ANIMALES

En 1997 Brown y col. realizaron un experimento para obtener un modelo animal con becerros de 6 semanas de edad en la infección por *E. coli*, siendo estos inoculados con 5 diferentes variedades de la bacteria, los animales fueron hospedados de manera individual con el microclima controlado, teniendo un drenaje individual y limpiando el lugar una vez al día. Se les realizó estudios en las heces para diagnosticarlos libres de diarrea viral bovina,



coronavirus, rotavirus, *E. coli* y *Cryptosporidium* por el método de inmunofluorescencia. Al final del experimento observaron que realmente no se desarrolla una patogenia en los becerros, por lo cual se descartaron como modelos animales.

Igualmente Donohue-Rolfe y col. (1999) desarrollaron un experimento con cerdos nacidos vía cesárea, los cuáles se mantuvieron en aislamiento de manera estéril mientras duró el experimento. A las 24 horas de nacidos se les inoculó vía oral *E. coli* O157:H7 y se les aplicó un antisuero demostrándose que la oportuna aplicación del mismo evita en gran medida las lesiones provocadas por esta bacteria. Estos experimentos con cerdos son técnicamente difíciles para los estudios de virulencia de las variedades de la bacteria.

Otro animal que se ha utilizado como modelo para investigación ha sido el babuino, en los experimentos de Taylor y col. en 1999 utilizaron dos grupos, donde a un grupo les inoculó por medio de una infusión intravenosa una dosis alta (2,0µg/Kg) y al otro grupo se le administró una dosis baja (0.05 a 0.2 µg/Kg); en los dos grupos se presentó hipercalemia y colitis hemorrágica en el grupo con la dosis alta, el grupo con la dosis baja presentó SUH. En este estudio se observó la asociación del daño en el epitelio del túbulo proximal y en la mucosa y submucosa del intestino delgado con la presencia del receptor Gb3 para VT1.

El conejo se ha utilizado en diferentes ensayos en los que se detectan toxinas producidas por los diferentes serotipos de *E. coli*; este modelo animal desarrolla un daño vascular inducido por la VT1 en el endotelio infectado por *E. coli* O157:H7, estas lesiones son similares a la encontradas en riñones y otros tejidos en humanos con el SUH, por lo cual es muy utilizado en el estudio de la patogénesis de la enfermedad y como afecta a la inmunidad, ya que se sabe de la depleción linfocitaria que provoca la bacteria en el bazo y otros órganos linfoides como el apéndice cecal del conejo. Se ha sugerido que el apéndice cecal del conejo es un órgano linfocitario secundario, se han realizado estudios para conocer mejor la función de este órgano en el conejo y se piensa que posiblemente su función es la de presentación de antígenos, además de absorber los nutrientes y secretar sustancias. La mucosa presenta dos tipos de epitelio, uno cilíndrico con células caliciformes intercaladas en las proyecciones alargadas "fungiformes" y otro cuboidal bajo, casi aplanado a nivel de las proyecciones cortas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

lanceoladas: se menciona que el primer tipo puede tener la función de absorber y secretar diversas sustancias mientras que el segundo tipo parece tener una función linfoide, teniendo células captadoras y presentadoras de antígenos. Esto lo han estudiado diversos investigadores denominando a las proyecciones cortas (lanceoladas o piramidales) como "Domo" de linfocitos y a las proyecciones fungiformes como "Vellosidades" (Richarson y col, 1992; Salyers y col, 1994; Valdivia, 1995; Pospisil y col, 1996; Lelovard y col, 2001; Valdivia, 2002).

ANTECEDENTES DE EHEC

E. coli enterohemorrágica tiene un serotipo más frecuente encontrado en las infecciones y es el O157:H7; el cuál tiene dos características especiales de patogenicidad, la primera debido a la producción de las citotoxinas y la segunda es un gen homólogo al del EPEC, por lo que se piensa que la adhesión a las células es mediado por reorganización de actina, estas dos variedades poseen un gen similar para intimina (gen *eae*), el cuál produce A/E: el gen que codifica la toxina VT se encuentra en un bacteriófago, temperado similar a la toxina de la difteria (Salyers y col, 1994). La infección por EHEC fue reconocida por primera vez en 1982 en E. U. en dos brotes de colitis hemorrágica que afectaron a 47 personas que comieron en diversos restaurantes de la misma cadena de comida rápida, el serotipo encontrado fue el O157:H7 raramente aislado en ese tiempo, desde entonces ha provocado diversos brotes, tanto en E.U., Canadá, Japón y el Reino Unido. En estos países este serotipo es la causa principal de diarrea sanguinolenta y el segundo o tercer patógeno bacteriano más frecuentemente aislado de coprocultivos, después de *Salmonella* y *Campylobacter* (Blanco y col, 2000). En 1993 se presentó un brote de diarreas en niños de E.U. que habían consumido hamburguesas, varios de estos niños murieron, otros niños presentaron SUH, el laboratorio demostró la existencia de la EHEC O157:H7. El serotipo O157:H7 ha provocado en los últimos años brotes de colitis hemorrágica en los países anglosajones, en Japón y España con fuertes brotes de la enfermedad principalmente en niños y adultos; además de presentarse en algunos países desarrollados y subdesarrollados. La infección por EHEC ha recibido diferentes denominaciones en la literatura científica como *E. coli* verotoxigénicas, *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* productores de Shiga like toxins (SLT), y el serotipo O157:H7 es

conocido popularmente como el bacilo O157 y la bacteria de las hamburguesas (Jacewicz y col, 1999; Blanco y col, 2000).

Diferentes variedades de *E. coli*, incluyendo la EPEC, ETEC y la EHEC están asociados a la presentación de diarreas en perros, tanto cachorros como adultos, la importancia de esto es la zoonosis que se puede atribuir a EPEC y EHEC, esta última ha sido aislada de perros sanos y perros con diarrea, observándose el fenómeno de A/E en el epitelio intestinal (Holland y col, 1999). En los bovinos, *E. coli* provoca la lesión de A/E en neonatos y bovinos no mayores de los tres meses de edad, contrariamente en los adultos, estos parecen presentar un estado de inmunidad natural para el gen eae y/o la secreción de ciertas proteínas pueden complicar el desarrollo de esta lesión (Baehler y col, 2000).

LESIONES PROVOCADAS POR *Escherichia coli* Enterohemorrágica (O157:H7)

En los experimentos realizados por Valdivia (1995), con conejos y la cepa EDL933 productora de VT1 y VT2 la mayoría de los animales del experimento presentaron diarrea de los 2-4 días, con signos de depresión, emaciación y deshidratación severa, cianosis marcada en las orejas, no se presentó variaciones de temperatura. Al estudio histopatológico se encontró infiltrado de células mononucleares abundantes y escasos polimorfonucleares, gran cantidad de eritrocitos y zonas ulceradas en la mucosa del intestino grueso. Hubo una disminución severa de linfocitos e infiltrado linfocitario perivascular (linfocitos maduros) en la submucosa del órgano, hemorragias y contenido hemorrágico de manera general. El bazo presentó pigmento ocre en las macrófagos y disminuyó su tamaño.

En una observación clínica realizada por Valdivia (1995), en bovinos lactantes y adultos, los resultados fueron los siguientes:

Animales lactantes.- diarrea hemorrágica con sangre completa, deshidratación severa, algunos presentaron patalco, tortícolis y muerte rápida; a la necropsia se observó enteritis hemorrágica (en ileon y ciego), úlceras en abomaso, intestino grueso y/o intestino delgado con infiltrado polimorfonuclear y fibrina, edema subcutáneo y gástrico, destrucción marcada de vellosidades y fusión de algunas de ellas con infiltrado mononuclear, células de submucosa con

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

pigmento de color ocre, la pulpa blanca del bazo presentó depleción linfoide. En el aislamiento bacteriológico y pruebas bioquímicas se determinó la existencia de *E. coli* causante de los daños, la identificación de cepas productoras de hemolisinas fueron de poca utilidad, ya que la mayoría era no citotóxica sin encontrarse estos resultados en los adultos que estuvieron sanos clínicamente. En cuanto a las verotoxinas la mayoría de las cepas fueron productoras de ésta, tendiendo a ser más frecuente en la sala de lactancia (Valdivia, 1995).

Otro investigador del tema es Brown y col. (1997), ellos inocularon 12 becerros con 5 diferentes variedades de *E. coli* enterohemorrágica por vía oral por medio de leche, para determinar las respuestas clínicas de estos animales y la magnitud de estos, además de los sitios de localización de la bacteria en el tracto digestivo, y su segundo objetivo fue desarrollar el modelo animal en la infección por *E. coli*. Sólo dos de los animales presentaron diarrea sin causa aparente y se logró cultivar la bacteria solo por medios enriquecidos, otros animales presentaron ligera pirexia, linfocitosis y neutrofilia no muy marcada. La bacteria decreció en forma dramática a los 14 días post-inoculación y después de los 20 días solo podía cultivarse *E. coli* en un medio enriquecido. Los sitios de localización de la bacteria fueron principalmente en rumen, omaso y retículo. En cuanto a lesiones macroscópicas y microscópicas (principalmente A/E) no fueron observadas en ningún animal; por lo tanto se concluyó que en los becerros no se presenta la enfermedad, además de que se sugiere que una buena alimentación de los becerros hace que la bacteria sufra un decremento en su diseminación.

En cuanto al receptor Gb3, no se ha observado su incremento o su expresión debido a citocinas inflamatorias o por el LPS en los pequeños vasos, se dice que puede llegar a incrementarse con la presencia de la VT 1 y la VT 2, sin embargo, se menciona que ambas toxinas incrementan la expresión de este receptor, e incluso la VT 2 es la que más lo incrementa (Jacewicz y col, 1999).

Taylor y col. (1999) concluyeron que el daño a las estructuras glomerulares y tubulares del riñón pueden ocurrir independientemente de la trombosis microangiopática, hay un especial interés en que los mediadores de la inflamación se encontraron en gran medida en el riñón.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Finalmente concluyeron que el modelo animal es válido utilizando una dosis baja de la cepa y que puede ser utilizada en diversos estudios para conocer las variantes de este síndrome.

EXPERIMENTOS REALIZADOS PARA COMBATIR Y NEUTRALIZAR LA BACTERIA Y SUS TOXINAS

Se han realizado diversos estudios para lograr combatir a la bacteria, dentro de los cuales se utilizan anticuerpos administrados pasivamente por medio de un antisuero para detener o controlar los efectos de la toxina, donde, los cerdos son un modelo de estudio para conocer en que tiempo se pudiese neutralizar la toxina: los signos que presentan estos animales son ataxia, recumbencia, incoordinación, y muerte, al estudio histopatológico se encontraron lesiones en colon e ileon, ya que se desarrolló el fenómeno de A/E, algunas bacterias atacaron directamente a la superficie apical de las células epiteliales perdiendo su citoplasma apical, además de que la vasculatura presentó gran asentamiento de linfocitos. Este experimento obtuvo como resultados que la mayor eficacia de este antisuero fue al aplicarlo 24 horas posterior a la exposición a la bacteria: en experimentos realizados con ratones y la Verotoxina 1 se concluyó que son los mismos daños presentados en riñones y otros tejidos como diarrea, edema y hemorragias en la mucosa y submucosa de colon, ciego y la muerte que en las personas con SUH (Richarson y col, 1992; Donohue-Ralfe y col, 1999).

Konadu y col. (1999) se han dedicado a investigar la subunidad B no tóxica de la Verotoxina 1 ya que esta puede inducir un anti-LPS y/o anticuerpos que logran neutralizar a la toxina, pero no neutraliza a la Verotoxina 2; Esto lo descubrieron obteniendo un polisacárido O- específico de dicha subunidad.

Microscópicamente se sabe que la Stx1 provoca una acción altamente susceptible de tipo citotóxica a las células B de los humanos, donde la mayoría proviene de IgG e IgA, donde se tiene la teoría de que el problema radica en la falta de IgG anti-Stx, esta la revocó un investigador, el cual encontró IgG anti-Stx 2; La importancia de esto es la depleción linfocitaria encontrada en becerros infectados con *E. coli*, por lo que Menge (1999) mencionó que se debía a la estimulación de la Stx hacia las células B provocando su apoptosis, mediado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

por el LPS; en cuanto a las células mononucleares sanguíneas el efecto es disminuir la activación y proliferación de estas células sin causar su muerte teniendo todavía una actividad del 50%. Este autor menciona que la apoptosis observada pudo ser inducida por sustancias secretadas por la bacteria como el ácido butírico (Menge y col, 1999).

La técnica desarrollada por Conos y Kaplan en 1950 de inmunofluorescencia indirecta fue la primera en describir la localización del antígeno en los tejidos utilizando la fluorescencia por medio de anticuerpos, debido a que estos reaccionaban con muchos tipos de antígenos, era inexacta, se utilizaron enzimas como la peroxidasa del rábano y la fosfatasa alcalina intestinal de los becerros, además del desarrollo de la peroxidasa anti-peroxidasa y de la fosfatasa alcalina anti-fosfatasa alcalina. Con la introducción de los anticuerpos monoclonales por Köhler y Milstein en 1975 el problema del reconocimiento de antígenos se resolvió en gran medida debido a que estos anticuerpos reconocen específicamente a un epítipo. Además de esto, en la actualidad se han desarrollado anticuerpos monoclonales para reconocer el antígeno flagelar H7 de la *E. coli*, este lo desarrollaron He *et.al.* (1996) y mencionan que puede utilizarse solo o combinado con un anticuerpo monoclonal específico anti-O157, el cual también desarrollaron ellos (Tizard, 2000).

ACTIVIDAD INMUNOLÓGICA EN LOS ANIMALES

La respuesta inmunológica varía según el tipo de antígeno presente en el organismo, respondiendo con diversos mecanismos establecidos; se ha denominado a la inmunidad como una serie de eventos que otorgan protección frente a las enfermedades principalmente de tipo infecciosas, así como a la introducción de sustancias extrañas no infecciosas, con la neutralización de sus productos y eliminación de las lesiones que pudiesen provocar en los tejidos.

