



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Alteración de los linfocitos tisulares causada por *Escherichia coli*
O157:H7 y dos mutantes en los genes *cadA* y *csgD* empleando un
modelo en conejos**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

DESIRE DEL CARMEN CARBALLO GARMA

ASESOR DE TESIS

DR en C. Guillermo Valdivia Anda

COASESOR DE TESIS

MVZ. Norhan Cortés Fernández de Arcipreste



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.

AGRADECIMIENTOS Y APOYOS OTORGADOS.

Este trabajo fue financiado por los proyectos:

**Programa de Apoyo a Proyectos para el Mejoramiento de la Enseñanza PAPIME
PE200707**

PROCEDIMIENTO EDUCATIVO DE INTEGRACIÓN DE LA MEDICINA EN
PEQUEÑAS ESPECIES Y FAUNA SILVESTRE

**Programas de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica
(PAPIIT) UNAM No. IN216005** Efectos sobre el sistema inmune de cepas de
Escherichia coli Enterohemorrágica

**Programa de Apoyo para Cátedras de Investigación, Vinculación y Educación
(PACIVE) Mecanismos de Patogenicidad Microbianos CONS 210 Responsable
2008-2009**

BECARIA DEL PROYECTO **Programas de Apoyo a Proyectos de Investigación e
Innovación Tecnológica (PAPIIT) UNAM No. IN216005** Efectos sobre el sistema
inmune de cepas de *Escherichia coli* Enterohemorrágica

El trabajo fue realizado con el equipo e instalaciones de:
Laboratorio de Patogenicidad Microbiana (L-3) de la Unidad Multidisciplinaria de
Investigación en Salud Animal, Edificio de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación
, de la FESC campo IV.

Laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario DIVET®

Agradecimientos:

Gracias a la vida de todos aquellos seres vivos, que me brindaron su ayuda para poder realizar este trabajo, ya que sin el sacrificio de estas vidas inocentes, este trabajo hubiera sido inútil y mi aprendizaje nulo. (Gracias a los 33 conejos nueva Zelanda utilizados en este trabajo)

Gracias a mi familia;(Papa, mama y Carlos) por siempre recordarme mis objetivos más importantes y jamás dejar que mis pies se elevaran de la tierra más de lo necesario para así poder ser mejor persona y poco a poco aprender a volar por mis propias fuerzas.

Gracias a mis amigos, que paso a paso me enseñaron la importancia del compañerismo y de cómo aprender de nuestros errores (Gerardo, Sam y Francisco Villegas.”Dactary”).

Gracias a todos mis compañeros de escuelas que siempre me apoyaron y me dieron alguna palabra de aliento para seguir adelante.

Gracias a todos los profesores de la universidad que alguna vez se tomaron la delicadeza de ayudarme o simplemente darme una palabra de aliento para poder acabar este trabajo.

M en F. Germán Isauro Garrido Fariña.

(Gracias; sin usted jamás hubiera acabado, mis laminillas)

Dr. Gerardo Martínez.

M. en C. Gerardo Arcila.

MVZ Emilio López López.

MVZ. Coasesora. Norhan Fernández de Arcipreste

Dr. Guillermo Valdivia Anda. (Costo trabajo, pero después de tantos regaños y correcciones salió un trabajo que vale la pena y que jamás voy a olvidar;

Gracias por su tiempo)

Gracias a ti: Prof. Carlos Garma Alcocer, por consentirme tanto y siempre hacerme saber que me amas. Gracias abuelito.

Gracias a ti: Sra. Aurea Esther Blanquet, por consentirme, amarme y siempre tener palabras de aliento y agrado para mí, se que si estuvieras aquí en la tierra te sentirías muy orgullosa de mí. Te amo abuelita.

Y por ultimo gracias a ti: Fernando Martines Reyes que siempre, siempre tuve, tengo y tendré, tu apoyo y amor incondicional para realizar este trabajo y seguir adelante con nuestras vidas.”Te amo.”

Y a toda la Familia Martines Reyes que siempre nos apoyo y confió en nuestros proyectos, así como en nuestros fracasos.

(La quiero mucho Sra Jose.).

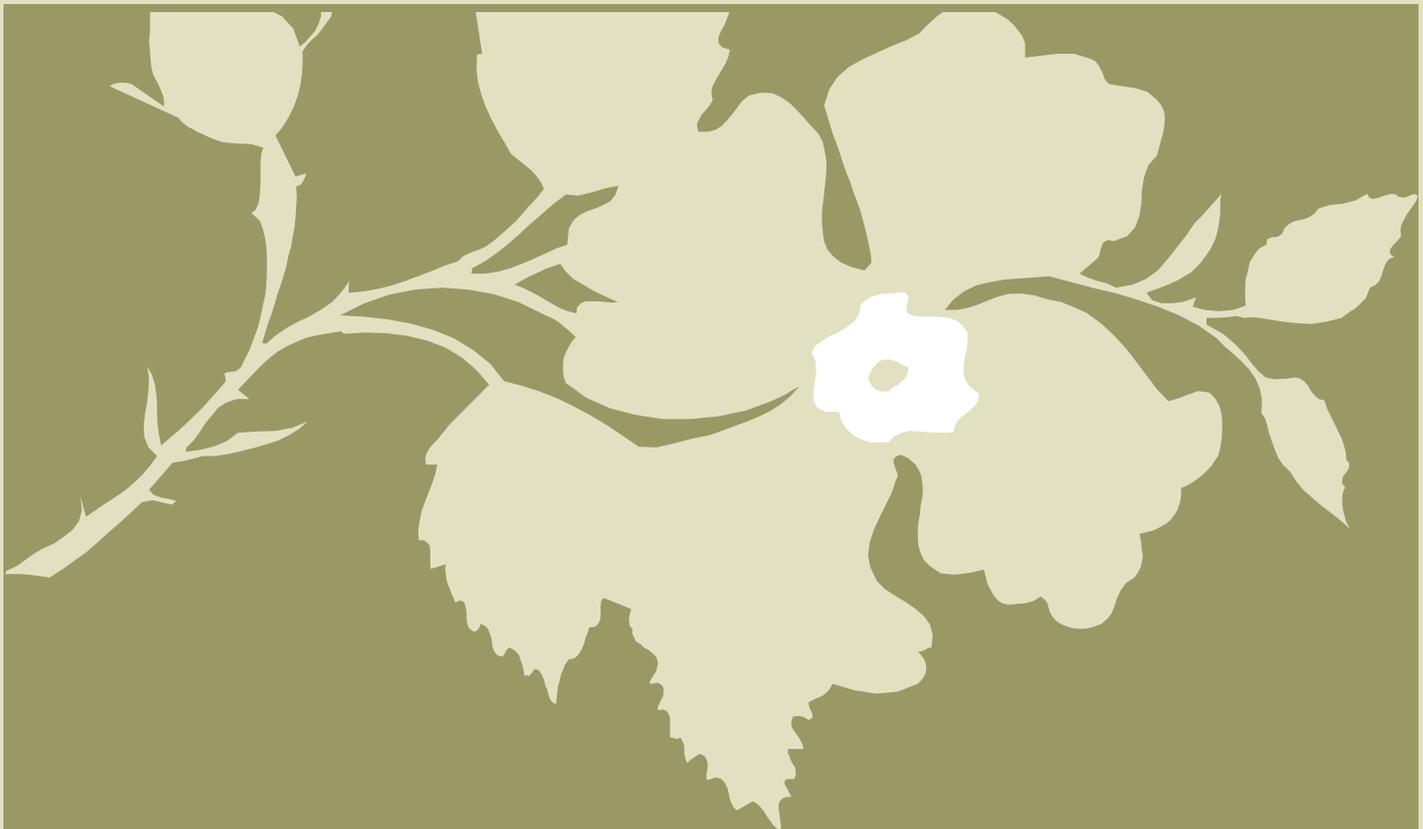
Gracias a todos lo que dieron un poco de sí, para poder concluir este trabajo.

Gracias.



Creo que los animales ven en el hombre un ser igual a ellos que ha perdido de forma extraordinariamente peligrosa el sano intelecto animal, es decir, que ven en él al animal irracional, al animal que ríe, al animal que llora, al animal infeliz.

Friedrich Nietzsche (1844-1900) Filósofo alemán



ÍNDICE

	PÁGINAS
RESUMEN.	1
INTRODUCCIÓN.	2
Características generales EHEC.	2
Patotipos de <i>E.coli</i>	3
Respuesta inmune causa por <i>E.coli</i> O157:H7.	4
Antecedentes.	5
JUSTIFICACIÓN.	7
OBJETIVO GENERAL.	8
OBJETIVOS PARTICULARES.	9
HIPÓTESIS.	9
MATERIALES Y MÉTODOS.	10
Cepas utilizadas.	10
Intervención quirúrgica.	11
Sacrificio y necropsia.	14
Inmunohistoquímica.	14
Estandarización de la prueba.	14
Técnica de inmunoperoxidasa.	14
RESULTADOS.	17
Conteo por campo.	20
Análisis estadístico.	29
DISCUSIÓN.	37
Efectos post inoculación.	37
Efectos en el Domo del Apéndice cecal del conejo	38
Efectos en el bazo del conejo.	41
CONCLUSIONES.	42
BIBLIOGRAFÍA.	43

ÍNDICE DE CUADROS

PÁGINA

Cuadro 1.- Cepas utilizadas.....	10
Cuadro 2.- Cepas de <i>Escherichia coli</i> inoculadas.....	11
Cuadro 3.- Marcaje de las células con anticuerpos anti ratón CD4, CD5, CD25 y CD43 (Serotec) usados en este trabajo.....	16
Cuadro 4.- Conteo de linfocitos marcados en el apéndice cecal y el bazo de los conejos inoculados con caldo soya tripticaseína.....	20
Cuadro 5.- Conteo de linfocitos marcados en el apéndice cecal y el bazo de los conejos inoculados con la cepa <i>E.coli</i> EDL 933	21
Cuadro 6.- Conteo de linfocitos marcados en el apéndice cecal y el bazo de los conejos inoculados con cepa silvestre <i>E.coli</i> 8624.....	22
Cuadro 7.- Conteo de linfocitos marcados en el apéndice cecal y el bazo de los conejos inoculados con cepa mutante <i>E.coli</i> P9C12D4.....	23
Cuadro 8.- Conteo de linfocitos marcados en el apéndice cecal y el bazo de los conejos inoculados con cepa mutante <i>E.coli</i> P9C8B1.....	24
Cuadro 9.- Análisis estadístico comparando los datos de los conejos inoculados con la cepa silvestre 8624 y los conejos inoculados con las cepas mutantes P9C12D4 y P9E8B1.....	29
Cuadro 10.- Análisis estadístico comparando los datos de los conejos inoculados la cepa EDL 933 y caldo soya tripticaseína.....	30
Cuadro 11.- Análisis estadístico comparando los datos de los conejos inoculados con la cepa EDL 933 y los conejos inoculados con la cepa silvestre 8624.....	31
Cuadro 12.- Efecto causado en el Domo del apéndice cecal del conejo por los factores de virulencia sobre las células marcadas con los anticuerpos empleados en el experimento.....	36
Cuadro 13.- Efecto causado por los factores de virulencia sobre las células marcadas con los anticuerpos empleados en el experimento, en el bazo del conejo.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Fig. 1.- Técnica quirúrgica para la inoculación de <i>E. Coli</i> en el apéndice cecal del conejo.....	13
Fig. 2.- Corte histológico del apéndice cecal del conejo con la cepa EDL 933 en la reacción de inmunoperoxidasa, en el cual las flechas indican las células marcadas con el anticuerpo monoclonal CD4.....	25
Fig. 3.-Corte histológico de la pulpa blanca del bazo del conejo inoculado con la cepa EDL933 y teñido mediante inmunoperoxidasa con el marcador CD4.....	25
Fig. 4.- Corte histológico del apéndice cecal del conejo con la cepa silvestre 8624 en la reacción de inmunoperoxidasa, en el cual las flechas indican las células marcadas con el anticuerpo monoclonal CD5.....	26
Fig. 5.- Corte histológico del bazo del conejo con la cepa silvestre 8624 en la reacción de inmunoperoxidasa, en el cual las flechas indican las células marcadas con el anticuerpo monoclonal CD5.....	26
Fig. 6.- Corte histológico del apéndice cecal del conejo con la cepa mutante P9C12D4 en la reacción de inmunoperoxidasa, en el cual las flechas indican las células marcadas con el anticuerpo monoclonal CD25.....	27
Fig. 7.- Corte histológico del bazo del conejo con la cepa mutante P9C12D4 en la reacción de inmunoperoxidasa, en el cual las flechas indican las células marcadas con el anticuerpo monoclonal CD25.....	27
Fig. 8- Corte histológico del apéndice cecal del conejo con la cepa mutante P9E8B1 en la reacción de inmunoperoxidasa, en el cual las flechas indican las células marcadas con el anticuerpo monoclonal CD43.....	28
Fig. 9.- Corte histológico del bazo del conejo con la cepa mutante P9E8B1 en la reacción de inmunoperoxidasa, en el cual las flechas indican las células marcadas con el anticuerpo monoclonal CD43.....	28
Fig.- 10.- Distribución de los linfocitos en el Domo del Apéndice cecal de los conejos sanos a los 60 días de edad.....	32
Fig.- 11.-Distribución de los linfocitos en el bazo de los conejos sanos a los 60 días de edad.....	33

Resumen:

En este trabajo se determinó el efecto de las infecciones por diferentes cepas de *E.coli* sobre el número y la distribución de diferentes subpoblaciones linfocitarias inoculadas en el apéndice cecal de conejos sanos.