Se ha clasificado a la inmunidad en primer lugar en inmunidad innata y adaptativa; la primera también denominada natural o nativa está constituida por mecanismos existentes antes de que se desarrolle la infección, capaces de establecer una respuesta rápida y reaccionar de la misma manera a infecciones repetidas. Sus componentes principales son las

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

barreras físicas y químicas, como los son, epitelios y sustancias con propiedades antimicrobianas como las lágrimas; células fagocíticas como los neutrófilos, macrófagos y células citocidas naturales (NK); proteínas sanguíneas donde se incluyen el sistema de complemento y otros mediadores de la inflamación y proteínas llamadas citoquinas, que regulan y coordinan muchas de las acciones de las células que intervienen en la inmunidad celular.

La inmunidad adaptativa o específica, se desarrolla como una respuesta a la infección, teniendo las características de la especificidad y la memoria ante diversos antígenos; sus componentes son los linfocitos y sus sustancias que realizan una serie de eventos para la destrucción de los microorganismos. Este tipo de inmunidad se divide en humoral e inmunidad celular.

- La inmunidad humoral se compone de partículas presentes en la sangre denominadas anticuerpos, los cuáles son producidos únicamente por los Linfocitos B, estos reconocen específicamente a antígenos microbianos, neutralizan su virulencia y realizan diversos mecanismos efectores para su destrucción, tales como, la inducción a la fagocitosis, liberación de mediadores inflamatorios.
- Dentro de la inmunidad celular o inmunidad mediada por células, participan células llamadas Linfocitos T, que inducen la destrucción de los microorganismos que se encuentran dentro de los fagocitos o de las células infectadas, en estos casos los anticuerpos no tienen acceso a este tipo de microorganismos que son capaces de sobrevivir en las células, tiene principalmente dos funciones efectoras, las cuáles son activar a los macrófagos en las respuestas inmunitarias celulares y promover la producción de anticuerpos por las células B en las respuestas inmunitarias humorales; estas funciones están mediadas por citoquinas. Los linfocitos T se dividen en células T cooperadoras (CD4+), Th del inglés T-helper y citotóxicas (CD8+); los linfocitos Th están divididos en Th1 y Th2, los primeros secretan un conjunto específico de citoquinas como IFN- γ , IL-2, TNF- β , donde su función principal consiste en estimular la defensa mediada por los fagocitos contra las infecciones, especialmente las debidas a los microorganismos intracelulares; las células Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, cuyas funciones principales consisten en estimular las reacciones inmunitarias

mediadas por IgE y por eosinófilos/mastocitos y regular negativamente las respuestas de Th1 (Roitt y col, 1988; Abbas y col, 2000).

La inmunidad adaptativa tiene ciertas características fundamentales para desarrollar la respuesta ante los antígenos; estas características son:

- a) Especificidad, garantiza que microorganismos distintos estimulen respuestas específicas.
- b) Diversidad, permite al sistema inmunitario responder a una gran variedad de microorganismos.
- c) Memoria, da lugar a respuestas aumentadas a exposiciones repetidas al mismo microorganismo.
- d) Especialización, genera respuestas óptimas para la defensa frente a diferentes tipos de microorganismos.
- e) Autolimitación, todas las respuestas inmunitarias normales disminuyen de intensidad con el tiempo después de la estimulación por el antígeno, devolviendo al sistema inmunitario a su estado basal de reposo, proceso denominado homeostasis.
- f) Ausencia de autorreactividad, impide la producción de lesiones del huésped durante las respuestas a los microorganismos (Abbas y col, 2000).

Existe otra clasificación de la inmunidad, la pasiva y la activa; la primera se obtiene cuando a un individuo se le transfiere suero o linfocitos de otro previamente inmunizado, como por ejemplo en las vacunaciones. La inmunidad activa es cuando el individuo tiene contacto con un antígeno y se desarrolla una respuesta ante este (Roitt y col, 1988; Abbas y col, 2000; Tizard, 2000).

Las citocinas o citoquinas o interleuquinas, son proteínas o glucoproteínas de bajo peso molecular sintetizadas por diferentes tipos celulares, que actúan como mensajeros químicos u hormonales: sus funciones son reguladas de diferentes formas, como son mediante la regulación de la expresión de receptores, por antagonistas del receptor, unión específica a proteínas u otras citocinas que ejercen efectos contrarios. Por ejemplo, la IL-1 es un

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

coestimulador de las células TH2, junto con el antígeno y estimula la respuesta de la fase aguda, la IL-2 activa las células T, B, NK y a los macrófagos e interviene al potencializar la apoptosis en las células T, la IL-4 favorece el crecimiento y diferenciación de las células Th2 y estimulación de la producción de IgE por las células B; la IL-5 estimula el crecimiento de las células B y ayuda al crecimiento y la activación de los eosinófilos; la IL-6 promueve la diferenciación de las células B y la respuesta de la fase aguda por los hepatocitos para la síntesis de proteínas; la IL-10 inhibe la función de las células Th1 y suprime la función de los macrófagos. La IL-12 es un coestimulante de las células Th1 y activa las células NK, junto con el antígeno, la IL-13 estimula el crecimiento de las células B y suprime la función de los macrófagos (Raiit y col, 1988; Abbas y col, 2000; Pérez, 2002; Tizard, 2000).

RESPUESTA INMUNOLÓGICA PROVOCADA POR *Escherichia coli* O157:H7

Al principio de la infección la primera en aparecer es la IgG, que tiene las funciones de opsonización, activación del complemento, citotoxicidad mediada por células (NK, CDB) dependiente de anticuerpos inmunidad neonatal, inmunidad pasiva e inhibición por retroalimentación de las células B (Konadu y col, 1999, Abbas y col, 2000).

Los neutrófilos son los que se presentan en mayor cantidad circulando en sangre, teniendo una vida media de 5-6 horas; se piensa que el proceso de ingestión y destrucción de la bacteria intracelularmente hablando por los neutrófilos resulta en una aceleración de la apoptosis o muerte celular programada. Ahora se sabe que la oxidación es un posible mecanismo de la apoptosis en este tipo de células, al igual que el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Watson *et. al.* (1996) mencionan que la *E. coli* induce la producción de un producto oxigenado que acelera la apoptosis en los neutrófilos.

En los estudios realizados por Pérez (2002), se observó que los conejos inoculados con la cepa EDL933 disminuyó significativamente la respuesta de anticuerpos hacia una cepa de *Brucella abortus* muerta, lo cuál no se observó con los conejos inoculados con la cepa K12. Esto sugiere un efecto sistémico de la toxina sobre algún tipo de linfocito involucrados en la respuesta inmunológica, en el mismo estudio se observó la disminución de la respuesta de los conejos hacia la inoculación de la tuberculina igualmente en los conejos inoculados con la cepa

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

EDL933, realizada mediante una prueba de inmunoreacción. Se ha demostrado que el receptor para las toxinas de la cepa EDL933 de *Escherichia coli* se localizan en las células inmaduras de los centros germinales y en los linfocitos B activados productoras de IgG; Karmali (1994) en sus experimentos realizados no encontró receptor para la toxina en los linfocitos T, pre-T y las B maduras, aunque otros autores en sus experimentos realizados "in vitro" encontraron que la VT inhibe la proliferación de linfocitos T y B, así como, la disminución de su reactividad (Menge y col, 1999).

Se ha confirmado el efecto "supresor" de la respuesta inmune, tanto humoral como celular, esto se relaciona directamente con la secreción de IL en la respuesta, principalmente de la IL-10 producida por los macrófagos en respuesta a la estimulación por el LPS; esta IL-10 regula los linfocitos Th3, que a su vez inhiben la respuesta de los Th1 y Th2, que estimulan la activación de linfocitos T y B; también se menciona la participación de IL-8 e IL-1 secretadas por células del epitelio intestinal después de que la inoculación de la verotoxina, aunque al principio estas IL aumentarían la respuesta inflamatoria local con un aumento de la secreción de IL-10 (Pérez, 2002; Valdivia, 2002). En los estudios realizados por Pérez (1991) en humanos, observaron la presencia de IFN circulante durante la fase aguda del SHU, por lo cuál sugieren que las alteraciones de los porcentajes de linfocitos T y B circulantes pueden ser una consecuencia de la producción de IFN u otras IL.

En el estudio realizado por Klapproth y col. (2000) con *Escherichia coli* enteropatógena, la cuál también produce el fenómeno de "attachment and effacement" como la EDL933, se observó la producción de una "toxina" denominada Linfostatina, la cuál es secretado por un plásmido, esta linfostatina bloquea la activación de los linfocitos, ya que inhibe la producción de IL-2, IL-4, IL-5 y IF γ . Este comportamiento también se observó con la cepa EDL933.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

JUSTIFICACIÓN

El SUH es cada vez más frecuente en varios países desarrollados y subdesarrollados, como son EE.UU., Canadá, Japón, Reino Unido, Escocia y países anglosajones, donde desde 1983 se han reportado brotes de la enfermedad y de colitis hemorrágica, asociándose principalmente al consumo de carne de bovino contaminada. Existen evidencias de alteraciones sobre el sistema inmune de las personas y animales, así como del efecto de la VT sobre los linfocitos en experimentos "in vitro". En la FES-C se cuenta con un modelo animal en conejos que reproduce las alteraciones del SUH, incluyendo la lesión sobre los linfocitos.

Por lo que para establecer más la patogenia y poder establecer mejores medidas de prevención en el SUH y la Colitis hemorrágica es importante determinar el efecto que tienen las toxinas sobre las células del sistema inmune.

HIPÓTESIS

La presencia de *Escherichia coli* enterohemorrágica en la inoculación experimental en conejos en el apéndice cecal, disminuye la población linfocitaria existente en este órgano y en el bazo.

OBJETIVO GENERAL

Determinar que tipo de linfocitos son los más afectados en infecciones experimentales por *E. coli* 0157:H7 y la cepa K12 en el conejo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar el rango de algunas de las poblaciones de linfocitos presentes en el apéndice cecal y el bazo de los conejos sanos.

Evaluar el efecto sobre las poblaciones linfocitarias del apéndice cecal y el bazo causado por la inoculación experimental de *E. coli* K12 y O157:H7 en el apéndice cecal del conejo.

TESIS CON
FALLA EN EL REGISTRO

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de la fase experimental se utilizaron 9 conejos de la raza Nueva Zelanda de dos meses de edad con aproximadamente 1.5 Kg. de peso, provenientes de la granja de cunicultura Tepospixca. Los animales se mantuvieron en observación por un periodo de siete días y se procedió a la inoculación de cepas de *Escherichia coli*. Todo esto se realizó de la siguiente manera:

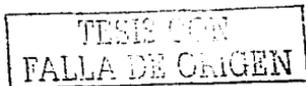
Cuadro 2. - Diagrama experimental con las cepas de *E. coli*

Inoculo	Núm. de animales
K12	3
EDL933	3
Caldo soya tripticasina (CST)	1
Controles	2

CEPAS UTILIZADAS

Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este experimento fueron la EDL933 (O157:H7) productora de Stx1, Stx2 y la cepa K12, rugosa, no productora de toxinas, negativa a β -lactamasa y apatógena. Estas cepas de referencia fueron donadas por la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal (FES-C).

La preparación de los inóculos se llevó a cabo sembrando una colonia de cada cepa en 5ml de caldo soya tripticasina, dejándolo incubar toda la noche a 37°C, utilizando 1 ml al otro día por la mañana para inocular a los conejos. Este inóculo contenía aproximadamente 5×10^9 unidades formadoras de colonias (U.F.C.) .Antes de la inoculación en el conejo, los cultivos fueron sembrados y se les realizó una prueba de pureza (Valdivia, 1995).



Se tomaron muestras de sangre a los conejos antes y después de la inoculación para realizar bioquímica y hematología. De los animales inoculados con la cepa EDL 933 se tomó la muestra un día después de la inoculación, al igual que a los conejos con CST y la cepa K12.

CIRUGÍA

Los animales fueron tranquilizados por vía intramuscular con 0.2 ml/kg de peso vivo de combelen (propionilpromazina 1%) y se les anestesió de manera general con ketamina en una dosis de 40mg/kg, se rasuró la región abdominal desde el xifoides hasta la porción inguinal, se lavó la zona y se procedió a colocar al animal en decúbito dorsal sobre la mesa de cirugía. Para la asepsia de la zona a incidir se utilizó cloruro de benzalconio en una dilución 1:100 y se procedió siguiendo las técnicas convencionales en la preparación del paciente.

La cirugía comenzó con una incisión por línea media de aproximadamente 4 cm, tomando en cuenta la cicatriz umbilical, 2 cm debajo de esta se realizó la incisión y una vez que se llegó a la cavidad abdominal se localizó el apéndice cecal y se expuso sobre gasas humedecidas con solución salina fisiológica (SSF) a temperatura ambiente (el segmento aislado fue irrigado durante la cirugía con SSF estéril); se delimitó el extremo final del saco ciego considerándose un segmento de aproximadamente 4cm, localizando la irrigación arterial se ligo un tramo para que en esa porción se realizará un corte transversal, siempre respetando la irrigación. Se procedió a la sutura de la porción cecal mediante una sutura invaginante (Valdivia, 1995).

Se procedió a lavar varias veces la luz del apéndice cecal aislado con SSF estéril a temperatura ambiente hasta que el saco quedó limpio y en ese momento se cambiaron los campos y material de cirugía; se continuó con una sutura tipo invaginante con doble línea de sutura (Cushing-Conell); un poco antes de terminar la segunda línea se inoculó 1 ml del cultivo bacteriano de las cepas K12 o EDL933, y al grupo control se inoculó con CST. Finalmente se regresó el apéndice cecal a su posición original y se procedió a cerrar la cavidad utilizando catgut absorbible doble cero y polipropileno doble cero para piel. La línea de incisión se limpio con cloruro de benzalconio y se le aplicó negasunt (coumaphos 3%, propoxur 2% y prortalbin 5%) (Valdivia, 1995; Pérez, 2002).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Todos los conejos se mantuvieron en observación (5-7 días) hasta presentar los primeros signos. A los animales que murieron se les realizó la necropsia para obtener el apéndice cecal y el bazo, los cuales fueron fijados en paraformaldehído al 4% y fijador de Zenker. La eutanasia de los animales que después de los 7 días continuaron con vida, se llevó a cabo con cloroformo y se obtuvieron muestras del apéndice cecal y el bazo. Después de 24 h de fijación, las muestras se incluyeron en parafina siguiendo los métodos convencionales. Las muestras se cortaron en el micrótopo a un grosor de 5 micras (μc) y con las muestras previamente fijadas con paraformaldehído al 4% se realizó la tinción de inmunoperoxidasa y a otras laminillas se les realizó la tinción con H-E. Las muestras fijadas en Zenker se tiñeron con verde rápido-pironina "Y" (Estrada, 1982; Gaete, 1996).

INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA

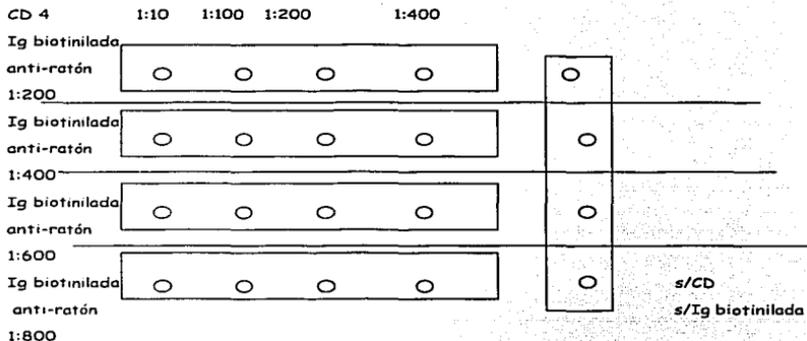
Estandarización de la prueba

Para la estandarización de la prueba se llevaron a cabo cortes de apéndice cecal y bazo fijados previamente en paraformaldehído obtenidos de animales inoculados en un trabajo previo por Valdivia (1995) con la cepa EDL933 de *Escherichia coli*, además se obtuvieron tejidos de animales sanos, los cuáles se fijaron de la misma manera y se cortaron a $5\mu\text{c}$. Se realizaron diluciones de cada anticuerpo monoclonal (Serotec) los cuáles fueron CD4, el cuál marca los linfocitos T cooperadores y los timocitos; el CD5 marca todos los linfocitos T y en el caso del conejo también marca todos los linfocitos B; el CD25 que marca las células que tienen receptores de IL-2 que son linfocitos T activados, células B y monocitos; el CD43 que marca todos los linfocitos T, timocitos, monocitos, macrófagos y linfocitos B activados, las diluciones fueron 1:10, 1:100, 1:200, 1:400, 1:600, 1:800 y 1:1,000, para así utilizarlos con la inmunoglobulina biotinilada en las diluciones recomendadas por el fabricante (1:200 a 1:600) (Estrada, 1982; Gaete, 1996; Abbas, 2000; Tizard, 2000)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cada dilución de los anticuerpos monoclonales fue probada con una dilución de la inmunoglobulina (Fig. 2); también se realizaron las pruebas a diferentes tiempos de incubación en cada paso, tomando en cuenta lo recomendado por el fabricante y la evaluación al microscopio considerando la reacción más fuerte y el menor ruido de fondo.

Fig. 2.- Método para la estandarización de la prueba



Cada uno de los anticuerpos se estandarizaron de manera separada y siguiendo el mismo esquema aumentando las diluciones hasta 1:1,000 de los anticuerpo monoclonales y con las diluciones recomendadas por el fabricante para la Ig biotinilada.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Técnica de Inmunoperoxidasas

Una vez que se obtuvieron y procesaron las muestras, se realizaron cortes y la técnica de inmunohistoquímica. Para ello se delimitó cada muestra y se colocaron en un baño con solución buffer tris (TBS) con un pH de 7.6 para su rehidratación por 5 minutos. Para inhibir la peroxidasa endógena del tejido se incubaron en cámara húmeda a 37°C con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 0.6% en metanol al 80% durante 7 minutos colocando en cada corte una gota del reactivo, pasado este tiempo se sacaron las laminillas de la cámara y se lavaron 3 veces con TBS pH 7.6 a temperatura ambiente durante 5 minutos, posteriormente se incubaron por 30 minutos en cámara húmeda a 37°C con suero normal de conejo a una dilución 1:5, decantando el resto del suero y se lavando para colocar en cada corte de muestra un anticuerpo monoclonal (CD4, CD5, CD25 y CD43) diluido 1:200, el tiempo de incubación fue de 1 h. Se lavó el exceso con TBS y se procedió a colocar la Ig biotinilada diluida 1:200 en TBS y se incubó por 1 h., transcurrido este paso se procedió a lavar de la forma acostumbrada y se colocó sobre las muestras el reactivo StreptABCComplex/HRP ya preparado con 1 h de anticipación, incubándose durante 45 min., seguido de esto se lavó y se les colocó diaminobenzidina (DAB) diluida, incubándose por 20 min., finalmente se lavó con agua destilada y se contrastó con hematoxilina de Harris (Hycel) por 15 segundos lavando el exceso de colorante con agua destilada y posteriormente con agua corriente. Hecho esto se les colocó una gota de medio de montaje (Sigma) para su observación rápida al microscopio y ver si fue suficiente el tiempo de contraste. Una vez obtenido esto, se les colocó una gota de etanol al 70°, 80°, 90,96 y xilol por 30 segundos cada paso y se colocó la resina sintética (Sigma) y el cubreobjetos (DAKO).

Las condiciones que se mantuvieron en esta técnica fueron la incubación en cámara húmeda a 37°C y los lavados con TBS a temperatura ambiente.

Para la observación en el microscopio los tejidos se dividieron en regiones de la siguiente manera (Fig. 3):

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Apéndice cecal

Vellosidad.- Base, intermedio y punta.

Nódulo.- Base, intermedio y punta.

Bazo

Pulpa roja.

Pulpa blanca.

Se tomaron fotos de cada laminilla, determinándose el porcentaje de los linfocitos que se encontraban marcados con la DAB empleando un analizador de imágenes y el programa estadístico "Statistica" para posteriormente realizar un promedio de estos.

TINCIÓN VERDE RÁPIDO PIRONINA "Y"

La tinción se realizó con 0.5% de Pironina, un buffer con pH de 4.8 y 0.5 % de verde rápido a una dilución de 1:25 en alcohol de 96°. La fijación para esta técnica es preferentemente en fijador de Zenker, aunque se menciona que se pueden utilizar las muestras fijadas en paraformaldehído. (Estrada, 1982)

Se utilizó verde rápido por encontrarse en disposición en lugar del verde de metilo, realizándose la estandarización del tiempo y dilución del colorante, quedando un tiempo de 10 minutos óptimos y una dilución de 1:25 en alcohol 96°.

Después de la desparafinación de las laminillas como se ha descrito, se enjuagaron con agua destilada, la tinción con pironina se llevó a cabo por 30 minutos, posteriormente se deshidrató unos segundos en acetona y se colocó sobre la laminilla alcohol metílico para quitar el resto de acetona, después de este paso se les colocó verde rápido por 10 minutos, se lavó con alcohol 96°, 100°, xileno, dos pasos en cada uno de ellos, se dejó secar la laminilla durante un día o bien en la estufa de 60° por 1 hora y finalmente se colocó el cubreobjetos con un medio neutral o resina natural (Estrada, 1982, Gaete, 1996).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los resultados fueron de la siguiente manera:

- o Cromatina - verde azulado.
- o Nucleolo - rojo.
- o Citoplasma de células plasmáticas - rojo brillante.
- o Basófilos - verde.
- o Bacterias - rojo vivo.

TINCIÓN H-E

La tinción se realizó a cabo siguiendo métodos convencionales según Estrada, 1982 y Gaete, 1996.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 3. - Corte histológico del apéndice cecal teñido con H-E, en donde las letras indican los sitios de conteo de linfocitos en la vellosidad y los números en el nódulo. Tomada de Valdivia, 2002.



VELLOSIDAD	NÓDULO
1.- Punta	A.- Punta
2.- Intermedio	B.- Intermedio
3.- Base	C.- Base

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

Cada grupo se inoculó en un solo día, comenzando con el inoculo de la cepa K12 y el CST, después de la cirugía los conejos respondieron de manera favorable, el consumo de alimento y agua se llevó a cabo al siguiente día en cantidad restringida y se fue aumentando paulatinamente. Los conejos inoculados con la cepa EDL933 no respondieron de manera favorable, después de la cirugía se encontraron bastante deprimidos sin consumo de agua ni alimento, además de presentar una diarrea moderada y un aumento de la temperatura corporal: este grupo murió al tercer día post-inoculación, presentando diarrea severa.

BIOQUÍMICA Y QUÍMICA SANGUÍNEA

Cuadro 3.-Resultados de laboratorio de las pruebas de bioquímica y hematología en los conejos antes de la inoculación.

VALORES	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
GR (mm ³ X10 ⁴)	690	610	650	600	580	710	630	680	600
Hb (g/dl)	11	11.5	11	9.5	10.9	11	11.9	12	11.2
Sed (mm/h)	0	5	0	3	5	0	0	4	0
Ht (%)	37	38	36	35	32	35	38	39.2	40.3
VGM (fl)	54	62	55	58	55	49	60	58	67
HGM (pg)	0.16	19	17	16	19	15	19	18	19
CHGM (g/dl)	30	30.3	30.6	27.1	34.1	31.4	31.3	30.6	27.8
GB (mm ³)	5200	5600	5000	6000	5500	5800	6100	6400	5200
L (%)	25	29	20	23	25	20	26	29	27
M (%)	1	1	0	0	0	0	1	0	1
N (%)	72	80	68	75	72	81	75	80	79
E (%)	3	2	3	1	1	2	3	3	1
B (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bd (%)	1	2	1	0	1	1	1	2	1
S (%)	71	75	80	65	72	79	73	81	68
PP (g/dl)	5	5.3	5	5	4	5.5	5.6	5	4.9
Ptas (miles/mm ³)	300	300	350	400	300	360	380	33	300
Ret (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Abreviaturas - GR - glóbulos rojos, Hb - hemoglobina, Sed - sedimento, Ht - hematocrito, GB - glóbulos blancos, L - linfocitos, M - monocitos, N - neutrófilos, E - eosinófilos, B - basófilos, Bd - basófilos en banda, S - segmentados, PP, - proteínas plasmáticas, Ptas - plaquetas, Ret.- reticulocitos

TEST CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 4. - Rangos normales de las pruebas de Bioquímica y Hematología encontrados en los conejos antes de la inoculación.

VALORES	Rango*	X**	S**
GR ($\times 10^9/\text{mm}^3$)	5.6 - 7.3	644.0	46.2
Hb (g/dl)	9.19 - 12.4	11.1	0.7
Sed (mm/h)	0 - 5.5	1.9	2.2
Ht (%)	31.0 - 41.5	36.8	2.4
VGM (fl)	46 - 70	57.2	5.0
HGM (pg)	0 - 22	15.8	5.8
CHGM (g/dl)	26 - 35	30.3	1.9
GB (mm^3)	4800 - 6600	5620	449
L (%)	19 - 30	24.7	3.2
M (%)	0 - 1.1	0.5	0.5
N (%)	66 - 83	75.8	4.3
E (%)	1 - 3	2.1	0.9
B (%)	0	0	0
Bd (%)	0 - 2.2	1.0	0.7
S (%)	63 - 83	73.4	5.3
PP (g/dl)	3.8 - 5.8	5	0.4
Protas (miles/mm^3)	280-410	3023	1020
Ret (%)	0	0	0

* Se utilizó el programa "Statistica" para calcular los rangos normales en base a una distribución normal con +/- 2 desviaciones estándar, tomando en cuenta los datos del cuadro 3.

** X se refiere a la media y S indica la desviación estándar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 4.- Técnica quirúrgica para la inoculación de *Escherichia coli* en apéndice cecal de conejo.



Los conejos inoculados con la cepa K12 se sacrificaron al séptimo día con cloroformo, al realizar la necropsia se encontró el apéndice cecal aumentado de tamaño, las paredes adelgazadas con un contenido blanco amarillento de consistencia cremosa, en comparación con los conejos sanos, el bazo se encontró ligeramente más pequeño. El conejo inoculado con CST se sacrificó al séptimo día y al realizarse la necropsia el apéndice cecal y bazo se encontraron sin cambios patológicos aparentes (SCPA), al igual que los demás órganos. Al realizarse la necropsia de los animales inoculados con la cepa EDL933 se observó que el segmento del apéndice cecal aislado se encontraba de menor tamaño y con una coloración roja negruzca, además de tener adherencias con el intestino delgado; el bazo presentó una disminución de tamaño, los demás órganos se encontraban SCPA.

ESTANDARIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE INMUNOPEROXIDASA.

Al observar las laminillas de la estandarización de la tinción de Inmunoperoxidasa en el microscopio y analizador de imágenes, se determinó que la dilución óptima del anticuerpo monoclonal fue de 1:200, al igual que de la inmunoglobulina, ya que se pudieron apreciar fácilmente los linfocitos marcados, además de presentar menor ruido de fondo: los tiempos de incubación óptimos fueron de 5 min. en TBS, 7 min en H_2O_2 al 0.6% en metanol al 80%, 30 min en suero normal de conejo, 1 h con cada anticuerpo monoclonal, 1 h con la Ig biotinilada, 45 min con el complejo StrepABComplex/HRP, 20 min con el DAB y 15 seg. con la hematoxilina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los resultados encontrados en los conejos control de la reacción de Inmunoperoxidasa se muestran en los siguientes cuadros, considerando cada estructura y sus regiones, así como, el anticuerpo monoclonal utilizado:

Cuadro 5.- Proporción de linfocitos en el apéndice cecal y bazo de conejos control con los diferentes anticuerpos monoclonales.