Se utilizó la cepa mutante hiperadherente P9C12D4, la cepa mutante hipoadherente P9C8B1, y la cepa silvestre cepa 86-24, en conejos de la raza nueva Zelanda con un peso aproximado de 1.8 a 2 Kg.

Estas cepas se inocularon en el apéndice cecal por medio de una cirugía en los conejos y luego de la muerte de los mismo o de la eutanasia a los 7 días se obtuvieron muestras de apéndice cecal y bazo; y luego se realizaron pruebas de inmunohistoquímica, para caracterizar el efecto de la cepa silvestre y de las dos mutantes, sobre el sistema inmune y el efecto causado directamente sobre los linfocitos tisulares en el Domo, del apéndice cecal y el bazo de los conejos inoculados.

Los resultados mostraron que la cepa P9C12D4 tuvo una disminución significativa sobre los linfocitos del apéndice cecal y el bazo, mientras que la cepa P9E8C1 solo tuvo efectos en el Domo del apéndice cecal de los conejos inoculados; La cepa silvestre 8624 tuvo los mismos efectos que la cepa control positivo.

La cepa silvestre 86-24 afecto los linfocitos T y B activos tanto en el Domo del apéndice cecal como en el bazo de los conejos inoculados.

La cepa mutante en el gen *cad A* alterado y con el fenotipo hiperadherente afectó disminuyendo significativamente a los pre-linfocitos T y células T y B inmaduras presentes en el Domo del apéndice cecal y el bazo de los conejos inoculados.

La cepa mutante en el gen *csg D* y de fenotipo hipoadherente tuvo disminución significativa en los linfocitos pre-linfocitos T y B, células T y B inmaduras y Timocitos del Domo del apéndice cecal y no tuvo efectos en el bazo de los conejos inoculados. La inoculación de la cepa silvestre y sus 2 mutantes en el apéndice cecal del conejo desarrollo un efecto sistémico.

INTRODUCCIÓN

Características generales de EHEC:

E. coli es un habitante normal de la flora intestinal pudiéndose llegar a convertir en un importante patógeno en condiciones adecuadas de crecimiento (Schachtter y col., 1993).

El nombre de *Escherichia coli* proviene de su descubridor Theobald Escherich.

Los sitios más frecuentes de infecciones clínicas importantes son el aparato urinario, vías biliares y otros sitios de la cavidad abdominal (Bell, 1998).

E. coli es un bastón corto Gram negativo, forma colonias lisas, circulares, convexas, con bordes bien definidos, es anaerobia facultativa, crece en medios diferenciales y definidos como lo es agar Mac Conkey (Gyles y col., 1992).

La identificación de las variedades patogénicas se puede realizar de diferentes formas: Por cultivo y aislamiento de la bacteria, pruebas bioquímicas, reacción de la cadena polimerasa (PCR) serotificación y separación de la cadena inmunogénica (Blanco y col., 2000).

La serotipificación evidencia a los antígenos existentes en cada variedad, estos son: (Donuhue –Rolfé y col., 1999).

- Ag “O” Lipopolisacáridos de la membrana.
- Ag “H” Proteínas de flagelo.
- Ag “K” Polisacáridos presentes en la cápsula.
- Ag “F” Proteínas de las fimbrias.

Patotipos de E. coli:

Existen cinco diferentes grupos de *Escherichia coli* que causan enfermedad intestinal en humanos; enteroagregativas (EAEC), enteropatógenas (EPEC), enterotoxigénicas (ETEC), enteroinvasiva (EIEC) y las productoras de toxina shiga o enterohemorrágicas (EHEC)(Caugnat,1999 y Cortes,2003).

E. coli enterohemorrágica (EHEC) produce una verotoxina así denominada por su efecto citotóxico sobre las células. Existen por lo menos dos variantes antigénicas de la toxina, *Stx1* y *Stx2* (Puente, 2001).

De los serotipos de *E.coli* que producen toxina el más frecuente es O157:H7.En humanos ha sido relacionada en casos de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y Colitis Hemorrágica (CH) en todo el mundo (Jawetz, 1998).

Síndrome Urémico Hemolítico (SUH).

Es una enfermedad caracterizada por insuficiencia renal, anemia hemolítica, trombocitopenia, defectos de la coagulación y signos neurológicos variables. Esta enfermedad es mas frecuente en los niños y se presenta comúnmente después de una infección gastrointestinal usualmente causada a bacteria *Escherichia coli* O157:H7.La incidencia del Síndrome Urémico Hemolítico ha aumentado en los últimos años y en la actualidad constituye la principal causa de insuficiencia renal aguda en este grupo de la población. Una de las causas más atribuibles al brote es el consumo de comida rápida contaminada y mal cocida (Paton, 2000).

Patogenia del síndrome Urémico Hemolítico:

Esta bacteria se ingiere con los alimentos mal cocidos, colonizan el intestino grueso y se adhieren a las paredes de la mucosa del colon, después de invadir y destruir dichas células, el tejido adyacente y su vascularización se produce la diarrea (Jaime y col., 2003).

El síndrome generalmente comienza con síntomas como vómito y diarrea, la cual puede ser sanguinolenta. En una semana el paciente desarrolla debilidad e irritación y el gasto urinario disminuye significativamente, llegando incluso a suspenderse. El paciente se torna anémico dado que la toxina tiene actividad hemolítica. (Enciclopedia medica de la salud, 2001)(Valdivia, 2002).

El trastorno continua por la activación de la coagulación con la formación de trombosis en los vasos pequeños. El daño en el endotelio de los glomérulos favorecen la liberación de citocinas de potente acción vasoconstrictora, lo cual aumenta la

resistencia vascular y disminuye el flujo sanguíneo renal produciendo la insuficiencia renal (Jaime y col., 2003).

Desarrollo de los modelos animales:

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 producido por la VT1 en el endotelio, estas lesiones son similares a las encontradas en los riñones y otros tejidos humanos por lo cual es muy utilizado en los estudios de patogénesis y como ataca a los humanos 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 linfoide secundario y se piensa que su función es la de presentar antígenos, además de absorber los nutrientes y de secretar sustancias. La mucosa presenta 2 tipos de epitelio, uno cilíndrico con células caliciformes intercaladas en las proyecciones alargadas y otro cuboidal bajo, casi aplanado a nivel de las proyecciones cortas lanceoladas. Se menciona que el primer tipo puede tener la propiedad de absorber y secretar diversas sustancias mientras que el segundo tipo parece tener una función linfoide, teniendo células captadoras y presentadoras de antígenos, a estas zonas se les han denominado “Domo y Vellosoidad” (Valdivia, 1995; Pospisil y col., 1996; Valdivia, 2002).

Respuesta inmune por E.coli O157:H7

La primera en aparecer es la inmunoglobulina IgG la cual opsoniza y activa el complemento, citotoxicidad mediada por CD8 dependiendo de anticuerpos y retroalimentada por células B (Abas y col., 2000).

Los neutrófilos son los que se presentan en mayor cantidad en la sangre, estas destruyen a las bacterias intracelulares resultando en una aceleración de la apoptosis. Watson en 1996 menciona que *E. coli* produce un producto oxigenado que acelera la apoptosis de los neutrófilos.

En los estudios realizados por Perez (2002), se observó que los conejos inoculados con la cepa EDL933 disminuyeron significativamente la respuesta inmune lo cual no se observó en los conejos inoculados con la cepa K12. Esto sugiere un efecto sistémico de la toxina sobre algún tipo de linfocito involucrado en la respuesta inmune.

En los conejos inoculados con la cepa EDL 933 se produjo una inmunoreacción provocando que las células inmaduras de los centros germinales y en los linfocitos B

activados productoras de IgG expresaran un receptor para la toxina en los linfocitos T y pre T y las células B inmaduras, aunque otros autores indican que la VT inhibe la proliferación de células T y B así como la disminución de su actividad (Mengue y col., 1999).

Antecedentes:

La cepa O157:H7 presenta dos verotoxinas diferentes; *Stx1* y la *Stx2*, estas toxinas están codificadas por genes presentes en bacteriófagos lisogénicos (Valdivia 2002).

La secuencia del proceso patogénico sería: Adherencia laxa al enterocito por la fimbria, seguida de la adherencia íntima y lesión de la pared del enterocito por producción de la proteína *intimina* codificada por el gen “*eae*” y posteriormente la liberación de verotoxina (Oskov, 1990). La forma en la cual la SLT intoxica a las células es la siguiente:

El pentámero B de la toxina se une al receptor Gb3.

Integrando observaciones anteriores, es posible dar el siguiente mecanismo de lesión:

- 1.- La bacteria se adhiere a la mucosa de las vellosidades o domo del apéndice cecal.
- 2.- La toxina se une al Gb3 provocando alteraciones que producen que la bacteria penetre a la submucosa.
- 3.- La bacteria se replica y es fagocitada en las áreas linfoides, observándose también en el estroma.
- 4.- Se inicia el proceso inflamatorio, por la presencia de la bacteria, sus productos de degradación y sus lipopolisacáridos. La toxina liberada en la luz del órgano inicia sus efectos en el tracto intestinal.
- 5.- El lipopolisacáridos y la bacteria inducen la expresión de receptores en la microvasculatura y macrovasculatura renales.
- 6.-El efecto sobre el sistema nervioso se presenta en los últimos estadios de la enfermedad (Valdivia, 2002).

Torres y col.(2003), buscaron y caracterizaron elementos involucrados en la adherencia de *E.coli* O157:H7 a cultivos de células epiteliales, en diferentes regiones del genoma de *E.coli* y después seleccionando a las colonias de cepas mutantes que tuvieran características diferenciales de adherencia a células HeLa en comparación con la cepa silvestre **86-24**, la cual fue aislada por primera vez por Tarr y col. (1987), en un brote de colitis hemorrágica con varias presentaciones de SUH en Washington.(Abe ,1999).

De estas cepas se obtuvieron, los mutantes **P9C12D4**, inhibiendo la producción de la enzima Lisina Descarboxilasa; Ésta cepa es hiperadherente en células Hela y Caco-2. También se obtuvo la cepa mutante **P9C8B1**, inhibiendo la codificación para formar fimbrias enroscadas y posee una capacidad ligeramente menor de crear biofilms en medio inertes de PVC y en medio mínimo de glucosa que la cepa **86-24** (Tarr,1987).