Estructura	Región	CD4*(%)									CD52*(%)										
Nódulo	Base	60	46	56	62	71	59	46	54	64	67	54	64	25	50	20	53	62	20	41	26
	Intermedio	52	49	58	46	28	46	44	59	45	25	33	42	40	38	46	42	59	38	33	46
	Punta	42	62	51	27	24	41	60	55	29	23	26	54	42	47	36	21	62	39	58	37
Velloidad	Base	30	29	32	37	14	28	29	31	37	17	43	17	28	21	19	48	15	29	18	20
	Intermedio	20	12	24	11	18	17	10	25	13	28	28	14	19	14	17	22	13	12	15	10
	Punta	12	18	12	15	10	13	20	16	18	14	12	16	14	20	14	10	14	9	17	12
Bazo	Pulpa roja	31	34	25	39	33	32	33	24	40	39	29	40	20	21	31	28	39	18	25	33
	Pulpa blanca	28	36	37	35	25	32	37	41	36	29	31	47	32	40	41	29	47	36	38	46

Estructura	Región	CD25*(%)									CD45*(%)										
Nódulo	Base	68	46	61	65	58	59	54	67	55	61	40	68	48	54	72	39	62	47	53	69
	Intermedio	26	28	39	27	23	28	29	31	27	26	31	54	54	61	39	35	57	49	69	42
	Punta	29	35	23	49	32	31	30	25	50	34	49	49	59	34	41	44	42	54	38	33
Velloidad	Base	56	42	23	38	64	54	45	29	39	59	57	40	47	39	38	51	41	49	35	32
	Intermedio	27	28	46	34	20	21	27	45	26	25	20	18	20	17	19	19	15	18	14	11
	Punta	13	19	24	20	17	16	26	20	24	19	39	17	27	24	20	31	14	24	20	18
Bazo	Pulpa roja	37	23	18	32	21	38	23	21	38	16	48	24	18	27	41	36	21	16	28	40
	Pulpa blanca	34	39	45	27	36	29	34	18	21	37	60	48	63	64	57	54	42	61	57	60

* Los datos obtenidos son promedio de los cinco campos observados y analizados por región, considerando el tipo de anticuerpo monoclonal

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 6.- Valores normales obtenidos con la prueba de inmunoperoxidasa en conejos sanos de dos meses de edad mencionados en el cuadro 2.

APÉNDICE CECAL		CD4 (%)			CD5 (%)		
Estructura	Región	Rango*	X**	S**	Rango*	X**	S**
Nódulo	Base	42-74	58.50	8.25	15-70	41.50	17.40
	Intermedio	20-65	45.19	11.16	30-62	41.69	7.59
	Punta	15-70	41.39	15.09	15-70	42.20	13.30
Vellosoidad	Base	10-40	28.39	7.52	10-52	25.79	11.36
	Intermedio	8-30	17.79	6.36	8-30	16.40	5.36
	Punta	8-21	14.80	3.19	7-22	13.80	3.29
APÉNDICE CECAL		CD25 (%)			CD43 (%)		
Estructura	Región	Rango*	X**	S**	Rango*	X**	S**
Nódulo	Base	42-72	59.39	6.65	34-76	55.20	12.03
	Intermedio	21-41	28.40	4.27	25-75	49.09	12.14
	Punta	20-54	33.79	9.05	30-62	44.30	8.46
Vellosoidad	Base	15-70	44.89	13.30	28-60	42.90	7.82
	Intermedio	16-50	29.90	9.07	10-21	17.10	2.92
	Punta	11-28	19.80	3.99	10-42	23.40	7.43

*Se utilizó el programa Statistica para calcular los rangos normales en base a una distribución normal con +/- 2 desviación estándar, tomando en cuenta los datos del cuadro 2.

**X se refiere a la media y S indica la desviación estándar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 7.- Valores normales obtenidos con la prueba de inmunoperoxidasa en conejos sanos de dos meses de edad mencionados en el cuadro 2.

BAZO		CD4 (%)		CD5 (%)		
Región	Rango*	X**	S**	Rango*	X**	S**
Pulpa roja	22-42	33.00	5.50	14-44	28.40	7.60
Pulpa blanca	23-43	33.59	4.95	26-50	38.70	6.70
BAZO		CD25 (%)		CD43 (%)		
Región	Rango*	X**	S**	Rango*	X**	S**
Pulpa roja	12-42	26.70	8.64	12-52	29.90	10.81
Pulpa blanca	14-48	32.00	8.29	38-68	56.59	6.93

*Se utilizó el programa Statistica para calcular los rangos normales en base a una distribución normal con +/- 2 desviación estándar, tomando en cuenta los datos del cuadro 4.

**X se refiere a la media y S indica la desviación estándar.

Cuadro 8.- Proporción de células positivas a la tinción con verde rápido - pironina "Y" en los dos conejos sanos.

Estructura	Región	Positivos (%)**									
Nódulo	Base	1	1	4	0	0	2	0	0	1	2
	Intermedio	1	0	2	1	2	1	0	1	2	0
	Punta	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vellosoidad	Base	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Intermedio	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	Punta	2	0	0	0	0	0	0	1	1	2
Bazo	Pulpa roja	1	2	1	1	2	2	0	0	2	1
	Pulpa blanca	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2

* Los datos obtenidos son de los 10 campos observados y analizados de las células positivas a la tinción de verde rápido-pironina "Y".

TEST CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 9.- Valores normales encontrados en los conejos sanos de células plasmáticas con la tinción de verde rápido - pironina "Y" en el apéndice cecal.

Estructura	Región	Rango Normal*	X**	S**
Nódulo	Base	0-4	1.10	1.90
	Intermedio	0-2	1.00	0.82
	Punta	0-0	0.00	0.00
Vellosidad	Base	0-0	0.00	0.00
	Intermedio	0-1	0.20	0.42
	Punta	0-2	0.60	0.84

*Se utilizó el programa Statistica para calcular los rangos normales en base a una distribución normal con 2 desviaciones estándar, con los datos obtenidos del cuadro 8.

** X se refiere a la media, S indica la desviación estándar.

Cuadro 10.- Valores normales encontrados en los conejos sanos de células plasmáticas con la tinción de verde rápido - pironina "Y" en el bazo.

Órgano	Región	Rango Normal*	X**	S**
Bazo	Pulpa roja	0-2	1.20	0.79
	Pulpa blanca	1-2	1.50	0.53

*Se utilizó el programa Statistica para calcular los rangos normales en base a una distribución normal con 2 desviaciones estándar, con los datos obtenidos del cuadro 8.

** X se refiere a la media, S indica la desviación estándar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Fig. 5.- Fotografía de un corte histológico del apéndice cecal de un animal sano, teñida con H-E, en la cual se indican en que estructura del órgano se encuentran en mayor cantidad los diferentes tipos de anticuerpos monoclonales. En la figura se muestran las regiones donde se encontraron la mayor cantidad de linfocitos, considerando el cuadro 3, la letra A indica los CD4, la letra B indica linfocitos T además de linfocitos B en conejos; la letra C indica receptores para IL-2 y la letra D indica todas las T y B activados.

Cuadro 11.- Proporción de linfocitos en el apéndice cecal y bazo del conejo inoculado con caldo soya tripticaseína (CST), con los diferentes anticuerpos monoclonales.

	ESTRUCTURA	REGIÓN	POSITIVOS*					X**	S**
CD4	Nódulo	Base	50	46	61	53	67	55.4	8.5
		Intermedio	43	44	65	47	24	44.6	14.6
		Punta	41	63	60	24	26	42.8	18.3
	Vellosoidad	Base	25	29	32	30	19	27.0	5.1
		Intermedio	23	15	29	15	16	19.6	6.2
		Punta	13	17	18	23	11	16.4	4.7
	Bazo	Pulpa roja	6	17	49	27	23	24.4	15.9
		Pulpa blanca	21	29	33	37	27	29.4	6.1
	CD5	Nódulo	Base	46	64	25	39	28	40.4
Intermedio			44	57	39	31	50	44.2	10.0
Punta			25	69	36	50	32	42.4	17.4
Vellosoidad		Base	45	17	32	16	27	27.4	11.9
		Intermedio	21	14	15	10	17	15.4	4.0
		Punta	11	13	10	15	14	12.6	2.1
Bazo		Pulpa roja	25	47	29	26	37	32.8	9.2
		Pulpa blanca	27	52	30	39	44	38.4	10.2
CD25		Nódulo	Base	65	44	63	70	52	58.8
	Intermedio		23	26	34	30	25	27.6	4.4
	Punta		26	42	33	41	36	35.6	6.5
	Vellosoidad	Base	59	46	28	33	69	47.0	17.2
		Intermedio	21	25	66	39	26	35.4	18.4
		Punta	15	20	25	27	22	21.8	4.7
	Bazo	Pulpa roja	49	44	32	25	15	33.0	13.8
		Pulpa blanca	21	32	28	33	42	31.2	7.7
	CD43	Nódulo	Base	44	58	54	66	68	58.0
Intermedio			39	54	32	73	58	51.2	16.2
Punta			41	49	50	32	34	41.2	8.3
Vellosoidad		Base	56	44	50	36	41	45.4	7.8
		Intermedio	25	25	19	17	13	20.2	10.6
		Punta	33	44	20	18	12	25.4	12.9
Bazo		Pulpa roja	55	26	34	43	28	37.2	11.9
		Pulpa blanca	36	25	21	13	39	22.8	10.4

* Los datos obtenidos son de los cinco campos observados y analizados por región del animal inoculado con CST, considerando el tipo de anticuerpo monoclonal.

** X se refiere a la media y S indica la desviación estándar.

TIENE CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 12.- Proporción de células positivas a la tinción con verde rápido - pironina "Y" en el conejo inoculado con caldo soya tripticaseína.

Estructura	Región	POSITIVOS(%)					X**	S**
Nódulo	Base	0	1	2	2	1	1.20	0.84
	Intermedio	1	0	1	1	2	1.00	0.71
	Punta	1	1	1	0	1	0.80	0.45
Vellosidad	Base	0	1	1	1	1	0.80	0.45
	Intermedio	1	0	1	0	0	0.40	0.55
	Punta	2	0	0	1	2	1.00	1.00
Bazo	Pulpa roja	1	1	6	1	2	2.20	2.17
	Pulpa blanca	4	1	3	1	3	2.40	1.34

* Los datos obtenidos son de los campos observados y analizados de las células positivas a la tinción de verde rápido-pironina "Y".

** X se refiere a la media y S indica la desviación estándar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 13.- Proporción de linfocitos identificados en el apéndice y bazo de conejos inoculados con la cepa de *E. coli* K12 con los diferentes anticuerpos monoclonales.

	Estructura	Región	Positivos*(%)															X	S
			17	20	23	14	11	19	25	27	16	10	21	17	28	15	9		
CD4	Nódulo	Base	17	20	23	14	11	19	25	27	16	10	21	17	28	15	9	18.1	5.9
		Intermedio	24	29	38	19	40	27	32	39	27	43	27	32	44	16	39	31.7	8.6
		Punta	17	14	16	25	23	19	12	19	29	27	22	17	12	23	29	20.3	5.7
	Vellosidad	Base	12	20	14	22	12	17	22	20	26	19	19	23	16	22	12	18.4	4.4
		Intermedio	18	19	20	10	13	23	17	28	16	18	18	19	20	23	28	19.3	4.8
		Punta	12	15	13	9	21	19	16	15	16	26	16	19	20	23	12	16.8	4.6
	Bazo	Pulpa roja	28	25	14	18	22	30	29	12	16	21	33	29	18	24	37	23.7	7.3
		Pulpa blanca	76	45	59	32	33	72	42	53	31	39	77	41	52	39	30	48.1	16.3
	CD5	Nódulo	Base	51	36	48	67	43	55	38	42	71	48	59	43	53	70	44	51.2
Intermedio			42	48	57	38	40	47	42	59	44	33	46	49	61	32	49	45.8	8.6
Punta			65	48	45	59	38	61	44	49	62	39	69	40	41	63	39	50.8	11.1
Vellosidad		Base	32	37	48	62	36	30	38	41	67	41	39	41	44	60	42	43.9	10.9
		Intermedio	13	16	34	32	25	17	19	37	42	38	56	12	41	22	29	28.9	12.7
		Punta	31	24	18	13	34	33	27	16	19	32	35	29	23	15	46	26.3	9.2
Bazo		Pulpa roja	15	28	33	35	27	19	25	39	26	22	21	22	38	31	42	28.2	7.9
		Pulpa blanca	36	43	31	24	49	31	49	45	21	55	26	47	29	26	52	37.6	11.5
CD25		Nódulo	Base	28	19	16	21	36	32	21	19	27	33	32	21	19	22	39	25.7
	Intermedio		70	58	48	50	69	65	51	45	56	77	73	61	39	58	66	58.9	11.1
	Punta		32	27	26	45	30	34	21	29	49	37	35	29	34	46	32	33.7	7.8
	Vellosidad	Base	19	11	23	16	26	20	13	26	12	31	23	18	26	21	29	20.9	6.2
		Intermedio	25	30	34	12	24	29	37	29	17	28	29	33	36	24	29	27.7	6.7
		Punta	13	40	34	18	30	19	46	33	16	38	15	46	32	19	33	28.8	11.3
	Bazo	Pulpa roja	16	32	27	12	21	11	39	21	19	31	19	34	32	17	20	23.4	8.5
		Pulpa blanca	37	45	59	42	62	39	49	63	48	70	42	44	56	51	24	48.7	11.9
	CD43	Nódulo	Base	20	35	26	21	13	29	32	38	22	19	22	38	21	17	16	24.6
Intermedio			17	32	24	35	22	19	32	24	35	22	21	43	27	37	47	29.1	9.0
Punta			67	71	50	63	64	67	33	52	60	73	74	79	53	23	43	58.1	15.9
Vellosidad		Base	1	0	2	0	2	2	4	21	19	4	12	2	4	9	35	10.3	13.1
		Intermedio	26	23	40	30	21	21	29	42	37	31	23	56	41	26	19	31.0	10.3
		Punta	6	7	9	5	3	12	18	26	21	9	6	9	24	39	4	13.2	10.3
Bazo		Pulpa roja	8	11	19	15	6	9	19	26	12	15	2	33	12	36	4	15.1	10.0
		Pulpa blanca	46	52	37	35	32	50	53	37	41	25	54	12	47	56	24	40.1	12.9

* Son los datos obtenidos de los 15 campos observados por región de los conejos inoculados con la cepa K12, considerando el tipo de anticuerpo monoclonal

** X se refiere a la media y la S indica la desviación estándar



Cuadro 14.- Proporción de células positivas a la tinción con verde rápido - pironina "Y" en los conejos inoculados con la cepa de *Escherichia coli* K12.

Estructura	Región	Positivas*(%)															X**	S**
Nódulo	Base	2	6	8	2	7	1	4	4	6	3	1	3	0	1	0	3.20	2.57
	Intermedio	5	4	4	2	3	7	1	10	6	9	0	1	2	3	1	3.87	3.02
	Punta	3	5	1	4	1	8	2	2	4	0	0	3	2	1	0	2.40	2.20
Velloidad	Base	2	1	1	1	0	2	1	1	0	3	3	1	1	0	1	1.20	0.94
	Intermedio	4	1	2	1	1	4	2	0	1	0	4	0	1	0	0	1.40	1.50
	Punta	1	1	1	1	0	1	2	3	5	1	4	2	0	2	1	1.67	1.40
Bazo	Pulpa roja	7	2	2	5	8	1	0	1	3	1	2	0	0	2	0	2.27	2.52
	Pulpa blanca	1	3	0	0	1	1	3	2	3	0	3	4	1	2	2	1.73	1.28

* Datos obtenidos de los conteos de los 15 campos observados en las regiones de cada estructura de los conejos.

** X indica la media y la S indica la desviación estándar.

Cuadro 15.- Proporción de células positivas a la tinción con verde rápido - pironina Y en los conejos inoculados con la cepa de *Escherichia coli* EDL933.

Estructura	Región	Positivas*(%)															X**	S**
Nódulo	Base	20	9	21	8	48	15	9	24	6	31	11	7	38	8	50	20.33	14.99
	Intermedio	11	7	4	16	26	7	8	20	24	21	8	6	4	20	25	13.80	8.16
	Punta	11	6	5	15	13	9	6	16	18	11	15	6	5	16	13	11.00	4.55
Velloidad	Base	18	3	13	10	9	9	5	14	10	9	7	2	11	12	7	9.27	4.18
	Intermedio	13	4	7	11	3	10	3	5	9	3	11	4	7	11	3	6.93	3.61
	Punta	14	9	6	6	15	8	8	13	2	14	5	9	6	4	15	8.93	4.28
Bazo	Pulpa roja	5	14	28	12	18	6	8	6	1	5	8	11	10	12	18	10.80	6.75
	Pulpa blanca	17	39	7	13	20	34	17	15	12	29	9	8	20	10	6	17.07	9.98

* Datos obtenidos de los conteos de los 15 campos observados en las regiones de cada estructura de los conejos.

** X indica la media y la S indica la desviación estándar.

TESTE CON
FALLA EN EL ORIGEN

Cuadro 16.- Proporción de linfocitos en el apéndice y bazo de conejos inoculados con la cepa EDL933 con los diferentes anticuerpos monoclonales.

CD4	Estructura	Región	Positivos(%)												X**	S**			
			21	16	19	43	33	10	18	15	33	32	14	16			21	19	33
CD4	Nódulo	Base	21	16	19	43	33	10	18	15	33	32	14	16	21	19	33	22.9	9.5
		Intermedio	15	33	19	14	21	10	30	6	10	7	20	30	16	15	27	18.2	8.6
		Punta	12	17	29	21	10	5	11	9	6	10	16	12	10	23	24	14.3	7.1
	Vellosidad	Base	9	12	23	26	14	5	6	1	3	4	19	27	13	28	45	15.7	12.2
		Intermedio	14	21	12	35	30	4	1	2	4	3	12	14	27	31	29	15.9	12.0
		Punta	26	16	21	12	16	22	6	14	12	14	34	16	29	38	29	19.0	7.7
	Bazo	Pulpa roja	21	14	13	31	26	6	11	3	3	13	24	27	33	39	28	19.5	11.3
		Pulpa blanca	12	16	21	19	32	11	7	5	6	4	23	17	19	21	26	15.9	8.3
	CD5	Estructura	Región	Positivos(%)												X**	S**		
Base			33	25	31	58	24	29	71	27	54	20	45	71	21	49	24	38.8	17.8
Nódulo		Intermedio	31	48	39	42	39	36	42	49	51	45	30	35	42	29	50	40.5	7.3
		Punta	43	50	37	52	37	43	55	49	41	30	37	50	29	53	39	43.0	8.2
		Base	35	33	19	27	33	32	21	27	23	20	19	15	32	20	21	25.1	6.5
Vellosidad		Intermedio	25	29	10	17	37	32	26	12	10	12	29	16	12	21	15	20.2	8.9
		Punta	19	14	15	21	19	21	33	15	21	10	19	25	21	16	25	15.6	5.5
		Pulpa roja	29	40	21	20	33	14	41	19	26	33	33	42	17	32	27	28.5	8.9
Bazo		Pulpa blanca	35	42	27	46	32	31	45	41	27	34	21	33	30	49	53	35.4	9.2
CD26	Estructura	Región	Positivos(%)												X**	S**			
		Base	35	43	61	75	47	3	2	4	5	2	49	64	52	59	63	37.7	27.0
	Nódulo	Intermedio	32	43	20	29	31	17	9	10	15	5	34	20	37	27	21	23.3	11.1
		Punta	33	25	36	69	31	18	13	16	24	4	33	36	29	56	21	29.6	16.3
		Base	39	51	32	46	57	4	5	1	2	1	43	51	30	39	46	29.8	21.1
	Vellosidad	Intermedio	34	57	34	43	49	1	2	3	6	14	27	33	37	21	29	26.0	17.7
		Punta	35	57	37	28	26	6	4	9	5	7	12	21	16	29	31	21.5	15.1
		Pulpa roja	37	25	31	46	15	13	9	5	4	10	45	27	22	42	38	24.6	14.8
	Bazo	Pulpa blanca	29	37	15	36	43	5	3	4	8	2	30	31	26	19	30	21.2	14.0
CD43	Estructura	Región	Positivos(%)												X**	S**			
		Base	60	40	42	80	76	52	42	39	75	80	35	45	49	73	71	57.3	16.9
	Nódulo	Intermedio	35	33	27	6	24	30	28	33	5	21	34	30	30	12	21	24.6	9.8
		Punta	22	17	34	14	15	21	18	30	18	15	21	19	31	18	10	20.2	6.7
		Base	27	43	39	28	48	29	36	34	25	42	44	21	35	29	51	35.4	8.9
	Vellosidad	Intermedio	14	7	7	16	20	14	8	5	18	20	16	9	23	12	25	14.3	6.2
		Punta	8	3	11	24	15	9	3	12	21	16	10	12	11	20	15	12.7	6.1
		Pulpa roja	60	53	40	47	32	56	59	35	46	28	39	61	42	40	33	44.7	10.9
	Bazo	Pulpa blanca	26	30	28	54	15	25	32	21	48	14	26	31	27	51	26	30.3	11.9

* Los datos obtenidos son promedio de los campos observados por región de los animales inoculados con la cepa EDL933, considerando el tipo de anticuerpo monoclonal

** X indica la media y la S la desviación estándar

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 17.- T de student realizada comparando los datos de los conejos sanos y los conejos inoculados con CST, la cepa K12 y EDL 933 de *Escherichia coli*.

	Estructura	Región	CST	K12	P	EDL933	P		
CD4	Nódulo	Base	0.51	0.00	U*	0.00	U*		
		Intermedio	0.93	0.00	U*	0.00	U*		
		Punta	0.88	0.00	U*	0.00	U*		
	Vellosidad	Base	0.72	0.01	U*	0.00	U*		
		Intermedio	0.61	0.66	U	0.50	U		
		Punta	0.45	0.12	U	0.24	U		
	Bazo	Pulpa roja	0.14	0.00	U*	0.00	U*		
		Pulpa blanca	0.17	0.00	U*	0.01	U*		
	CD5	Estructura	Región	CST	K12	P	EDL933	P	
Base			0.91	0.71	U	0.10	U		
Nódulo		Intermedio	0.60	0.70	U	0.23	U		
		Punta	0.98	0.85	U	0.09	U		
		Base	0.80	0.85	U	0.00	U*		
Vellosidad		Intermedio	0.72	0.24	U	0.01	U*		
		Punta	0.47	0.01	U*	0.00	U*		
		Pulpa roja	0.34	0.98	U	0.95	U		
Bazo		Pulpa blanca	0.95	0.50	U	0.79	U		
		Base	0.89	0.03	U*	0.00	U*		
CD25		Nódulo	Intermedio	0.74	0.18	U	0.00	U*	
			Punta	0.70	0.45	U	0.98	U	
			Base	0.80	0.06	U	0.00	U*	
		Vellosidad	Intermedio	0.44	0.54	U	0.50	U	
			Punta	0.40	0.73	U	0.02	U*	
	Pulpa roja		0.29	0.69	U	0.36	U		
	Bazo	Pulpa blanca	0.86	0.39	U	0.00	U*		
		CD43	Estructura	Región	CST	P	K12	P	EDL933
	Base			0.66	0.74	U	0.00	U*	
Nódulo	Intermedio		0.78	0.00	U*	0.00	U*		
	Punta		0.51	0.00	U*	0.02	U*		
	Base		0.57	0.04	U*	0.00	U*		
Vellosidad	Intermedio		0.18	0.19	U	0.00	U*		
	Punta		0.71	0.00	U*	0.01	U*		
	Pulpa roja		0.25	0.00	U*	0.00	U*		
Bazo	Pulpa blanca		0.00	U*	0.00	U*	0.00	U*	

* Indica diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los animales sanos y los demás grupos en el conteo de linfocitos encontrados por cada estructura y sus regiones. La prueba estadística se realizó con el programa "Statistica".

U/U indican si los linfocitos marcados disminuyeron o aumentaron en cantidad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 18.- Diferencias significativas entre los conejos inoculados con la cepa K12 y EDL933 de *Escherichia coli*.

AM	Estructura	Región	EDL933	P*	AM	Estructura	Región	EDL933	P*
CD4	Nódulo	Base	0.11	↓	CD5	Nódulo	Base	0.03	↑*
		Intermedio	0.00	↑*			Intermedio	0.08	↑
		Punta	0.02	↑*			Punta	0.04	↑*
	Velloidad	Base	0.42	↑		Velloidad	Base	0.00	↑*
		Intermedio	0.32	↑			Intermedio	0.04	↑*
		Punta	0.35	↓			Punta	0.02	↑*
	Bazo	Pulpa roja	0.23	↑		Bazo	Pulpa roja	0.93	=
		Pulpa blanca	0.00	↑*			Pulpa blanca	0.75	↑

AM	Estructura	Región	EDL933	P*	AM	Estructura	Región	EDL933	P*
CD25	Nódulo	Base	0.11	↓	CD43	Nódulo	Base	0	↓*
		Intermedio	0.00	↑*			Intermedio	0.20	↑
		Punta	0.36	↑			Punta	0	↑*
	Velloidad	Base	0.13	↓		Velloidad	Base	0.00	↓*
		Intermedio	0.75	↑			Intermedio	0.00	↑*
		Punta	0.15	↑			Punta	0.88	↑
	Bazo	Pulpa roja	0.79	↓		Bazo	Pulpa roja	0	↓*
		Pulpa blanca	0.00	↑*			Pulpa blanca	0.04	↑*

* Indica diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la cepa K12 y la EDL 933, mostrando el efecto de cada una en las diferentes regiones y el tipo de anticuerpo monoclonal utilizado. La prueba estadística se realizó con el programa "Statistica".

↓/↑ indican si los linfocitos marcados disminuyeron o aumentaron en cantidad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 19.- T de student realizada para los datos de las células plasmáticas marcados en los conejos sanos comparando con los conejos inoculados con CST, la cepa K12 y EDL933 de *Escherichia coli*.

Estructura	Región	CST	p*	K12	p*	933	p*
Nódulo	Base	0.878068	∩	0.025900	∩*	0.000536	∩*
	Intermedia	1	=	0.007849	∩*	0.000059	∩*
	Punta	0.000053	∩*	0.002291	∩*	0.000000	∩*
Velloidad	Base	0.000053	∩*	0.000558	∩*	0.000000	∩*
	Intermedio	0.445508	∩	0.022485	∩*	0.000006	∩*
	Punta	0.428925	∩	0.041657	∩*	0.000004	∩*
Bazo	Pulpa roja	0.205534	∩	0.210291	∩	0.000186	∩*
	Pulpa blanca	0.079525	∩	0.592002	∩	0.000061	∩*

* Indica diferencias significativas (p<0.05) entre los animales sanos y los demás grupos en el conteo de células plasmáticas encontradas por cada estructura y sus regiones. La prueba estadística se realizó con el programa estadístico.

∩/∩ indican si los linfocitos marcados disminuyeron o aumentaron en cantidad.

Cuadro 20.- T de student comparativa entre las cepas K12 y EDL 933 para las células plasmáticas.

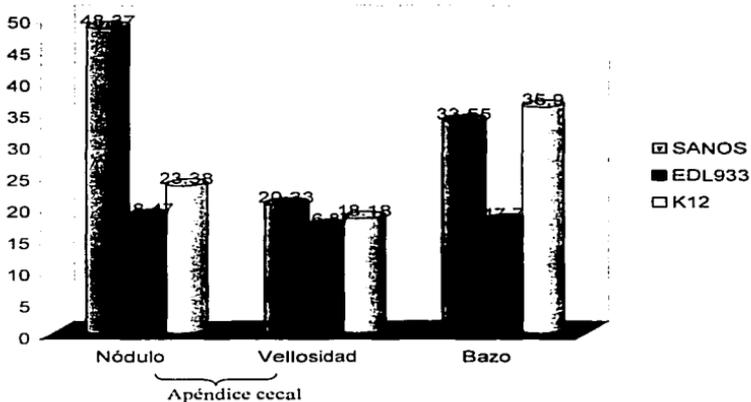
Estructura	Región	K12	EDL 933
Nódulo	Base	0.000158	∩*
	Intermedio	0.000135	∩*
	Punta	0.000000	∩*
Velloidad	Base	0.000000	∩*
	Intermedio	0.000008	∩*
	Punta	0.000001	∩*
Bazo	Pulpa roja	0.000086	∩*
	Pulpa blanca	0.000002	∩*

* Indica diferencias significativas (p<0.05) entre la cepa K12 y la EDL 933, mostrando el efecto de cada una en las diferentes regiones en las células plasmáticas. La prueba estadística se realizó con el programa estadístico.