Por otro lado Cortes (2003), trabajo con conejos sanos de 60 días y observó que los linfocitos disminuyeron en el bazo y apéndice cecal, dando como resultado que en general los marcadores CD4 CD25 y CD43 se encontró en mayor cantidad en el Domo del apéndice cecal y el marcador CD5 en la vellosidad del mismo y la mayor cantidad de dichos marcadores en el bazo se encontraran en la pulpa blanca, en general todos los marcadores se vieron notablemente disminuidos tanto en la vellosidad y el Domo del apéndice cecal como en el bazo en especial en la cepa EDL933 que es la cepa que contiene todas las toxinas funcionales.

Más adelante Brambilla y Martínez (2006), encontraron que para la cepa EDL-933 la depleción de linfocitos fue sistémico, dándonos a conocer que dicha cepa afecto principalmente a los linfocitos T y B inmaduros en el apéndice cecal y en el bazo, así como también que los linfocitos afectados fueron directamente regulados por el receptor Gb3 causando una destrucción antes mencionada.

Justificación.

Anteriormente se reportó un efecto de lisis sobre los linfocitos locales y en el bazo, proponiéndose que dicho efecto pudo ser mediado por una serie de linfocitos portadores de receptores de Gb3 o bien por un fenómeno indirecto vía citocinas. (Valdivia, 2002). También se demostró que en un modelo animal en conejo, la administración de la cepa EDL933 de *E. coli*, produjo la disminución de la respuesta inmune celular y humoral (Pérez, 2002).

Se han descrito diversas fimbrias que participan en la adherencia inicial de la bacteria y ellas han sido estudiadas a través de la producción de mutantes en los diversos genes (Valdivia, 2002).

Torres (2003), creó dos mutantes de *E. coli* 86-24 por medio de la inserción de un transposón en diferentes partes de su genoma, dando como resultado una cepa deficiente en la enzima lisina descarboxilasa (P9C12D4) por poseer el transposón insertado en el gen *cadA*, y otra cepa deficiente en la producción de fimbrias enroscadas también llamadas curli (P9C8D1), por poseer el transposón insertado en el gen *csgD*. Ambas cepas, aunque deficientes en diferentes elementos, resultan ser hiperadherentes en células HeLa, cascarilla de semillas, racimos de alfalfa y células CaCo-2.

A pesar que las dos cepas mutantes son hiperadherentes en distintas superficies no se sabe si tendrán el mismo efecto ya que se menciona que en células vivas la cepa P9C12D4 es mas adherente que la mutante P9C8B1 dando un efecto inmunodepresor del sistema inmune, sobre los linfocitos tisulares del apéndice cecal y del bazo del conejo.

Objetivo general:

- Determinar el efecto de la infección experimental con cepas de *E.coli* con diferentes capacidades de adherencia sobre el número y la distribución de diferentes subpoblaciones linfocitarias en el apéndice cecal y bazo de los conejos.

Objetivos particulares:

- Determinar diferencias en el número de los linfocitos marcados con los diferentes monoclonales CD4, CD5, CD25 y CD43, presentes en el apéndice cecal y bazo de los conejos inoculados con *E. coli* 86-24 y 2 mutantes.
- Relacionar las diferencias encontradas en el número de linfocitos con la presencia de algunos los factores de virulencias presentes en las cepas.

Hipótesis

Si la presencia de *Escherichia coli* O157:H7 disminuye la población de linfocitos en el apéndice cecal y bazo, entonces las cepas mutante hiperadherente (P9C12D4) deberá de producir mayor depleción linfocitaria que la cepa hipoadherente (P9C8B1).

MATERIALES Y MÉTODOS.

DISEÑO EXPERIMENTAL:

Para realizar el trabajo se utilizaron 10 conejos de la raza Nueva Zelanda con un peso aproximado de 1.8 a 2.0 kg. y se seleccionaron sin discriminar el sexo; estos animales fueron obtenidos en el modulo de cunicultura de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, 24 horas antes de la cirugía se les sometió a ayuno de sólidos.

A estos conejos se les realizará una cirugía para poder inocular las diferentes cepas de *E.coli* en el apéndice cecal.

Una vez que el conejo ha fallecido ó eutanasiado a los 7 días post inoculación, se realizó la necropsia para obtener el apéndice cecal y bazo. De estos órganos se obtubieron cortes histológicos para obtener laminillas que posteriormente fueron teñidas con técnicas de inmunohistoquímica.

Una ves teñidas dichas laminillas se procedió a la identificación y conteo por campo de observación de las diferentes subpoblaciones linfocitarias en el apéndice cecal y el bazo.

1.- CEPAS UTILIZADAS.

Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas fueron la EDL933, como cepas testigos; como testigos negativo se utilizo caldo soya tripticaseina; como cepas experimentales donadas por el PhD. Alfredo Torres de la U. de Bramech Medical Texas se utilizaron la cepa silvestre 86-24 y dos de sus mutantes P9C12D4 y P9C8B1.

CUADRO 1.- CEPAS UTILIZADAS.

Inoculo de <i>E.coli</i>	Genotipo	Fenotipo
CST		
EDL 933	ler +, eae+, stx1+, stx2+	O157:H7 Stx1+, Stx2+
86-24	eae+, ler+, cadA + csgD+ stx1+,stx2+	Silvestre O157:H7 Stx1+, stx2+ Cad A+, CsgD+
P9C12D4	cadA + csgD- eae+ler+ stx1+,stx2+	lisina - Stx1+, Stx2+ Mayor adhesión fimbrial
P9C8B1	cadA - csgD+ eae+ ler+ stx1+,stx2+	Stx1+, Stx2+ fimbrias enroscadas

Los inóculos utilizados fueron preparados 18 horas antes de la intervención quirúrgica mediante el sembrado de una colonia de cada cepa en 3 ml de caldo soya tripticaseina; y se dejo incubar a 37° C. de este cultivo se tomo únicamente 1 ml para inocularlo en el apéndice cecal del conejo; esta cantidad corresponde a una dosis de 1x10⁸ Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/ ml. (Valdivia 1995).

Cuadro 2.- Cepas de *Escherichia coli*. inoculadas .

INOCULO	No. DE ANIMALES
Caldo soya tripticaseina	2
EDL 933	2
8624	2
P9C12D4	2
P9C8BI	2

2.- INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA.

PRIMER PASO.- Se inició con la tranquilización del conejo por vía intramuscular con la dosis de 0.2 mg/kg de propiopromacina al 1% (Combelen de BAYER®). Se procedió a rasurar la región abdominal desde los cartílagos xifoides hasta la región inguinal, se continuó con la anestesia de manera general con una dosis de 40 mg/kg de clorhidrato de ketamina (Anesket Lab. PISA) por vía intramuscular. Se colocó al animal en decúbito dorsal y se procedió a la antisepsia del área quirúrgica con cloruro de benzalconio en concentración 1:100 para luego colocar los campos de cirugía respectivos.

SEGUNDO PASO.-La cirugía empezó con una incisión por línea media aproximadamente de 4 cm, tomando en cuenta la cicatriz umbilical, cortando piel y línea alba. Una vez dentro de la cavidad abdominal se localizó el apéndice cecal y se expuso sobre gasas humedecidas con solución salina fisiológica estéril a temperatura ambiente, (el apéndice cecal fue irrigado durante toda la cirugía con SSF estéril); se consideró el extremo final del saco ciego para tener un segmento de trabajo de aproximadamente 3-4 cm., con extremo cuidado se localizó la irrigación de la arteria ileocolica y se ligaron las ramas de esta para poder cortar en dos secciones el apéndice cecal.

TERCER PASO.- Una vez que fue ocluida la irrigación hacia el saco ciego y mantenida hacia el peritoneo, se colocaron 2 clamps para separar las 2 porciones del apéndice y se cortó entre las 2 pinzas, se suturó la porción cecal, mediante una jareta

invaginante para luego realizar la sutura de Cushing con monocryl de 3-0 para asegurar que no hubiera salida de contenido.

CUARTO PASO.-Una vez que se obtuvo la porción del saco ciego se procedió a lavar con mucho cuidado por medio de una sonda pediátrica estéril y SSF estéril a temperatura ambiente, hasta que el saco quedó lo más limpio posible, luego se continuó con una jareta invaginante para luego terminar con una sutura en Cushing con monocryl del 3-0.

QUINTO PASO.- Poco antes de terminar la línea de sutura se tomó 1 ml del inóculo con una jeringa insulínica y se inyectó en el saco ciego para luego terminar con una pequeña gota de benzal en el área de inyección del inóculo.

SEXTO PASO.- Para finalizar con los extremos de la sutura que habían sobrado de cada jareta se unieron para mantener la conformación del órgano y se regresó el apéndice cecal a su posición original para poder cerrar la cavidad abdominal utilizando catgut absorbible 2-0 tanto en peritoneo y músculo como en piel. La línea de incisión se limpió con cloruro de benzalconio y se le aplicó negasunt (Coumaphos 3%, Proxur 2% y protalbin 5% (Valdivia, 2005).

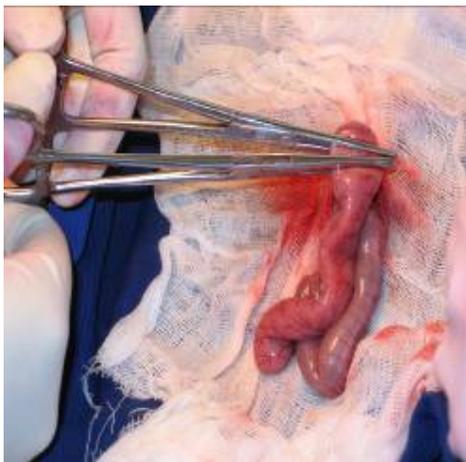
Fig. 1.- Técnica quirúrgica para la inoculación de *E. coli* en el apéndice cecal del conejo.



a) Primer paso.



b) Segundo paso.



c) Tercer paso.



d) Cuarto paso.



e) Quinto paso.



f) Sexto paso.

3.-SACRIFICIO Y NECROPSIA.

Los animales que murieron antes de los 7 días se les practicaron la necropsia para obtener apéndice cecal y bazo. Los animales mismos que se mantuvieron con vida después de este periodo se les practicaron la eutanasia y se obtuvieron los órganos para fijarlos en paraformaldehído al 4%.

4.- PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Después de fijar el tejido se realizaron cortes en diferentes zonas de cada muestra y se colocaron en cápsulas para someterlas a deshidratación para después poder infiltrarlas en parafina (Estrada, 1982., y Gaete, 1996).

Se realizaron cortes en microtomo a las muestras para la realización de la prueba de inmunoperoxidasa.

5.- INMUNOHISTOQUÍMICA.

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 con las cepas testigo, la cepa silvestre y las dos mutantes.

Se realizaron diluciones 1:10, 1:100 y 1:200 de cada anticuerpo monoclonal (Serotec) los cuales fueron; anti-CD4, el cual marca los linfocitos T cooperadores y los timocitos, el CD5 el cual todos los linfocitos T y en el caso del conejo todos los linfocitos B, el CD25 que marca todas las células con receptores de IL2 que son linfocitos T y B activados y monocitos; el CD43 que marca los linfocitos T, timocitos, monocitos, macrófagos y linfocitos B activados.

Se utilizó albumina bovina al 1% para poder bloquear todas las proteínas de la superficie celular que se pudieran adherir con facilidad al monoclonal utilizado, también se realizaron las pruebas a diferentes tiempos de incubación en cada paso tomando en

cuenta las recomendaciones del fabricante y la evaluación del microscopio, considerando la reacción mas fuerte y el menor ruido de fondo.

5.1.- Técnica de inmunoperoxidasa:

Una vez desparafinadas las muestras se colocaron en un baño de solución buffer tris (TBS) por 5 minutos para rehidratar las muestras.

Para inhibir la peroxidasa endógena se les aplicó peróxido de hidrogeno al 0.6% en metanol al 80% durante 10 minutos en cámara húmeda a 37°C y se lavaron 4 veces con solución buffer tris (TBS) pH 7.6, posteriormente se les colocó albúmina sérica bovina al 1% por 10 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.