∩/∩ indican si los linfocitos marcados disminuyeron o aumentaron en cantidad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

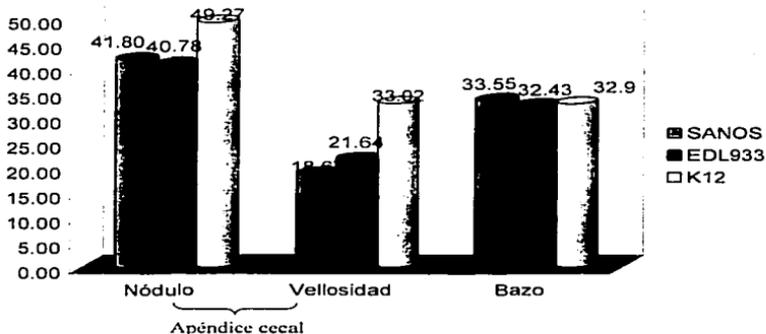
Fig 6.- Población de linfocitos marcados con CD4 en los diferentes órganos de los conejos inoculados



Los datos se obtuvieron del promedio de las células marcadas con el CD4 en los diferentes órganos de los conejos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

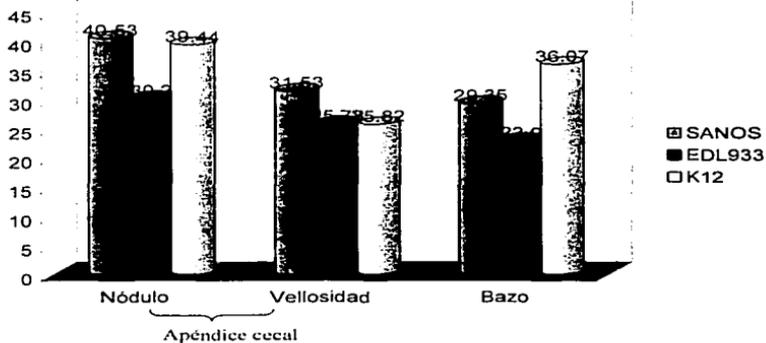
Fig 7.- Población de linfocitos marcados con CD5 en los diferentes órganos de los conejos inoculados



Los datos se obtuvieron del promedio de las células marcadas con el CD5 en los diferentes órganos de los conejos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

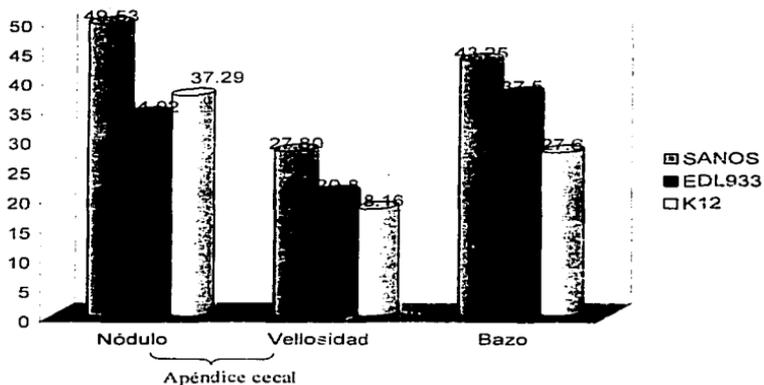
Fig 8.- Población de linfocitos marcados con CD25 en los diferentes órganos de los conejos inoculados



Los datos se obtuvieron del promedio de las células marcadas con el CD25 en los diferentes órganos de los conejos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

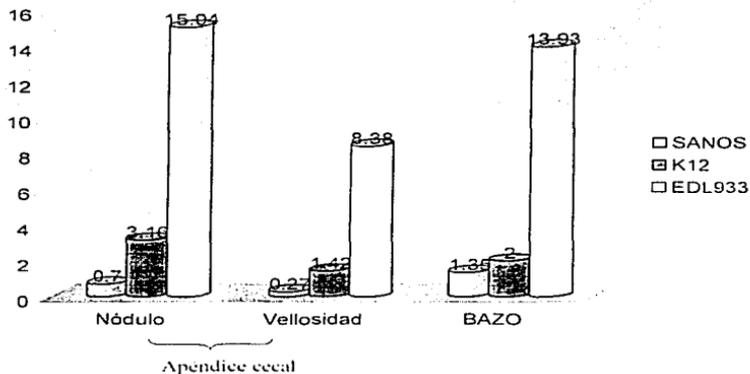
Fig 9.- Población de linfocitos marcados con CD43 en los diferentes órganos de los conejos inoculados



Los datos se obtuvieron del promedio de las células marcadas con el CD43 en los diferentes órganos de los conejos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 10.- Población de linfocitos B en los diferentes órganos de los conejos inoculados



Los datos se obtuvieron del promedio de las células marcadas con la tinción de verde rápido- pironina "Y" en los diferentes órganos de los conejos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Fig. 11.- Corte histológico del bazo de un conejo sano con la reacción de inmunoperoxidasa, en el cuál las flechas indican las células marcadas con el anticuerpo monoclonal CD43.

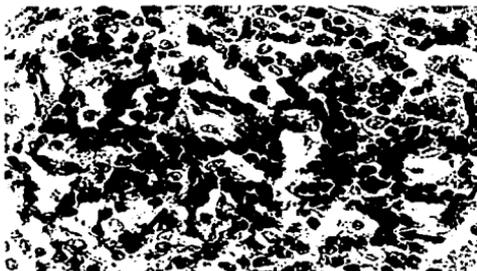


Fig. 12.- Corte histológico del bazo de conejo inoculado con CST con la reacción de inmunoperoxidasa, en el cuál las flechas indican las células marcadas con el anticuerpo monoclonal CD43.

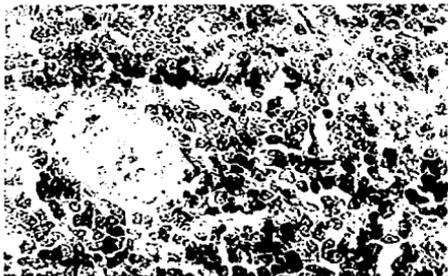


Fig. 13.- Corte histológico del bazo de conejo inoculado con *Escherichia coli* K12 con la reacción de inmunoperoxidasa, en el cual las flechas indican las células marcadas con el anticuerpo monoclonal CD43.

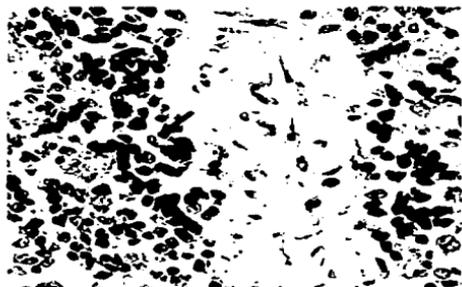


Fig. 14.- Corte histológico del bazo de conejo inoculado con *Escherichia coli* EDL933 con la reacción de inmunoperoxidasa, en el cual las flechas indican las células marcadas con el anticuerpo monoclonal CD43.

DISCUSIÓN

Los resultados que se muestran en el cuadro 3 y 4 referentes a las pruebas de bioquímica y hematología en los conejos antes de la inoculación, son muy similares a los rangos establecidos en un experimento previo realizado por Valdivia (1995); en nuestro estudio sólo se confirmó la baja de GR, Hb y Hto después de la inoculación de la cepa EDL 933 (resultados no mostrados) para corroborar el efecto de la inoculación como lo muestra Valdivia (2002).

Durante la estandarización de la técnica de Inmunoperoxidasa el control de la humedad de la cámara debe ser lo más preciso posible, ya que con demasiada humedad se condensa el agua y puede interferir con la reacción y por otro lado un poco de humedad provocaría que el anticuerpo se seque resultando en falsos-positivos (Gyles, 1986; Stefan, 1998).

Siguiendo la técnica convencional de Gaete (1996) para la tinción de verde metil - pironina "Y", no se logró una visualización correcta de las células plasmáticas, debido a que el verde de metilo desplazaba a la pironina de manera casi total, por lo cual se decidió probar la tinción con el colorante verde rápido a una concentración de 1:25 en alcohol 96%; consiguiendo con esto una adecuada observación y contraste entre las células plasmáticas y otras células presentes en los tejidos.

En la reacción de inmunoperoxidasa se establecieron en base a los datos obtenidos por el analizador de imágenes (Image-Pro Plus) y el conteo manual, los rangos normales para el apéndice cecal y el bazo con sus estructuras y regiones por cada tipo de anticuerpo monoclonal (cuadros 5, 6 y 7), no se pudo realizar la comparación de los valores normales obtenidos por no haberse encontrado literatura que citara estos datos, ya que los diferentes autores (Weinstein y col., 1994; Dasso y col., 2000; Lanning y col., 2000) sólo mencionan que se han encontrado centros germinativos de células B, mezcladas con células T y éstas van aumentando con la edad del animal, además no se han reportado datos que sirvan de parámetros de referencia en conejos, por lo tanto, no tenemos referencias comparativas, con lo cual, podemos decir que estos valores son de suma importancia por establecer los rangos normales para futuras investigaciones.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En estos mismos resultados para los conejos sanos (Cuadros 6 y 7) podemos observar que la mayor población de linfocitos con marcaje se encuentran en la parte basal del nódulo, donde destacan los linfocitos CD4, esto es lo contrario a lo observado por Dasso y col (2000), donde menciona que a la primera semana de edad de los conejos las células positivas con este marcaje se encontraban en mayor cantidad en la punta del nódulo, con esto se puede decir que tal vez al aumentar la edad de los conejos y madurar el apéndice cecal, la acumulación de linfocitos T cambia de ser en la punta a encontrarse en la base, comportándose como un placa de Sálller. Las placas de Peyer (PP) son grandes masas linfoides presentes en las paredes intestinales, su epitelio contiene células especializadas como son las células M (células con micropliegues) estas captan antígenos de la luz intestinal y son eficaces células presentadoras de antígeno, presentándolos a los linfocitos contenidos en la placa. Se han observado dos agrupaciones de estas, PP ileales (se encuentran de manera predominante en el ileon) formando un solo agregado continuo de folículos linfoides, sus folículos linfoides se encuentran separados por una vaina de tejido conectivo y sólo contienen linfocitos B. La otra agrupación son las PP yeyunales que tienen folículos en forma piriforme, separados por un amplio tejido interfolicular y contienen hasta un 30% de linfocitos T. Las PP ileales desaparecen conforme el animal va madurando, mientras que, las PP yeyunales persisten en toda la vida del animal (Tizard, 2000).

De la misma forma en la base de la vellosidad se encontró la mayor cantidad de células positivas a los marcadores, estas van disminuyendo conforme avanzan hacia la luz del apéndice cecal; esto cambiaría al momento de presentarse un antígeno, ya que los linfocitos T tienden a dirigirse a la mucosa intestinal, lo que revela el uso de adhesinas ("directinas") vasculares especializadas para determinar los patrones de migración de los linfocitos (Abbas, 2000; Tizard, 2000). En cuanto al bazo, la mayor cantidad de células con marcaje se encontraron en la pulpa blanca, principalmente con los anticuerpos monoclonales CD5, CD25 y CD43, los cuáles marcan subpoblaciones de linfocitos B y linfocitos T; receptor de IL-2(células B y linfocitos T activados) y linfocitos B activados, linfocitos T y NK respectivamente. Todo esto nos indica que la organización de los linfocitos encontrada en nuestro estudio para el bazo es la misma a la reportada en la literatura, donde se menciona que en la pulpa blanca se encuentran los

linfocitos B y rodeándolos se localizan los linfocitos T, lo cuál es normal fisiológicamente hablando en conejos sanos (Abbas, 2000; Tizard, 2000).

En la observación al microscopio del apéndice cecal de los conejos teñido con IP, corroboramos la existencia de una mezcla de linfocitos T y B, la mayor cantidad de linfocitos encontrados son del tipo CD4 y se acumularon en la base del nódulo linfoide; esto concuerda con lo descrito por Roitt (1989) para una placa de Peyer; así mismo se menciona que al principio el apéndice cecal se comporta como un órgano linfoide primario semejante a la bolsa de Fabricio en las aves, realizando la maduración de linfocitos B, ya que los folículos del apéndice y la distribución de los linfocitos presentes a las 6 semanas de nacidos es similar con la morfología de la bolsa de Fabricio, sólo que el apéndice no involuciona como esta; aunque la bolsa de Fabricio no se considera totalmente un órgano primario ya que contiene una estructura donde se encuentran linfocitos T, lo cuál es lógico que se encuentren presentes ya que estos producen sustancias que son necesarias para la proliferación y activación de los linfocitos B. La bolsa de Fabricio es un órgano de maduración y diferenciación de las células del sistema productor de anticuerpos, los linfocitos B proliferan con rapidez, sin embargo, del 90 al 95% mueren por apoptosis también de una manera rápida (Tizard, 2000).

La concentración de linfocitos T en el apéndice de los animales de dos meses de edad se encuentran de manera difusa en el órgano, contrariamente con lo descrito para la bolsa de Fabricio. Conforme el apéndice va madurando se incrementa en gran cantidad la población de linfocitos T principalmente los CD4 en todo el órgano, lo encontrado en este experimento concuerda con los datos obtenidos por Dasso y col. (2000); Weinstein (1994) menciona que conforme el conejo va madurando, el apéndice cecal cambia morfológicamente y en la distribución celular hasta llegar a convertirse en un órgano linfoide secundario como lo es la placa de Peyer; y dado que los animales en este estudio tenían dos meses de edad, lo encontrado es similar a lo descrito por diversos autores (Weinstein y col, 1994; Vajdy y col, 1998). Además de esto, Weinstein menciona que el apéndice cecal también es similar a la placa de Peyer ileal de las ovejas, aunque estas van desapareciendo con la edad del animal; aunado a esto Tizard (2000) menciona que este tipo de placa sólo contiene linfocitos B, por lo cuál, es

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

más aparente la similitud que tiene con PP yeyunales (Pospisil y col, 1998; Lanning y col, 2000; Tizard, 2000).

En los resultados de los cuadros 6 y 7, específicamente para linfocitos en el apéndice cecal, la mayor cantidad de células se refieren a linfocitos T cooperadores (CD4), esto es congruente ya que este tipo de linfocito cumple una función clave en el reconocimiento del antígeno para el desarrollo de la respuesta inmunológica; este linfocito tiene dos subpoblaciones de acuerdo a las citocinas que producen, Th1 el cuál secreta IL-2, IFN- γ y TNF- β durante las primeras horas que siguen a la estimulación por el antígeno, actúan principalmente en la activación de macrófagos y como células auxiliares para las inmunoreacciones mediadas por células. Los linfocitos Th2 secretan de manera característica IL- 4, IL-5, IL-10 e IL-13 varios días después de la exposición al antígeno y a la IL-1 (secretada por macrófagos, células dendríticas y algunos linfocitos), además de que estimula la proliferación de linfocitos B y la secreción de inmunoglobulinas (Roitt, 2000; Abbas, 2000, Tizard, 2000).

Aunado a esto, suponemos que la disminución de los CD4, involucran a los linfocitos Th1 y el marcador CD25 (linfocitos T activados, células B y monocitos) los cuáles juegan un papel importante en la activación de dichas células, puesto que al unirse la IL-2 con el receptor de esta, las células que lo tienen se activan para poder establecer y continuar la respuesta inmunitaria. Se encontró que la cantidad de células con marcaje de CD25 es muy similar a la de los linfocitos CD4, probablemente por su relación fisiológica; esta IL-2 actúa entonces con el antígeno y con los linfocitos T para inducir la respuesta de los linfocitos B, estos tres estímulos juntos hacen que los linfocitos B comiencen a dividirse. Este fenómeno por sí sólo no es capaz de inducir la producción de anticuerpos y para terminar el proceso de activación, los linfocitos B que responden (activos) deben ser activados por IL-4 e IL-5 procedentes de los linfocitos Th2 (Tizard, 2000).

Los valores obtenidos en los marcadores CD5 y CD43 son muy similares dando un grado de mayor confiabilidad a la prueba, ya que ambos marcan todos los linfocitos T y células B; por otro lado la menor cantidad de células encontradas en el apéndice cecal son referidas como

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

linfocitos T en general, células NK y células B activadas (CD43), aunque el rango es mucho más amplio que para los linfocitos CD4, debido a la mayor cantidad de células que marca, además de no poder diferenciar las células NK de los linfocitos para un mejor conteo de estos, y a pesar de esto la disminución en la marcación es muy importante al desarrollarse la respuesta inmunológica (Abbas, 2000; Tizard, 2000).

En cuanto a los valores normales de células plasmáticas encontradas por la tinción de verde rápido-pironina Y, se observan en los cuadros 7 y 9 que de igual manera la mayor cantidad de población linfocitaria se encuentra en los centros germinativos del bazo, lo cual concuerda con lo descrito en la literatura (Tizard, 2000). La mayor cantidad de células plasmáticas (Cuadros 7 y 8) se encuentran en el nódulo y siguen una distribución similar a los linfocitos T que van de menor concentración en la punta y mayor concentración en la base, no así en la vellosidad en donde la distribución es de manera inversa. En base a esto, el nódulo es la porción del apéndice cecal que juega un papel determinante en la respuesta inmune humoral contra procesos infecciosos y parece ser que el papel de la vellosidad es llevar los linfocitos hacia la luz del órgano (Tizard, 2000).

CONEJOS POST-INOCULACIÓN

En el conejo inoculado con CST no se observó ningún efecto estadísticamente significativo sobre el tipo de linfocitos en el apéndice cecal y bazo (cuadro 11), con la reacción de inmunoperoxidasa y la tinción para células plasmáticas (cuadro 12). El único efecto observado fue en el marcador CD43 en la pulpa blanca del bazo (cuadro 17), éste marca todos los linfocitos T, macrófagos, granulocitos, células NK, plaquetas y linfocitos B activados, por la gran cantidad de células que se colorean en la reacción de Inmunoperoxidasa, estos datos pueden ser debidos a que el CST contiene algunos componentes lo suficientemente antigénicos (caseína) capaces de provocar una respuesta en el bazo. El conteo de células plasmáticas en el conejo inoculado con CST aumento en los dos órganos, donde se encontró diferencias estadísticamente significativas en la punta del nódulo y la base de la vellosidad en comparación con los animales sanos (cuadro 19), esto pudo haberse suscitado porque al ser un medio rico, las bacterias de la flora normal lo aprovecharon y provocaron una respuesta inmune de tipo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

humoral, o bien el mismo CST provocó una respuesta inmune en base a sus componentes. Se puede decir que fue un verdadero control negativo en este experimento, lo cual es muy importante para tener un experimento más fidedigno (Abbas, 2000; Tizard, 2000).

En los conejos inoculados con la cepa EDL933, la cual provoca una disminución de linfocitos (Valdivia, 1995, 2002), no logró realizar la comparación de esta disminución linfocitaria encontrada con los diferentes anticuerpos monoclonales en nuestro estudio, ya que no encontramos en la literatura nada específico, puesto que la mayoría de los autores sólo mencionan una destrucción masiva de linfocitos, destrucción de neutrófilos y macrófagos por medio del mecanismo de apoptosis (Watson y col. 1996; Marcato y col. 2001). En los estudios realizados por Pérez y col. (1991) con niños se utilizó un solo marcador (CD4) de células T igual al del presente estudio pero para valorar los linfocitos T circulantes al igual que de células B, habiéndose encontrado la depleción linfoide en cuanto a linfocitos T y el aumento de células B, en individuos infectados con *E. coli* O157:H7.

Como se puede observar en el cuadro 17 y fig 6, con el anticuerpo monoclonal CD4 (T cooperador) existieron diferencias significativas en todo el nódulo y la base de la vellosidad del apéndice cecal en los conejos inoculados con las cepas K12 y EDL933; esto parece indicar que la endotoxina (LPS) de ambas cepas es la involucrada en la disminución de este tipo de linfocito, que siguiendo con el comportamiento inmunológico normal del organismo son los encargados de iniciar la respuesta inmune, tanto humoral como celular; sin embargo al realizar la T de student comparativa (cuadro 18) entre las cepas EDL933 y K12, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el intermedio y punta del nódulo, indicando que realmente en estas estructuras el daño es debido a la Stx o a otros factores auxiliares de virulencia presentes en la EDL933 y no sólo al LPS (Abbas, 2000; Reitt, 2000). La distribución de los linfocitos encontrada en los animales sanos cambio en los animales inoculados con la cepa de *E. coli* EDL933, ya que este tipo de linfocito (CD4) parece que emigra en la vellosidad de la base a la punta, puesto que se encontraron mayor cantidad de células marcadas en el intermedio y en menor cantidad en la punta, así mismo, en los conejos inoculados con la cepa K12 también se incremento la cantidad de células marcadas en la punta de la vellosidad con este anticuerpo monoclonal en menor cantidad, que con la cepa EDL933; estos datos nos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

indican que con la cepa K12 los linfocitos reaccionaron de manera fisiológica contra un antígeno, no así con la cepa EDL933 donde se puede observar el aumento de la llegada de los linfocitos hacia la luz del órgano, esto indica que pudiesen estar llegando linfocitos de otros órganos; en contraste en el nódulo las células marcadas con la cepa EDL933 tienen aparentemente la misma distribución que en los conejos sanos, y en los conejos inoculados con la cepa K12 se encontró un aumento en la distribución de los linfocitos en el intermedio del nódulo; en este caso, se puede observar que el nódulo es la estructura linfoide donde no existió tanta pérdida de linfocitos, o bien, pudieron llegar linfocitos de otros órganos adyacentes. Estos datos son de tomarse en cuenta, dado que este tipo de linfocitos (CD4) ayudan a la proliferación y diferenciación de los linfocitos B (Tizard, 2000). Pérez y col (1991) menciona que los linfocitos T circulantes disminuyen y al mismo tiempo los linfocitos B aumentan en la fase inicial del SUH y se va normalizando conforme transcurre la enfermedad, tal vez esta baja de linfocitos T circulantes se deba a que estos se trasladan al intestino para ayudar en la respuesta inmune.

Klapproth y col. (2000) mencionan que *E. coli* enteropatógena produce una linfostatina que inhibe la proliferación de linfocitos, así como de la IL-2, IL-4 y el interferón gamma, esto explica la disminución de los linfocitos CD4, ya que una subpoblación de estos (Th1) son los que producen la IL-2 y los Th2 producen la IL-4 responsables de multiplicación y diferenciación de linfocitos B (Abbas, 2000).

En cuanto al anticuerpo monoclonal CD5 en el mismo cuadro 17 y fig 7 podemos observar que existieron diferencias significativas para la cepa K12 y EDL 933 de *Escherichia coli* en la punta de la vellosidad corroborando la acción de la endotoxina (LPS); así mismo únicamente la cepa EDL933 presentó diferencia en la base e intermedio de la vellosidad y aquí podemos decir que la exotoxina (VT) que tiene esta cepa es la que provoca esta diferencia, ya que se sugiere que esta desencadena una respuesta humoral y el anticuerpo monoclonal marca subpoblaciones de linfocitos B (Abbas, 2000; Tizard, 2000).

La distribución de estas células marcadas (CD5) no cambió en los conejos inoculados con la cepa EDL933, en la vellosidad en comparación con los conejos sanos, sin embargo tanto

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

en el intermedio como en la punta de la vellosidad el marcaje se incrementó; esto debido tal vez a la llegada de otras células al tejido. En los conejos inoculados con la cepa K12 no se observó ningún cambio en cuanto a la distribución de las células, en la vellosidad, las poblaciones aumentaron ya que este anticuerpo monoclonal marca todas las células T y una subpoblación de linfocitos B en conejos, esto puede deberse a la acción de linfocitos CD4 del mismo nódulo, o bien, a la llegada de estos de otros órganos. En el nódulo la distribución de los conejos inoculados con la cepa EDL933 cambio en comparación con los animales sanos, donde, se vio disminuido el marcaje en la base de éste, en cambio en los conejos inoculados con la cepa K12 el cambio fue en toda la estructura donde aumento y en la base del nódulo donde se incrementó la población. La disminución en mayor grado de estas poblaciones linfocitarias en este órgano parece indicar la acción del LPS más que de la VT, puesto que esta endotoxina se encuentra en las dos cepas inoculadas y en las dos se observó una disminución.

Para el anticuerpo monoclonal CD25 (marca los linfocitos T activados, células B) se observa la acción de la endotoxina sólo en la base del nódulo del apéndice cecal, esto parece indicar que puede ser debido a que la endotoxina provoca una reacción de tipo celular y concordando con el cuadro 6 la mayor parte de linfocitos T se encuentran en esta región (fig. 8); la acción de la exotoxina se ve en el intermedio del nódulo, base y punta de la vellosidad y la pulpa blanca del bazo, de igual manera la baja de esta población se nota más en los conejos inoculados con la cepa EDL933, sin dejar a un lado que también con la cepa K12 se disminuyeron pero en menor cantidad. En cuanto a la distribución de estas poblaciones (linfocitos T activados, células B), en los conejos inoculados con la cepa K12, este marcador aumento en el intermedio del nódulo y punta de la vellosidad, con la cepa EDL 933, no cambio.

En el mismo cuadro 17 y fig. 9 con el anticuerpo monoclonal CD43 (Linfocitos T, NK y células B activadas) se observan diferencias significativas de la acción de la cepa EDL933 únicamente en la base del nódulo y intermedio de la vellosidad; en las demás regiones tanto del apéndice cecal y el bazo la acción pudiera deberse a la endotoxina o algún otro factor de virulencia. El cuadro 18 conforma el importante papel de la exotoxina en el desarrollo de la enfermedad y la respuesta inmune, ya que existieron diferencias significativas entre la cepa K12 y la EDL933 con los anticuerpos monoclonales principalmente CD5 y CD43, donde esta la

mayor cantidad de diferencias debido a que estos marcan mayores poblaciones de linfocitos B encargados de la inmunidad humoral (Abbas, 2000; Roit, 2000).

La distribución de estas poblaciones linfocitarias (CD43) con la cepa EDL933 no cambio en el apéndice cecal, sin embargo en el bazo se incremento el marcaje en los centros germinativos del mismo indicando una respuesta del sistema inmune. Con la cepa K12 se ven incrementadas las poblaciones en el intermedio de la vellosidad, esto podría deberse como ya se ha mencionado a la migración hacia la luz. En cuanto al nódulo, con la cepa K12 la distribución de la población se incremento en la punta de este, igualmente podría ser por la llegada de células NK al tejido; contrariamente con la cepa EDL933 aumento la población en la base y disminuyó en intermedio y punta del nódulo, igualmente pudiera ser debido a la migración de los linfocitos (Abbas, 2000).

En el cuadro 18 se observa que sin lugar a dudas la exotoxina es la que se encuentra marcando la diferencia entre la cepa K12 y la EDL 933, ya que en el cuadro 17, la cepa K12 afecto el nódulo y la vellosidad del apéndice cecal, mientras que la cepa EDL933 se encontró que afecto tanto apéndice cecal como bazo, así mismo el cuadro 16 corrobora esta acción.