Posteriormente se realizan 4 lavados con solución buffer tris (TBS) para luego aplicar los monoclonales anti-CD4, antiCD5, antiCD25 y antiCD43 como marcadores, dilución 1:100 y el tiempo de incubación en cámara húmeda fue de 1 hora. Se lavó con solución buffer tris (TBS) y se aplicó el anticuerpo biotinilado del Kit Dako LSAB K0679 y se incubo por 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se lavó 4 veces y se aplicó el complejo StrepAB Complex/ HRP del Kit por 30 minutos. Se lavó y se aplicó la diaminobenzidina del Kit por 55 segundos para lavar y luego aplicar la hematoxilina de Harris por 1 minuto. Luego de esto se colocó una gota de etanol al 70°,80°,90°,100° y Xileno .Finalmente los cortes fueron deshidratados y montados en resina para su posterior observación.

Monoclonales utilizados:

Cuadro 3.

Marcaje de las células con anticuerpos anti ratón CD4, CD5, CD25 y CD43 (Serotec) usados en este trabajo.

Marcador	CD4	CD5	CD25	CD43
Linfocitos T		+	+	+
Linfocitos Pre T		+	+	
Timocitos	+	+	+	+
T cooperadores	+	+		+
T- Citotóxicos		+		
Linfocitos B		+	+	
Linfocitos de B de medula ósea				+
Linfocitos B inmaduros				+
Linfocitos B maduros.		+		
Células B activas			+	
Monocitos /macrófagos	+		+	+

Cortés, (2003).

Para la observación al microscopio de las regiones se dividieron en:

Apéndice cecal

Domo.- Base, intermedio y punta.

Bazo:

Pulpa roja.

Pulpa blanca.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos de los linfocitos marcados para cada monoclonal utilizado, se contaron en 8 campos visuales, (4 campos visuales observados por laminilla) para el Domo (base, intermedio y punta) del apéndice cecal y el bazo (Pulpa blanca y pulpa roja) de los conejos inoculados con cada una de las cepas.

Los resultados obtenidos de estos 8 campos visuales se utilizaron en el programa Estadística (Nonparametric statistics and distribution fitting.Ordinal describe statistics, media mode, percent...), por medio de la prueba de t de student .Los resultados se observan en los cuadros del 4 al 8. Este programa se utilizó para poder saber si había diferencia estadística entre el número de linfocitos marcados en el apéndice cecal y bazo, por los diferentes monoclonales utilizados entre las diferentes cepas.

Una vez que se obtuvieron las diferencias significativas así como la media y la desviación estándar (Marcadas con un *) ó no diferencia (NDS), se indicó con flechas (\downarrow \uparrow) si los linfocitos marcados aumentaron o disminuyeron en cantidad. Estos resultados se muestran en los cuadros del 9 al 11.

Los resultados encontrados en los conejos de la reacción de inmunoperoxidasa se muestran en los siguientes cuadros considerando como estructuras más importantes a describir el del domo del apéndice cecal del conejo y del bazo, así como el anticuerpo monoclonal utilizado.

Con respecto a las células marcadas con CD4 + se observó una disminución significativa en el apéndice cecal y bazo de los conejos inoculados con la cepa 8624 en comparación con la cepa P9C12D4; En la punta del domo y el bazo de la cepa 8624 hubo una disminución significativa en comparación con la cepa P9C8B1, en las demás estructuras del apéndice cecal no se encontró diferencia significativa; En la punta del domo del apéndice cecal y pulpa blanca del bazo, existe una disminución significativa para la cepa P9C12D4 en comparación con la cepa P9C8B1, solo se encontró un aumento significativo en la base del domo del apéndice cecal y en las demás estructuras no se encontró diferencia significativa.

Estos resultados se pueden observar en el cuadro 9.

Los linfocitos marcados con CD5+ tuvieron una disminución significativa en la punta y base del domo del apéndice cecal y pulpa blanca del bazo, y un aumento significativo en el intermedio del domo del apéndice cecal y pulpa roja del bazo del conejo inoculado con la cepa 8624 en comparación con la cepa P9C12D4; En la punta del domo y el bazo

se observo una disminución significativa para la cepa 8624 en comparación con la cepa P9E8B1, en las demás estructuras no se encontró diferencia significativa; En el intermedio del domo del apéndice cecal se encontró una disminución significativa y en el intermedio del domo se encontró un aumento significativo de la cepa P9C12D4 en comparación con al cepa P9E8B1, en las demás estructuras no se encontró diferencia significativa. Estos resultados se pueden observar en el cuadro 9.

Las células marcadas con CD25+ tuvieron una disminución significativa en la punta e intermedio del domo del apéndice cecal de la cepa 8624 en comparación con al cepa P9C12D4, en las demás estructuras no se encontró diferencia significativa; En la punta e intermedio del domo del apéndice así como en la pulpa blanca del bazo se observó una significativa disminución del numero de linfocitos marcados de la cepa 8624 en comparación con al cepa P9C8B1, en las demás estructuras no se encontró diferencia significativa: En la punta del domo del apéndice cecal se encontró una disminución significativa y en el bazo una aumento significativo en el conteo de linfocitos para la cepa P9C12D4 en comparación con la cepa P9C8B1, en las demás estructuras no se encontró diferencia significativa. Estos resultados se pueden observar en el cuadro 9.

En las células marcadas con CD43+ en la punta del domo del apéndice cecal se vio una disminución significativa en la base del domo y un aumento significativo para la cepa 8624 en comparación con al cepa P9C12D4, las demás estructuras no presentaron diferencia significativa; en el conteo de linfocitos en la punta del domo del apéndice cecal se observó una disminución significativa en la cepa 8624 en comparación con al cepa P9C8B1, en las demás estructuras no se encontró diferencia significativa; Los linfocitos en la punta del domo del apéndice cecal y pulpa roja dela bazo marcaron un aumento significativo y la base del domo marco una disminución significativa de los linfocitos marcados de la cepa P9C12D4 en comparación con al cepa P9C8B1, en las demás estructuras no se encontró diferencia significativa.

Estos resultados se pueden observar en el cuadro 9

En los linfocitos marcados con CD4+ se observo un aumento significativo en la base del domo del apéndice cecal y la pulpa roja del bazo de la cepa EDL933 en comparación con Caldo Soya Trypticaseina, en la demás estructuras no se encontró diferencia significativa; En el marcador CD5+ no se observo diferencia significativa para ninguna estructura; Para el marcador CD25+ la base del domo del apéndice cecal presentó una disminución significativa y en la pulpa roja del bazo se observo una aumento significativo en el número de linfocitos marcados, en las demás estructuras no

se observo diferencia significativa: para el marcador CD43+ en le domo y pulpa blanca del bazo se observo una disminuci3n significativa en el n3mero de linfocitos marcados, en la dem3s estructuras no se encontr3 diferencia significativa. Estos resultados se pueden observar en el cuadro 10.

Comparando la cepa EDL933 en contra de la cepa 8624 se observo que los linfocitos marcados con CD4+ en la base del domo del ap3ndice y la pulpa blanca, hubo una disminuci3n significativa, en la punta e intermedio del domo del ap3ndice se vi3 un aumento significativo, en la dem3s estructuras nos observ3 diferencia significativa, para el marcador CD5+ en la pulpa blanca del bazo se observo un aumento significativo, en las dem3s estructuras nos se observ3 diferencia significativa; Para el marcador CD25+ en la punta e intermedio del domo del ap3ndice se vio un aumento significativo , pero en las dem3s estructuras no se vio diferencia significativa; Para los linfocitos marcados con el monoclonal CD43 se observo que en la punta del domo del ap3ndice cecal y el bazo existi3 un aumento significativo, en las dem3s estructuras no encontr3 diferencia significativa. Esto resultados se pueden observar en el cuadro 11.

CUADRO 4.- CONTEO DE LINFOCITOS MARCADOS EN EL APÉNDICE CECAL Y EL BAZO DE LOS CONEJOS INOCULADOS CON CALDO SOYA TRIPTICASEINA.

	Estructura	Región	Positivos / campo								X**	S**
CD4	Domo	Punta	5	15	10	8	14	24	10	4	11.25	6.43
		Intermedio	8	7	5	8	12	8	12	14	9.25	3.05
		Base	8	20	15	22	6	10	4	5	11.25	6.94
	Bazo	Pulpa Roja	10	8	2	5	10	4	15	10	8	4.17
		Pulpa Blanca	10	15	10	8	8	10	5	11	9.625	2.87
	Estructura	Región	Positivos / campo								X**	S**
CD5	Domo	Punta	10	12	9	12	37	20	28	18	18.25	9.86
		Intermedio	15	17	10	11	68	72	48	53	36.75	26.32
		Base	16	20	10	8	8	9	10	7	4.56	4.56
	Bazo	Pulpa Roja	12	16	15	20	10	20	8	6	8.49	5.49
		Pulpa Blanca	5	3	8	6	6	5	15	12	4.03	4.03
	Estructura	Región	Positivos / campo								X**	S**
CD25	Domo	Punta	15	12	8	5	29	20	22	24	16.87	8.28
		Intermedio	8	12	15	11	32	33	14	34	19.87	11.07
		Base	10	20	28	35	2	4	3	2	13	12.19
	Bazo	Pulpa Roja	10	8	3	4	10	12	10	3	7.5	5.62
		Pulpa Blanca	15	17	22	18	20	16	20	13	17.62	2.97
	Estructura	Región	Positivos / campo								X**	S**
CD43	Domo	Punta	12	20	23	9	42	26	32	48	26.5	13.64
		Intermedio	40	43	58	63	60	58	43	48	51.62	9.08
		Base	22	16	18	21	14	28	18	12	18.62	5.04
	Bazo	Pulpa Roja	28	33	14	28	28	18	46	20	26.87	9.99
		Pulpa Blanca	48	56	61	34	54	42	38	27	45	11.77

*Los datos obtenidos son el promedio de los 4 campos observados y analizados por región considerando el tipo de anticuerpo monoclonal utilizado.

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

CUADRO 5.- CONTEO DE LINFOCITOS MARCADOS EN EL APÉNDICE CECAL Y EL BAZO DE LOS CONEJOS INOCULADOS CON LA CEPA *E. COLI* EDL 933.

	Estructura	Región	Positivos / campo								X**	S**
CD4	Domo	Punta	4	3	6	3	4	2	1	3	8.87	3.35
		Intermedio	2	4	8	6	10	14	8	9	22.5	10.98
		Base	24	12	17	13	28	31	10	11	35.5	9.24
	Bazo	Pulpa Roja	18	16	11	14	25	20	26	23	19.12	5.35
		Pulpa Blanca	5	8	9	8	3	6	2	2	5.37	2.82
	Estructura	Región	Positivos / campo								X**	S**
CD5	Domo	Punta	12	23	18	16	10	4	6	3	11.5	7.13
		Intermedio	36	21	12	17	10	9	12	14	7.5	4.62
		Base	28	16	46	32	21	14	15	9	19.5	10.15
	Bazo	Pulpa Roja	20	19	16	22	21	36	27	19	22.5	6.30
		Pulpa Blanca	6	8	17	22	2	4	3	2	8.12	7.41
	Estructura	Región	Positivos / campo								X**	S**
CD25	Domo	Punta	12	23	18	16	10	4	6	3	13.75	2.32
		Intermedio	4	8	16	12	2	4	6	8	5	2.92
		Base	28	16	4	63	221	14	15	9	9.62	5.42
	Bazo	Pulpa Roja	20	19	16	22	21	36	27	19	19.25	6.29
		Pulpa Blanca	6	8	17	22	2	4	3	2	7	7.03
	Estructura	Región	Positivos / campo								X**	S**
CD43	Domo	Punta	4	6	3	8	4	2	1	2	10.12	5.40
		Intermedio	21	12	8	10	8	9	7	2	14.87	5.27
		Base	10	12	14	16	21	12	10	8	27.25	9.83
	Bazo	Pulpa Roja	18	20	24	31	18	14	19	10	15	6.02
		Pulpa Blanca	4	8	12	22	3	4	2	1	8.12	4.88

*Los datos obtenidos son el promedio de los 4 campos observados y analizados por región del animal inoculado con la cepa *E.coli* EDL 933 IBT.

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

CUADRO 6.- CONTEO DE LINFOCITOS MARCADOS EN EL APÉNDICE CECAL Y EL BAZO DE LOS CONEJOS INOCULADOS CON CEPA SILVESTRE *E. COLI* 8624.

	Estructura	Región	Positivos / campo								X**	S**
CD4	Domo	Punta	21	17	14	18	70	55	68	46	38.62	23.84
		Intermedio	48	36	31	27	28	33	12	18	29.12	10.98
		Base	21	8	10	14	6	9	13	14	11.85	4.70
	Bazo	Pulpa Roja	46	38	27	44	39	12	20	30	47.25	27.84
		Pulpa Blanca	86	78	45	68	15	21	30	10	28.87	13.20
	Estructura	Región	Positivos / campo								X**	S**
CD5	Domo	Punta	28	18	21	13	12	9	10	21	16.5	6.61
		Intermedio	4	6	13	11	12	8	10	13	9.62	3.33
		Base	8	9	11	4	46	51	41	48	27.75	18.75
	Bazo	Pulpa Roja	8	7	11	4	8	10	5	2	35.75	23.08
		Pulpa Blanca	47	38	56	78	20	15	12	10	6.87	3.04
	Estructura	Región	Positivos / campo								X**	S**
CD25	Domo	Punta	38	27	48	21	22	48	18	28	31.25	19.28
		Intermedio	31	28	24	19	12	13	21	18	20.75	6.71
		Base	8	9	13	11	6	4	9	6	8.25	2.91
	Bazo	Pulpa Roja	28	40	31	27	15	8	10	8	21.87	14.15
		Pulpa Blanca	6	8	4	7	7	5	8	7	6.5	1.41
	Estructura	Región	Positivos / campo								X**	S**
CD43	Domo	Punta	47	68	38	42	14	28	33	24	36.75	16.39
		Intermedio	13	10	12	9	12	8	9	18	11.37	3.20
		Base	8	12	11	7	16	28	15	13	8.12	2.58
	Bazo	Pulpa Roja	48	56	38	61	16	28	15	20	35	18.24
		Pulpa Blanca	28	57	27	33	10	12	16	29	25.57	14.93

*Los datos obtenidos son el promedio de los 4 campos observados y analizados por región del animal inoculado con la cepa silvestre *E.coli* 8624.

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

CUADRO 7.- CONTEO DE LINFOCITOS MARCADOS EN EL APÉNDICE CECAL Y EL BAZO DE LOS CONEJOS INOCULADOS CON CEPA MUTANTE E. COLI_P9C12D4.

	Estructura	Región	Positivos / campo								X**	S**
CD4	Domo	Punta	4	8	9	12	5	8	11	16	9.12	3.87
		Intermedio	18	12	10	13	28	16	14	8	14.87	6.17
		Base	6	4	8	9	8	10	7	4	7	2.20
	Bazo	Pulpa Roja	20	14	12	22	12	11	8	17	14.5	4.78
		Pulpa Blanca	21	4	10	8	21	38	22	18	18.12	10.82
CD5	Domo	Punta	12	10	8	12	4	2	1	6	6.87	4.32
		Intermedio	28	18	21	10	18	32	48	16	23.87	11.92
		Base	8	4	2	7	8	6	12	10	6.37	3.85
	Bazo	Pulpa Roja	16	12	8	14	17	8	18	25	14.75	5.62
		Pulpa Blanca	4	8	2	1	2	0	1	3	2.62	2.5
CD25	Domo	Punta	12	8	5	6	28	32	16	21	16	10.18
		Intermedio	8	20	10	8	10	8	12	15	1.37	4.24
		Base	8	9	6	3	18	10	13	15	12.5	6.23
	Bazo	Pulpa Roja	8	2	1	4	24	31	18	27	5.25	2.65
		Pulpa Blanca	8	10	2	4	4	6	5	3	14.37	12.08
CD43	Domo	Punta	4	8	4	6	5	7	3	4	5.12	1.72
		Intermedio	8	10	14	16	18	31	14	10	13.4	7.14
		Base	8	17	22	31	22	38	27	18	22.87	9.20
	Bazo	Pulpa Roja	21	14	10	22	32	37	14	28	22.5	9.16
		Pulpa Blanca	71	46	58	48	21	53	10	17	40.5	21.85

*Los datos obtenidos son el promedio de los 4 campos observados y analizados por región del animal inoculado con la cepa mutante *E.coli* P9C12D4.

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

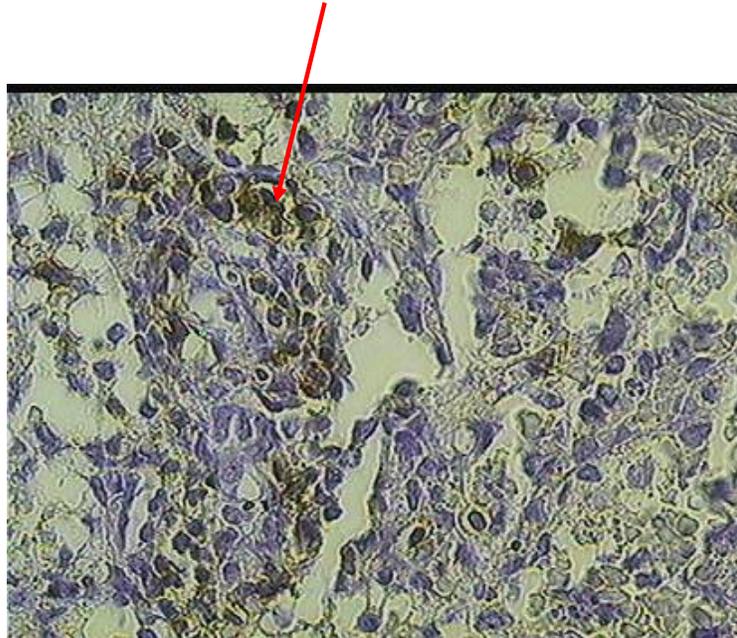
CUADRO 8.- CONTEO DE LINFOCITOS MARCADOS EN EL APÉNDICE CECAL Y EL BAZO DE LOS CONEJOS INOCULADOS CON CEPA MUTANTE *E. COLI* P9C8B1.

	Estructura	Región	Positivos / campo								X**	S**
CD4	Domo	Punta	8	7	9	7	2	1	1	0	4.37	3.70
		Intermedio	18	27	47	23	3	8	2	3	16.37	15.72
		Base	28	48	33	35	4	6	4	8	20.75	17.27
	Bazo	Pulpa Roja	10	11	9	12	38	21	12	16	2.87	1.55
		Pulpa Blanca	6	4	2	3	2	3	1	2	13.57	11.24
	Estructura	Región	Positivos / campo								X**	S**
CD5	Domo	Punta	8	9	18	9	1	2	1	1	4.87	3.90
		Intermedio	4	6	9	12	7	3	1	1	4.75	3.99
		Base	18	21	13	18	4	8	10	12	13.25	5.62
	Bazo	Pulpa Roja	13	14	2	18	40	31	12	18	2.37	1.72
		Pulpa Blanca	4	1	2	4	2	1	3	6	20.87	9.80
	Estructura	Región	Positivos / campo								X**	S+**
CD25	Domo	Punta	2	8	3	2	1	2	3	1	2.75	2.25
		Intermedio	4	12	13	9	1	4	9	1	6.5	4.69
		Base	18	21	12	16	2	4	9	1	10.75	7.77
	Bazo	Pulpa Roja	32	24	18	29	38	42	28	33	13.25	8.63
		Pulpa Blanca	8	18	22	28	11	2	8	9	33	8.40
	Estructura	Región	Positivos / campo								X**	S**
CD43	Domo	Punta	12	14	16	21	4	12	8	10	12.36	5.06
		Intermedio	46	31	22	33	2	4	1	3	17.75	17.56
		Base	8	12	13	13	8	12	14	10	12	3.58
	Bazo	Pulpa Roja	21	48	13	26	41	48	38	50	22	19.56
		Pulpa Blanca	4	28	32	64	8	10	12	18	36.37	14.97

*Los datos obtenidos son el promedio de los 4 campos observados y analizados por región del animal inoculado con la cepa mutante de *E.coli* P9C8B1.

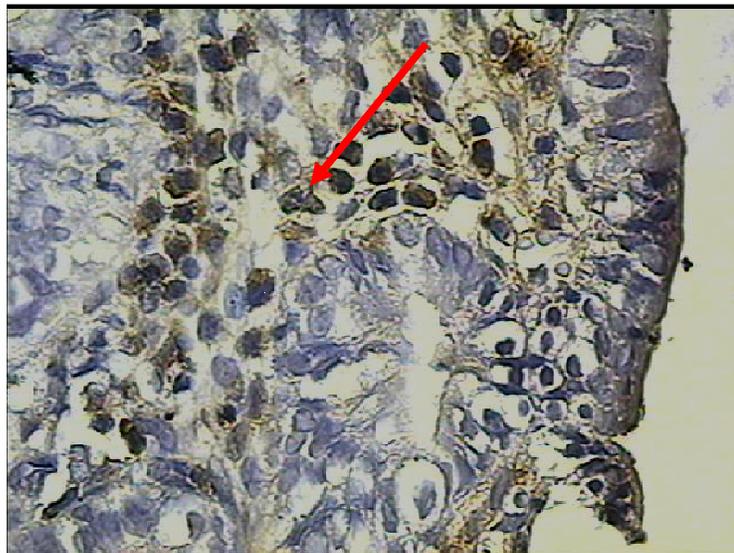
**X se refiere a la media y S a la desviación estándar.

Fig. 2.- Corte histológico del Domo apéndice cecal del conejo inoculado con la cepa EDL 933 y teñido mediante inmunoperoxidasa para el marcador CD4.



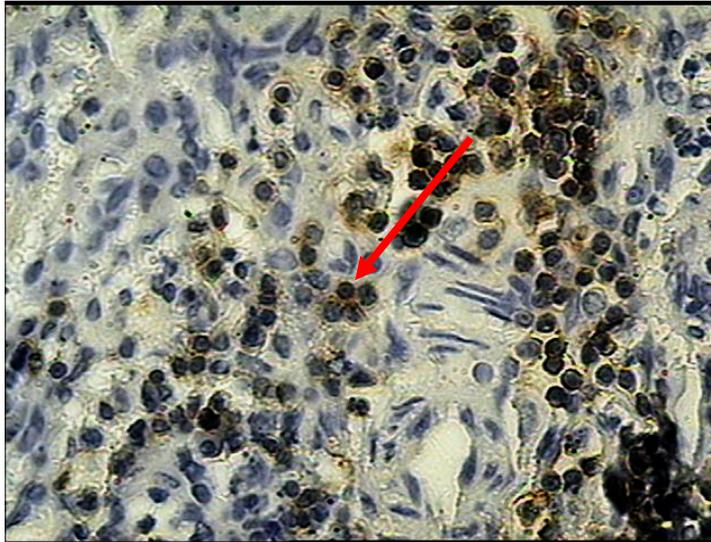
Las flechas indican las células marcadas con el anticuerpo monoclonal antiCD4.

Fig. 3.- Corte histológico de la pulpa blanca del bazo del conejo inoculado con la cepa EDL 933 y teñido mediante inmunoperoxidasa para el marcador CD4.



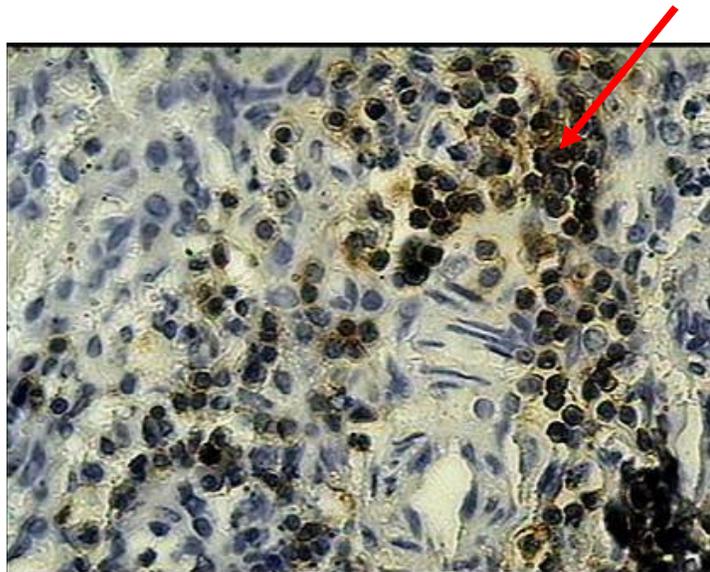
Las flechas indican las células marcadas con el anticuerpo monoclonal antiCD4.

Fig. 4.- Corte histológico del Domo del apéndice cecal del conejo inoculado con la cepa 86-24 y teñido mediante inmunoperoxidasa para el marcador CD5.



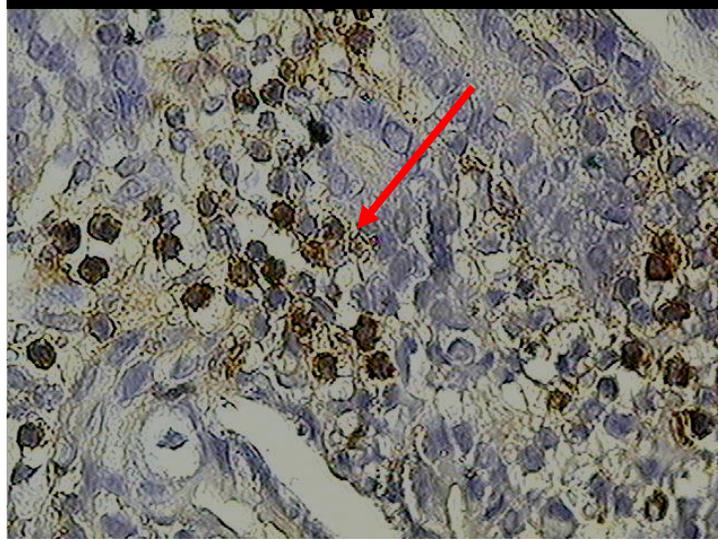
Las flechas indican las células marcadas con el anticuerpo monoclonal antiCD5.

Fig. 5.- Corte histológico de la pulpa blanca del bazo inoculado con la cepa 86-24 y teñido mediante inmunoperoxidasa para el marcador CD5.



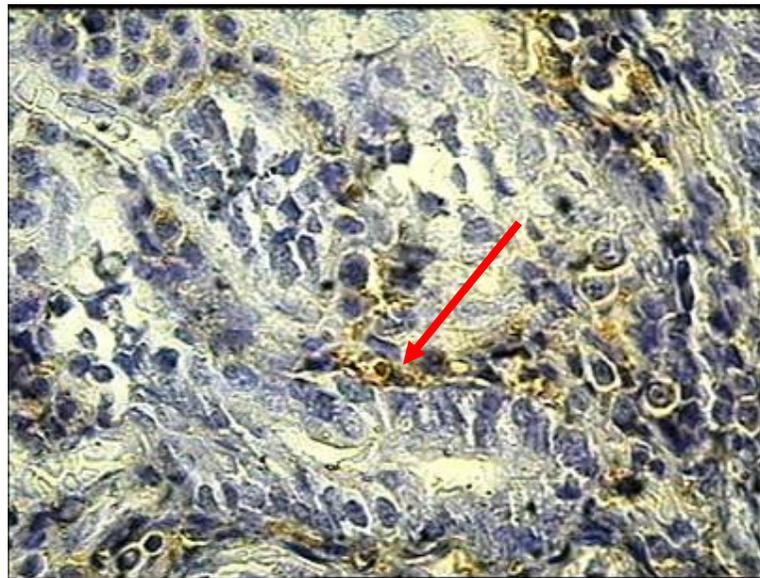
Las flechas indican las células marcadas con el anticuerpo monoclonal antiCD5.

Fig. 6.- Corte histológico del Domo del apéndice cecal del conejo inoculado con la cepa P9C12D4 y teñido mediante inmunoperoxidasa para el marcador CD25.



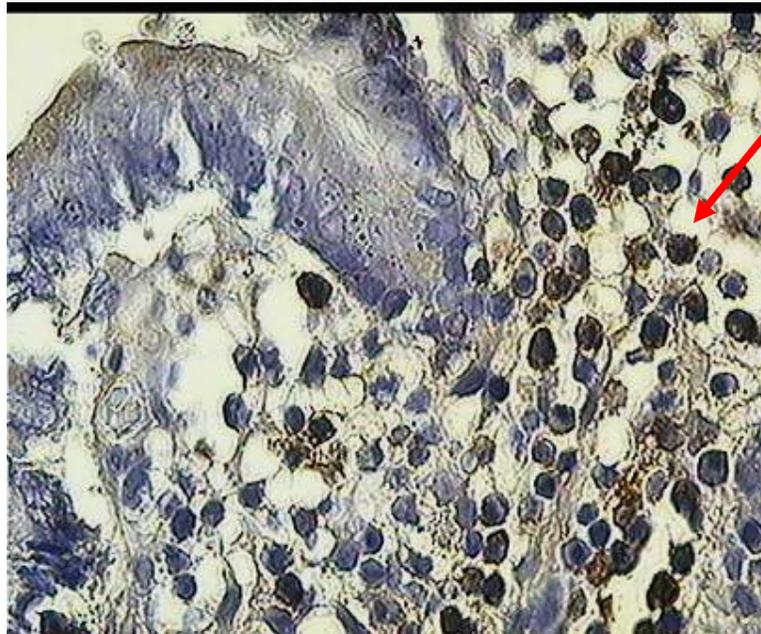
Las flechas indican las células marcadas con el anticuerpo monoclonal antiCD25.

Fig. 7.- Corte histológico de la pulpa blanca del bazo cecal del conejo inoculado con la cepa P9C12D4 y teñido mediante inmunoperoxidasa para el marcador CD25.



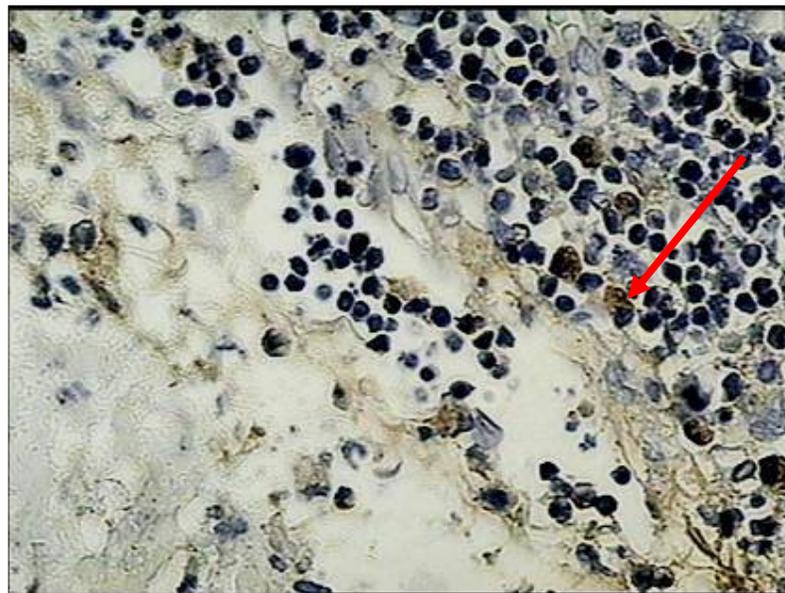
Las flechas indican las células marcadas con el anticuerpo monoclonal antiCD25.

Fig. 8- Corte histológico del Domo del apéndice cecal del conejo inoculado con la cepa P9C8B1 y teñido mediante inmunoperoxidasa para el marcador CD43.



Las flechas indican las células marcadas con el anticuerpo monoclonal antiCD43.

Fig. 9.- Corte histológico de la pulpa blanca del bazo cecal del conejo inoculado con la cepa P9C8B1 y teñido mediante inmunoperoxidasa para el marcador CD43.



Las flechas indican las células marcadas con el anticuerpo monoclonal antiCD43.

CUADRO 9.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO COMPARANDO LOS DATOS DE LOS CONEJOS INOCULADOS CON LA CEPA SILVESTRE 8624 Y LOS CONEJOS INOCULADOS CON LAS CEPAS MUTANTES P9C12D4 Y P9C8B1.

	Estructura	Región	8624 Vs P9C12D4	IP	8624 Vs P9C8B1	IP	P9C12D4 Vs P9C8B1	IP
CD4	Domo	Punta	0.0039*	↓	0.0012*	↓	0.0250*	↓
		Intermedio	0.0057*	↓	0.0811	NDS	0.8054	NDS
		Base	0.0170*	↓	0.1827	NDS	0.0423*	↑
	Bazo	Pulpa Roja	0.0036*	↓	0.0110*	↓	0.6758	NDS
		Pulpa Blanca	0.0026*	↓	0.0015*	↓	0.0015*	↓
	Estructura	Región						
CD5	Domo	Punta	0.0039*	↓	0.0055*	↓	0.7798	NDS
		Intermedio	0.0059*	↑	0.0686	NDS	0.0022*	↓
		Base	0.0173*	↓	0.0834	NDS	0.0238	NDS
	Bazo	Pulpa Roja	0.0036*	↑	0.0177*	↓	0.4324	NDS
		Pulpa Blanca	0.0026*	↓	0.0027*	↓	0.8195	NDS
	Estructura	Región						
CD25	Domo	Punta	0.0157*	↓	0.0001*	↓	0.0029*	↓
		Intermedio	0.0048*	↓	0.0001*	↓	0.5393	NDS
		Base	0.3373	NDS	0.6643	NDS	0.8158	NDS
	Bazo	Pulpa Roja	0.3002	NDS	0.0789	NDS	0.0054*	↑
		Pulpa Blanca	0.2600	NDS	0.0465*	↓	0.0252*	↑
	Estructura	Región						
CD43	Domo	Punta	0.0000*	↓	0.0011*	↓	0.0026*	↑
		Intermedio	0.2016	NDS	0.3296	NDS	0.7018	NDS
		Base	0.0383*	↓	0.3254	NDS	0.0037*	↓
	Bazo	Pulpa Roja	0.0955	NDS	0.9638	NDS	0.0419*	↑
		Pulpa Blanca	0.1573	NDS	0.6136	NDS	0.961	NDS

*Indica diferencias significativas (p< 0.05).

La prueba de T de student se realizó en el programa * Statistica. *

IP: Indica interpretación.

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

NDS: No existe diferencia significativa entre las cepas comparadas.

Vs: Comparación entre 2 cepas.

8624 Vs P9C12D4: Se comparó la cepa 8624 en contra de la cepa mutante P9C12D4.

8624 Vs P9C8B1: Se comparó la cepa 8624 en contra de la cepa mutante P9C8B1.

P9C12D4 Vs P9C8B1: Se comparó la cepa mutante P9C12D4 en contra de la cepa mutante P9C8B1.

CUADRO 10.
ANÁLISIS ESTADÍSTICO COMPARANDO LOS DATOS DE LOS CONEJOS
INOCULADOS LA CEPA EDL 933 Y CALDO SOYA TRIPTICASEINA.

	Estructura	Región	EDL 933 Vs CST	IP
CD4	Domo	Punta	0.9423	NDS
		Intermedio	0.7352	NDS
		Base	0.0090*	↑
	Bazo	Pulpa Roja	0.0000*	↑
		Pulpa Blanca	0.5763	NDS
	Estructura	Región		
CD5	Domo	Punta	0.1397	NDS
		Intermedio	0.5685	NDS
		Base	0.1429	NDS
	Bazo	Pulpa Roja	0.1551	NDS
		Pulpa Blanca	0.8705	NDS
	Estructura	Región		
CD25	Domo	Punta	0.1861	NDS
		Intermedio	0.0112*	↓
		Base	0.3104	NDS
	Bazo	Pulpa Roja	0.0000*	↑
		Pulpa Blanca	0.0678	NDS
	Estructura	Región		
CD43	Domo	Punta	0.0003*	↓
		Intermedio	0.0000*	↓
		Base	0.0255*	↓
	Bazo	Pulpa Roja	0.0892	NDS
		Pulpa Blanca	0.0000*	↓

*Indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

La prueba de T de student se realizó en el programa * Statistica *

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

IP: Indica la interpretación

NDS: No existe diferencia significativa entre las cepas comparadas.

Vs: Comparación entre 2 cepas

CST Vs EDL933: Se comparo el cultivo de Caldo Soya Tripticaseina en contra de la cepa EDL 9333.

CUADRO 11.
ANÁLISIS ESTADÍSTICO COMPARANDO LOS DATOS DE LOS CONEJOS INOCULADOS
CON LA CEPA EDL 933 Y LOS CONEJOS INOCULADOS CON LA CEPA SILVESTRE 8624.

	Estructura	Región	EDL 933 Vs 8624	IP
CD4	Domo	Punta	0.0081*	↑
		Intermedio	0.0020*	↑
		Base	0.0346*	↓
	Bazo	Pulpa Roja	0.0664	NDS
		Pulpa Blanca	0.005*	↓
	Estructura	Región		
CD5	Domo	Punta	0.1679	NDS
		Intermedio	0.0626	NDS
		Base	0.05693	NDS
	Bazo	Pulpa Roja	0.5591	NDS
		Pulpa Blanca	0.0112*	↑
	Estructura	Región		
CD25	Domo	Punta	0.0012*	↑
		Intermedio	0.0004*	↑
		Base	0.0654	NDS
	Bazo	Pulpa Roja	0.7427	NDS
		Pulpa Blanca	0.5871	NDS
	Estructura	Región		
CD43	Domo	Punta	0.0000*	↑
		Intermedio	0.4450	NDS
		Base	0.7536	NDS
	Bazo	Pulpa Roja	0.0342*	↑
		Pulpa Blanca	0.0049*	↑

*Indica diferencias significativas.

La prueba de T de student se realizó en el programa * Statistica.

IP: Indica la interpretación

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

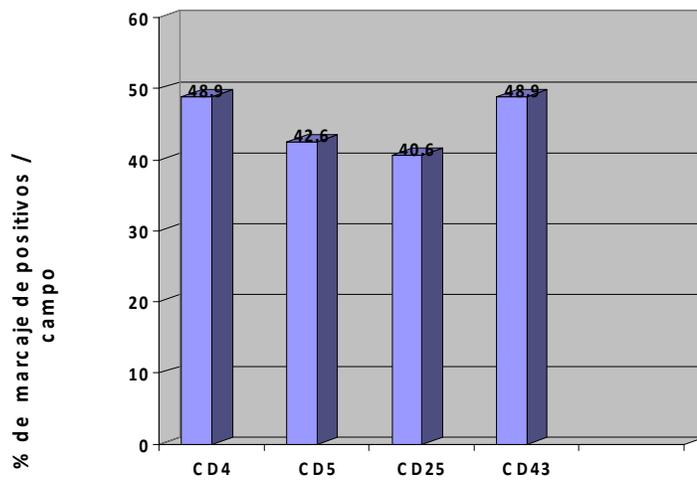
NDS: No existe diferencia significativa entre las cepas comparadas

Vs Indica comparación entre 2 cepas.

EDL 933Vs 8624: Se comparó la cepa EDL 933 en contra de la cepa mutante 8624

Fig.- 10.-

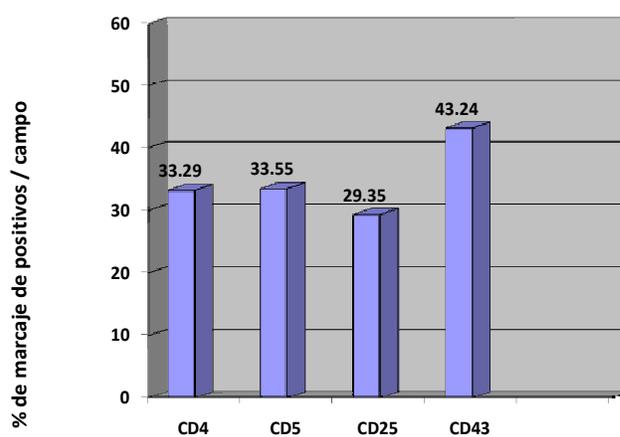
Distribución de los linfocitos en el Domo del apéndice cecal de los conejos sanos a los 60 días de edad.



Nota: Los datos se obtuvieron del promedio de las células marcadas por los diferentes monoclonales del Domo del apéndice cecal de los conejos sanos. (Valdivia y col., 2007.).

Fig.- 11

Distribución de los linfocitos en el bazo de los conejos sanos a los 60 días de edad.



Nota: Los datos se obtuvieron del promedio de las células marcadas por los diferentes monoclonales del bazo de los conejos sanos (Valdivia y col., 2007).

El efecto encontrado en el Domo del apéndice cecal de los conejos inoculados con las diferentes cepas sobre los linfocitos marcados por los monoclonales utilizados son los siguientes:

Para los conejos inoculados con Caldo Soya Trypticaseina, no hubo diferencia significativa entre los marcadores de linfocitos utilizados, tal y como lo indica el cuadro 12.

En la cepa EDL933 se observó una disminución de linfocitos muy marcada para los linfocitos identificados con el monoclonal CD4, y una leve disminución en el número de linfocitos para el monoclonal CD5, CD25 y CD43, como se observa en el cuadro 12.

Con respecto a la cepa silvestre 86-24, se obtuvo un marcado aumento en el número de linfocitos para el monoclonal CD4 y CD5, así como una leve disminución en el número de linfocitos marcados para el monoclonal CD25, y un marcado aumento para el monoclonal CD43. Estos resultados se pueden observar en el cuadro 12.

Para la cepa hiperadherente P9C12D4, el monoclonal CD4 tuvo una leve disminución, y para el monoclonal CD5 no se encontró diferencia significativa.

Para los linfocitos marcados con el monoclonal CD25 se observó una marcada disminución, mientras que para el marcador CD43 solo se observó una leve disminución en el número de linfocitos identificados.

En la cepa hipoadherente P9C8B1 no se observó diferencia significativa por el monoclonal CD4, pero para los linfocitos marcados con los monoclonales CD5, CD25 y CD43 solo se observó una leve disminución del marcaje de dichos linfocitos; Tal y como se puede observar en el cuadro #12.

El efecto en el bazo de los conejos inoculados por los factores de virulencia sobre las células marcadas con los anticuerpos monoclonales empleados son los siguientes:

Para los conejos inoculados con caldo soya tripticaseina, no se observó diferencia significativa en ninguno de los marcadores de linfocitos utilizados.

El resultado para la cepa EDL933, consta de una leve disminución en el marcaje para el monoclonal CD4, CD54 y CD25 así como una marcada disminución en el número de linfocitos marcados para el monoclonal CD43.

En la cepa 86-24 se observó un marcado aumento en el número de linfocitos teñidos por los monoclonales CD4 y CD5, así como un mayor número de linfocitos marcados con el monoclonal CD25 y para finalizar con esta cepa, no existe diferencia significativa para el monoclonal CD43 tal y como se observa en el cuadro 13

La cepa P9C12D4 muestra como resultado que no hay diferencia significativa para los linfocitos marcados con los monoclonales CD4 y CD5, así como una marcada disminución de linfocitos para el monoclonal CD25 y una leve disminución para el monoclonal CD43. Así lo refiere el cuadro 13.

Por último los resultados encontrados para la cepa hipoadherente P9E8B1 es de no diferencia significativa para ninguno de los linfocitos marcados con los diferentes monoclonales empleados, este resultado se puede observar en el cuadro 13.

EFECTO POST- INOCULACIÓN.

Cuadro 12

Efecto causado en el Domo del apéndice cecal del conejo por los factores de virulencia sobre las células marcadas con los anticuerpos empleados en el experimento.

Inoculo de <i>E.coli</i>	Genotipo	Fenotipo	Marcador CD4	Marcador CD5	Marcador CD25	Marcador CD43
CST			NDS	NDS	NDS	NDS
EDL 933 IBT	ler +, eae+, stx1+, stx2+	O157:H7 Stx1+, Stx2+	↓↓↓*	↓*	↓*	↓*
8624	eae+, ler+, cadA + csgD+ stx1+,stx2+	Silvestre O157:H7 Stx1+, stx2+ Cad A+, CsgD+	↑↑↑*	↑↑↑*	↓*	↑↑↑*
P9C12D4	cadA + csgD- eae+ler+ stx1+,stx2+	lisina - Stx1+, Stx2+ Mayor adhesión fimbrial	↓*↓↓*	↓*	↓↓↓*	↓↓*
P9C8B1	cadA - csgD+ eae+ ler+ stx1+,stx2+	Stx1+, Stx2+ fimbrias enroscadas	NDS	↓*	↓*	↓*

- ↓.- Indica leve disminución del marcador.
 ↓↓.- Indica mayor disminución del marcador.
 ↓↓↓.- Indica marcada disminución del marcador.
 ↑.- Indica leve aumento del marcador.
 ↑↑.- Indica mayor aumento del marcador.
 ↑↑↑.- Indica marcado aumento del marcador.
 (*).-indica diferencia significativa (p< a 0.05).

Cuadro 13.

Efecto causado por los factores de virulencia sobre las células marcadas con los anticuerpos empleados en el experimento, en el bazo del conejo.

Inoculo de <i>E.coli</i>	Genotipo	Fenotipo	Marcador CD4	Marcador CD5	Marcador CD25	Marcador CD43
CST			NDS	NDS	NDS	NDS
EDL 933 IBT	ler +, eae+, stx1+, stx2+	O157:H7 Stx1+, Stx2+	↓*	↓*	↓*	↓ ↓ ↓*
8624	eae+, ler+, cadA + csgD+ stx1+,stx2+	Silvestre O157:H7 Stx1+, stx2+ Cad A+, CsgD+	↑↑↑*	↑↑↑*	↑↑*	NDS
P9C12D4	cadA + csgD- eae+ler+ stx1+,stx2+	lisina - Stx1+, Stx2+ Mayor adhesión fimbrial	↓	↓	↓↓↓*	↓*
P9C8B1	cadA - csgD+ eae+ ler+ stx1+,stx2+	Stx1+, Stx2+ fimbrias enroscadas	NDS	NDS	NDS	NDS

- ↓.- Indica leve disminución del marcador.
 ↓.- Indica mayor disminución del marcador.
 ↓↓↓.- Indica marcada disminución del marcador.
 ↑.- Indica leve aumento del marcador.
 ↑↑.- Indica mayor aumento del marcador.
 ↑↑↑.- Indica marcado aumento del marcador.
 (*).-indica diferencia significativa (p< a 0.05).

Notas: En este cuadro es importante considerar que una disminución (↓) verdaderamente implica la baja del número de linfocitos en el tejido analizado

Por el contrario un aumento no significativo (↑) implica que sobre este marcador no se tuvo efecto, de tal forma, que el aumento es relativo a la baja absoluta de otros linfocitos no marcado

DISCUSIÓN.

Durante la estandarización de la prueba de inmunoperoxidasa, se utilizó como bloqueador de receptores inespecíficos la albumina bovina al 1% tal y como lo indicó en trabajos anteriores Elias JM,(1982); a diferencia de Cortés,(2003)., Brambilla y Martínez,(2006), las cuales utilizaron en su trabajo suero normal de conejo. A pesar de que no se utilizó el mismo bloqueador de receptores inespecíficos, se obtuvo el mismo resultado favorable, ya que como menciona Tarr (1981), se pueden utilizar diferentes bloqueadores de receptores como puede ser suero normal de conejo o de cerdo y albumina bovina al 1%.

Se siguió la técnica de inmunoperoxidasa tradicional de Gaete, (1996), y se tomó especial atención en el control de la humedad de la cámara, ya que si no era precisa y era demasiada humedad se condensa el agua y podía interferir en la reacción y por otro lado, muy poca humedad provocaría que los anticuerpos se secaran dando falsos positivos (Stefan, 1998).

Otro punto importante es la utilización de la diaminobenzidina, la cual provino de un KIT comercial de la marca DAKO-LSAD peroxidasa, este cromógeno sólo se diluyó a un 50 % con TBS, y luego se aplicó por 55 segundos al tejido; a diferencia de Cortés, (2003) y Brambilla y Martínez, (2006), las cuales utilizaron tabletas de 10 mg de DAB (Diaminobenzidina) en 12.5 ml de TRIS-CL a un pH de 7.5, aplicado e incubado en cámara húmeda por 5 minutos.

Como se cambió el tiempo de aplicación del cromógeno en el presente trabajo, también se aplicó por mayor tiempo el colorante Hematoxilina de Harris (2 minutos), ya que se necesitó mayor contraste de color para poder diferenciar los linfocitos teñidos de color café-cobrizo. En dicha reacción los datos obtenidos de los linfocitos marcados fueron por conteo manual (linfocitos marcados y contados X campo visual). Durante la estandarización de la prueba de inmunoperoxidasa , se utilizó como bloqueador de receptores inespecíficos a la albumina bovina al 1% tal y como lo indicó en trabajos anteriores Elias JM, (1982); a diferencia de Cortés (2003), y Brambilla y Martínez,(2006), las cuales utilizaron en su trabajo suero normal de conejo; A pesar de que no se utilizó el mismo bloqueador de receptores inespecíficos, se obtuvo el mismo resultado favorable, ya que como menciona Farr, (1981), se pueden utilizar diferentes bloqueadores de receptores, como puede ser suero normal de conejo o de cerdo y albumina bovina al 1%.

Otro punto importante es la utilización de la diaminobenzidina, la cual provino de un KIT comercial de la marca DAKO-LSAD peroxidasa, este cromógeno solo se diluyo. Es importante recordar el conteo de linfocitos marcados en un conejo sano a los 60 días de edad, ya que a partir de este marcaje se notó la diferencia entre las cepas testigo y las cepas problema en este trabajo.

Los rangos normales del Domo del apéndice cecal y el bazo de los conejos sanos se obtuvieron de reportes anteriores (Valdivia y col., 2007)

Efectos encontrados en el Domo del Apéndice cecal de los conejos inoculados con las diferentes cepas:

De acuerdo a los resultados en el cuadro 12 sobre la cantidad de los linfocitos marcados con el monoclonal CD4 en el Domo del apéndice cecal de los animales inoculados la cepa hiperadherente (P9C12D4) y la cepa hipoadherente (P9C8B1), dio como resultado que la cepa silvestre tuvo una disminución significativa en la concentración de linfocitos marcados, en comparación con las 2 cepas mutantes y se tomó como testigo (+) a la cepa EDL 933 y a la inoculación de caldo soya tripticaseina como testigo (-). Estos resultados no son parecidos con los reportes anteriormente descritos por Cortes (2003) al inocular y observar los efectos de la cepa K12 y la cepa EDL 933, ya que se mencionó que este linfocito (T cooperador) cumple una función clave para el reconocimiento del antígeno y así desarrollar una buena respuesta inmunológica.

De acuerdo a Roit y Tizard.(2000), este linfocito tiene 2 subpoblaciones con respecto a las citocinas que produce, TH1 el cual secreta IL 2, IFN δ y TNF β durante las primeras horas de la estimulación del antígeno actuando principalmente sobre los macrófagos. Los linfocitos TH2 secretan IL4, IL5, IL10 e IL13 además de que estimulan la proliferación de linfocitos B para luego secretar inmunoglobulinas; Pero también los resultados obtenidos en este trabajo contradicen a los de Flager y col, en el 2007 los cuales mencionan que la simple presencia de neutrófilos y macrófagos aumentan los efectos de la toxina de shiga y empeoran la depresión inmunológica vía citocinas, disminuyendo la cantidad de linfocitos CD4.

Los conejos que se inocularon con la cepa hiperadherente (P9C12D4), fueron los que tuvieron un menor marcaje con el monoclonal CD4, en comparación con la cepa hipoadherente (P9C8B1) y la cepa silvestre, este resultado sugiere que los lipopolisacáridos son los responsable de la disminución de este marcador, Valdivia en

1995, y en el 2002; así como la múltiple destrucción de linfocitos, neutrófilos y macrófagos por el mecanismo de apoptosis (Watson y col, 1996); o simplemente por el daño causado al órgano, al cortarlo y formar un saco ciego en el apéndice cecal (Marcato y col., 2001).

Los resultados encontrados en este trabajo y los resultados previos sugieren que la interacción de los efectos entre las toxinas Stx y los genes LEE que corresponde a la isla de patogenicidad cromosomal llamada(Locus of enterocyte effacement), parecen actuar simultáneamente, presentándose el efecto de disminución y destrucción de linfocitos por las toxinas asociadas al receptor Gb3 localizado sobre las membranas de dichos linfocitos y posteriormente al factor pro inflamatorio de la intimina y el LPS que desencadenan a las citocinas, esto último se aprecia en trabajos como los de Valdivia, (2002) y Harrison, LM.(2005).

Klapproth y col 2000 mencionan que *E. coli* enteropatógena produce una linfostatina que inhibe la proliferación de linfocitos así como de la producción de IL2, IL4 e IFN, esto explica la disminución de los linfocitos CD4, ya que una subpoblación de estos (TH1) son los que producen la IL2 y los TH2 producen la IL4 responsable de la multiplicación y diferenciación de linfocitos B.

El resultado en el cuadro 12 para el marcador CD5, indicó que hubo una depleción de este marcador en la cepa P9C8B1, pudiendo sugerir una depleción inmunológica, Torres y col. (2005) mencionan que esta cepa tiene menor capacidad fimbrial afectando su virulencia y por otro lado mencionan que la cepa 86-24 y la cepa P9C12D4 son las que deberían tener una depleción inmunológica más marcada al tener mayor capacidad de adherencia.

Torres y col en el 2005 también mencionan que el gen *cadA*, el cual está contenido en la cepa P9C12D4, en ciertos medios es un gen regulador de la capacidad de virulencia, pudiendo explicar por que no se dio el marcaje tan disminuido tal y como se observó para la cepa P9C8B1 sin tener el mismo gen.

Los valores que se muestran para el marcador CD25 en el mismo cuadro, mostraron que la cepa silvestre provocó una disminución significativa, y la cepa hiperadherente tuvo el menor marcaje con respecto a la cepa silvestre y a la cepa hipoadherente, este resultado podría deberse a la acción de las verotoxinas, disminuyendo de manera marcada los linfocitos B y T activos.

También se observó que el monoclonal CD43 (Linfocitos T, NK y células B activas) tuvo una disminución significativa para la cepa hipoadherente, aunque la cepa

hiperadherente también mostro una marcada disminución en comparación con la cepa 86-24, para la cual se observó un marcaje elevado. Esto indicó que a pesar de tener el fenotipo hipoadherente (fimbrias enroscadas), la bacteria (*E. coli* O157:H7) tuvo mayor capacidad de disminuir este tipo de célula.

Hay que recordar que para la cepa 86-24, el marcaje elevado de todos los linfocitos marcados podría deberse a la ausencia del marcaje de otro linfocito no contado, ya que como lo menciona Cortes (2003) y Torres (2005), esta cepa tiene los mismos genes de virulencia que la cepa EDL933.

Efecto en el bazo de los conejos inoculados.

Con respecto a los resultados para el monoclonal CD4 en el cuadro 13, se observó que, las cepas mutantes tuvieron una mayor depleción en el conteo de linfocitos, en comparación con la cepa madre la cual tuvo un aumento de células T en la pulpa blanca, este resultado concuerda con los resultados previos de Valdivia, (2002) los cuales indican que el efecto es netamente por las verotoxinas de la bacteria y las citocinas circulantes en el organismo.

Al observar el marcaje de la cepa silvestre, en este mismo cuadro y para este mismo monoclonal, indicó un aumento de linfocitos T y B, este resultado pudo corresponder al aumento de células marcadas en el apéndice cecal, indicando una respuesta inmunológica adecuada, tal y como lo menciona Tizard, (2000), indicando que aumento la respuesta de alerta de linfocitos CD4 cooperadores hacia el área de daño endotelial.

Para el marcador CD5 de la cepa P9C12D4 en el mismo cuadro, fue la única que reportó una disminución significativa en el marcaje igual que la cepa testigo (+) EDL 933 indicando que la hiperadherencia o mayor adhesión fimbrial está directamente relacionada con el daño vía verotoxinas, disminuyendo la producción de células del sistema inmune en el bazo como células T y B inmaduras tal y como también indican trabajos de Brambilla y Martínez, (2006), Solís, (2008), los cuales indicaron una disminución de dichos linfocitos, inclusive de forma macroscópica en el bazo y específicamente en la pulpa blanca del mismo.

En el cuadro 13 el marcador CD25 tuvo una disminución significativa del marcaje para la cepa hiperadherente, este resultado concuerda con trabajos anteriores de Torres y col, 2003 para los cuales menciona que las fimbrias enroscadas de la cepa hipoadherente tiene menor capacidad para adherirse en superficies de células vivas, atenuando la

capacidad de la cepa para transferir rápidamente sus toxinas hacia el endotelio y luego hacia el torrente sanguíneo.

Para finalizar el monoclonal CD43 no tuvo un marcaje disminuido para la cepa madre, pero si disminuido para la cepa hiperadherente, indicando una disminución de los linfocitos B inmaduros; recordando que la IL1,IL6,IL8 y la IL10 junto con las verotoxinas de la bacteria regulan el decremento de estas células (Pérez,2002).Pero la cepa P9E8BI tuvo un aumento significativo con respecto a la cepa hiperadherente, este resultado puede indicar que al ser menor la capacidad de adhesión de la bacteria al epitelio celular debido sus fimbrias enroscadas y la poca capacidad de producir un buen biofilm, no afecta en gran medida la producción de linfocitos T, NK y células B activas, existentes en el bazo; y el daño vía citocinas producidas por el mismo organismo y las verotoxinas producidas por la bacteria no es tan grave como para producir depleción de este marcador en el bazo.

CONCLUSIONES:

La cepa silvestre 86-24 afectó los linfocitos T y B activos tanto en el Domo del apéndice cecal como en el bazo de los conejos inoculados.

La cepa mutante en el gen *cad A* alterado y con el fenotipo hiperadherente afectó disminuyendo significativamente a los pre-linfocitos T y células T y B inmaduras presentes en el Domo del apéndice cecal y el bazo de los conejos inoculados.

La cepa mutante en el gen *csg D* y de fenotipo hipoadherente tuvo disminución significativa en los linfocitos pre-linfocitos T y B, células T y B inmaduras y Timocitos del Domo del apéndice cecal y no tuvo efectos en el bazo de los conejos inoculados.

La inoculación de la cepa silvestre y sus 2 mutantes en el apéndice cecal del conejo desarrolló un efecto sistémico.

RECOMENDACIONES

Es necesario realizar más investigaciones al respecto para poder definir si el efecto observado en el presente trabajo es directo de las toxinas sobre los linfocitos o se trata de una modulación de la respuesta celular de los linfocitos.

BIBLIOGRAFÍA:

1. **Abbas, A.K. and Litchman, A.H 2000.** Inmunología celular y molecular.1ra edición. Mac Graw Hill Interamericana, España.pp.180-245
2. **Abe, A., Heczko, R.G., and Finlay, B.B.** 1998. Two enteropathogenic *Escherichia coli* type III secreted proteins, *EspA* and *EspB*, are virulence factors. J. Exp. Med.pp. **188**,1907–1916.
3. **Brambilla, D y Martinez R.M.** Efecto de los factores auxiliares de virulencia de *Escherichia coli* O157:H7 sobre los linfocitos titulares en un modelo en conejos. Tesis, FES-C. UNAM. México. 2006.pp.25-44,49-67
4. **Bel, C.Kyriakides A.** *E.coli* en una aproximación practica al organismo y su control en los alimentos. Editorial