En cuanto las células plasmáticas (cuadro 19), se observó un aumento de éstas en los conejos inoculados con la cepa K12 estadísticamente significativa en todo el nódulo y la vellosidad, de igual manera esto se observó en los animales inoculados con la cepa EDL933, donde también el aumento se encontró en el bazo; en el primer caso el aumento de éstas células es lógico, puesto que estas células plasmáticas se originan de linfocitos B estimulados por el antígeno y como se vio en nuestro experimento en el apéndice cecal hoy una cantidad considerable de éstas células; las cuáles son ovoides y tienen 8 a 9 μ m de diámetro, poseen un núcleo excéntrico redondo, con distribución desigual de la cromatina. Tienen abundante citoplasma rico en retículo endoplasmático rugoso, así como un aparato de Golgi grande. La secreción de inmunoglobulinas de cada célula tiene idéntica especificidad de unión al antígeno que el linfocito B progenitor (Tizard, 2000).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el segundo caso, como se aprecia en el cuadro 19, además del aumento de células plasmáticas en el apéndice cecal, también se observó un aumento estadísticamente significativo en el bazo, debido a que éste órgano es el principal lugar de las respuestas inmunitarias frente a antígenos que viajan en la sangre, su estructura contiene arteriolas pequeñas que están rodeadas por linfocitos, llamados vainas linfoides periarteriolas, estas se encuentran unidas a los folículos linfoides, algunos de los cuáles contienen centros germinativos. Las vainas contienen principalmente linfocitos T, siendo las dos terceras partes de linfocitos CD4 y una tercera de CD8, los folículos y los centros germinales son zonas que contienen primordialmente células B. Cuando es encontrado un antígeno, las células T activadas de las vainas linfoides migran hacia la zona marginal, mientras esto ocurre las células B migran en dirección opuesta encontrándose en la trayectoria, la interacción célula-célula es mayor y como ya se mencionó las células CD4 juegan un papel importante en la activación y proliferación de éstas células. En el cuadro 20 se puede corroborar que la cepa EDL 933 provocó el mayor aumento de células plasmáticas en el bazo y apéndice cecal de los conejos (Abbas, 2000).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES

El efecto en la inoculación experimental de *Escherichia coli* EDL933 en el apéndice cecal de conejo, ocasionó disminución en el número de GR, la concentración de Hb, así como, la del Ht.

En conejos sanos de 60 días de edad, los linfocitos se distribuyeron en el bazo y el apéndice cecal, de la siguiente forma:

- ❖ El CD4 se encuentra en la base del nódulo y en la vellosidad en mayor proporción, disminuyendo hacia la punta del mismo, en la vellosidad la distribución es la misma que para el nódulo. En el bazo hay más células de este tipo en la pulpa blanca.
- ❖ El CD5 se encuentra en la puntas del nódulo en mayor cantidad y en la vellosidad éste se encuentra en la base de la vellosidad. En el bazo la mayor cantidad se encuentra en la pulpa blanca.
- ❖ El marcaje con CD25 se encontró en mayor cantidad en la base del nódulo y de igual manera en la base de la vellosidad. En el bazo la mayor cantidad se encontró en la pulpa blanca.
- ❖ El CD43 se encuentra en mayor cantidad en la base del nódulo y vellosidad del apéndice cecal; en el bazo se encuentra en mayor cantidad en la pulpa blanca.

La distribución de los linfocitos en el apéndice cecal correspondió con la distribución de una placa de Peyer de tipo yeyunal.

En los conejos inoculados con la cepa K12 y EDL 933, el CD4 disminuyó en todo el nódulo y la base de la vellosidad; con la cepa K12 en el bazo también se disminuyó el marcaje, con la cepa EDL933 en el bazo se disminuyó, lo cual fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en la pulpa roja y sucedió lo contrario en la pulpa blanca.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El marcaje con el CD5 aumentó siendo estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la base e intermedio de la vellosidad con la cepa EDL933; en la punta de la vellosidad con las cepas K12 y EDL933 se aumentó.

Con la cepa EDL933 se aumentó significativamente ($p < 0.05$) el marcaje del CD25 en el intermedio del nódulo, punta de la vellosidad y la pulpa blanca del bazo. Con ambas cepas se disminuyó la cantidad de este marcador en la base del nódulo.

En los conejos inoculados con la cepa EDL933, aumentó significativamente ($p < 0.05$) el marcaje con el CD43 en el intermedio de la vellosidad y se disminuyó en la base del nódulo, al igual que en el bazo; con ambas cepas se disminuyó en intermedio del nódulo, base y punta de la vellosidad, así como en la pulpa blanca.

Las células plasmáticas aumentaron significativamente ($p < 0.05$) con la inoculación de ambas cepas, en el apéndice cecal; En el bazo aumentó significativamente ($p < 0.05$) sólo con la cepa EDL933, con la cepa K12 se incremento el marcaje de células plasmáticas, pero no de manera significativa.

Se deberán realizar experimentos para discriminar cuales son los factores que están involucrados en la disminución de linfocitos y si esta disminución es por efecto directo o indirecto de la verotoxina o el LPS de la cepa de *Escherichia coli* enterohemorrágica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE

PREPARADO DE SOLUCIONES

- ❖ El fijador de Zenker se preparó con 5g de mercurio, 2.5g bicromato de potasio, 1g de sulfato de sodio facultativo, 100ml de agua destilada; antes de utilizarse se agregó ácido acético glacial 5 ml de la solución. la fijación fue de 6-18 horas y transcurrido este tiempo se lavó con agua la muestra un tiempo al menos igual al de la fijación; cuando no se incluyeron las muestras de inmediato después del lavado se colocaron en etanol al 70°.
- ❖ Paraformaldehído, se pesaron 4g de paraformaldehído a los cuáles se les agregó 100 ml de agua destilado a 60°C y se colocaron en una platina en agitación y con calor hasta que se disolvió perfectamente bien el paraformaldehído (Gaete, 1996).
- ❖ TBS, 0.05mol/L de Tris/HCl y 0.15 mol/L de HCL 7.6.- se disolvieron en 1000 ml de agua destilada 6.05g de trisma base y posteriormente se ajustó el pH a 7.6 mezclando 8.76g de Na Cl en la solución.
- ❖ 0.6% de peróxido de hidrógeno en metanol al 80%; Primero se realizó una dilución 1:10 del H₂O₂ para obtenerlo al 3%, ya que viene al 30%, después se hizo una dilución 1:5 a la anterior con metanol para obtenerla al 0.6% y el metanol como esta al 100%, queda al 80%.
- ❖ Suero de conejo normal a una dilución 1:5, por lo tanto se tomaron 200 microlitros de suero más 800 microlitros de TBS y se obtuvo un volumen final de 1 mililitro (Serotec).
- ❖ Anticuerpo monoclonal a una dilución de 1:200, se tomaron 100 microlitros de anticuerpo y 900 de TBS para tener una dilución 1:10, de esta se tomaron 100 μ l y 900 μ l de TBS para tener 1:100 y finalmente se realizó una dilución doble teniendo 1:200 (Serotec), esto se realizó igual en la inmunoglobulina biotinilada (DAKO).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- ❖ El complejo (StreptABCComplex) se utilizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante, tomando una gota de cada reactivo y mezclándolo en 5 ml de Tris/HCl con un pH de 7.6. Esta solución fue estable solo por 3 días. (DAKO)
- ❖ La solución de Diaminobenzidina se realizó con media pastilla (6g aproximadamente) diluida en 10 ml de Tris con 1 ml de H₂O₂ al 3% (Sigma).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFÍA

Abbas, K.A.; Lichtman, H.A.; Pober, S.J. 2000. Inmunología celular y molecular. Ed. McGraw-Hill Interamericana. España. 517pp.

Baehler, A.A. and Moxley, A.R. 2000. *Escherichia coli* O157:H7 induces attaching-effacing lesions in large intestinal mucosal explants from adult cattle. FEMS, Microb. Letters. 185:239-242.

Begue, R.E.; Melta, De Vedra. 1998. *Escherichia coli* and the Hemolytic-Uremic Syndrome. Southern Med. J. 91 (9): 798.

Blanco M., Blanco E.J., Mora A., Alonso Ma.P., González A.E. y Blanco J. 2000. *Escherichia coli* verotoxigénicos (ECVT) en España, ECVT O157:H7 y no O157 en humanos y alimentos, el ganado bovino y ovino como reservorio, técnicas para la detección de ECVT. Universidad de Santiago de Compostela. España.

Brown A.C. Harmon G.B. Zhao T. And Doyle P.M. 1997. Experimental *Escherichia coli* O157:H7 Carriage in Calves. App. Env. Micro 63(1):27-32.

Dasso, F.J.; Obiakor, H.; Bach, H.; Anderson, O.A. and Mage, G.R. 2000. A morphological and immunohistological study of the human and rabbit appendix for comparison with the avian bursa. Develop. Comp. immun. 24:797-814. U.S.A.

Donohue-Rolfe A., I. Kondova, J. Mukherjee, K. Chios, D.Hutto and S.Tzipari. 1999. Antibody-based Protection of Gnotobiotic Piglets Infected with *Escherichia coli* O157:H7 against Systemic Complications Associated with Shiga Toxin 2. Infect. Immun. 67(7):3645-3648.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Elaine Hoey D.E., Currie C., Else R. W., Nutikka A., Clifford A., Gally L.D. and Smith G.E. 2002. Expression of receptors for verotoxin 1 from *Escherichia coli* O157 on bovine intestinal epithelium. *J. Med. Microbiol.* (45): 143-149.

Estrada, F.E.: 1982. Manual de Técnicas Histológicas. Ed. AGT editor, S.A. México. 140pp.

Gaete, B.A.C. 1996. Manual de Técnicas Histológicas para Médicos Veterinarios Zootecnistas. Tesis de licenciatura. FES-C, UNAM, México. 105pp.

Gyles C.L. and C.O. Thoen. 1992. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animal. Ed. Iowa State of University, U.S.A. 734-746.

He, Y.; Keen, E.J.; Westerman, B.R.; Littledike, T.E. and Kwang, J. 1996. Monoclonal Antibodies for Detection of the H7 Antigen of *Escherichia coli*. *App. And Env. Micro.* 62 (9): 3325-3332.

Holland, R.E.; Walker, R.D.; Srinaganathan, N.; Wilson, R.A. and Ruhl, D.C. 1999. Characterization of *Escherichia coli* isolated from healthy dogs. *Veterinary Microb.* 70:261-268.

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

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

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

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

Konadu, E.: A. Donohue-Rolfe; S.B. Calderwood; V. Pozsgay; J. Shiloach; J.B. Robbins and S.C. Szu. 1999. Syntheses and Immunologic Properties of *Escherichia coli* O157 O-Specific Polysaccharide and Shiga Toxin 1 B Subunit Conjugate in Mice. *Infect. Immun.* 67(11): 6191-6193.

Lanning, D.; Zhu, X.; Zhai, S-K. and Knight, K.L. 2000. Development of the antibody repertoire in rabbit: gut-associated lymphoid tissue, microbes, and selection. *Imm. Rev.* 175(1):214-228.

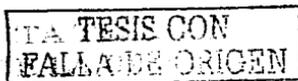
Lefkowitz, I. 1997. *Immunology Methods Manual, The Comprehensive Sourcebook of Techniques.* (3). USA

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

Marcato, P.; Mulvey, G. and Armstrong D.G. 2001. Cloned Shiga Toxin 2 B Subunit Induces Apoptosis in Ramos Burkitt's Lymphoma B cells. *Infect. Immun.* 70(3): 1279-1286.

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

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



Pastoret, Paul-Pierre; A. Govaerts; H. Bazin. 1990. *Immunologie Animale*. Edit. Medicine-Sciences Flammarion, France

Pérez, N.; Lasarte, P.; Bibiloni, N.; Dejean, C. Y Spizzirri, F. 1991. Linfocitos T, B, NK en el Síndrome Urémico Hemolítico. *Medicina*. 51:233-237.

Pérez Ortiz M. I. 2002. Efecto sobre la respuesta inmune provocado por *Escherichia coli* (O157:H7) verocitotóxica inoculada en el apéndice cecal del conejo. Tesis de licenciatura, FES-C. UNAM. México. 57pp.

Pospisil, R.; Young-Cooper, G.O.; Mage, R.G. 1996. Superantigen-Like Unconventional Ag-Ab interaction: "positive" Selection of Rabbit Appendix B-cells. *Vet.Immun. and Immopatho*. 54: 21-22.

Pospisil, R. and Mage, R.G. 1998. Rabbit appendix: a site of development and selection of the B cell repertoire. *Curr. Topics. Microbiol. Immunol*. 229: 59-70.

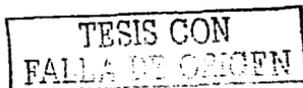
Richardson S.E. et.al. 1992. Experimental Verocytotoxemia in Rabbits. *Infect. Immun*. 60(10): 4154.

Riit, I.; Brostoff, J.; Male, D. 2000. *Inmunología*. Ed. Harcourt Brace. España.

Salyers A.A. and D.D. Whitt. 1994. *Bacterial Pathogenesis a Molecular Approach*. Ed. American Society for Microbiology. U.S.A. 190-212.

Schaechter M., G. Medoff and B.I. Eisenstein. 1993. *Mechanisms of Microbial Disease*. Ed. Williams & Wilkins. U.S.A.

Stefan, H.E., Kaufmann & D. Kabelitz. 1998. *Methods in Microbiology*. Ed. Academic Press. U.S.A.



Taylor, B.F. et. al. 1999. Animal Model Characterization of the Baboon Responses to Shiga-Like Toxin. *A.J.Pathol.* 154 (4):1285-1299.

Tizard, R.I. 2000. *Veterinary Immunology an Introduction*. Ed. W.B. Saunders Company. U.S.A. 517pp

Valdivia, A.G. 1995. Desarrollo de un Modelo Animal en el Conejo para el Estudio de Verotoxinas (VT) de *Escherichia coli*. Tesis de grado Maestría. FES-C. UNAM. México.

Valdivia, A.G. 2002. Evaluación de las Alteraciones Inducidas en el conejo por *Escherichia coli* O157:H7 Inoculada en el Apéndice Cecal. Tesis de grado Doctor en Microbiología. UNAM. FES-C. Edo. de Méx.

Vajdy, M.; Sethupathi, P. and Knight, K. 1998. Dependence of antibody somatic diversification on gut-associated lymphoid tissue in rabbits. *J. Immunol.* 160:2725-2729.

Watson, G.W.R.; Redmond, P.H.; Wang, H.J.; Condran, C. and Bouchier-Hayes, D. Neutrophils Undergo Apoptosis Following Ingestion of *Escherichia coli*. 1996. *J. of Imm.* 156: 3986-3992.

Weinstein, P.D.; Anderson, A.O. and Mage, R.G. 1994. Rabbit IgH sequences in appendix germinal centers: VH diversification by gene conversion-like and hypermutation mechanisms. *Immunity*, 1(8):647-659.

Weinstein, P.D.; Mage, R.G. and Anderson, A.O. 1994. The appendix functions as a mammalian bursal equivalent in the developing rabbit. *Adv. Exp. Med. Biol.* 355:249-253.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN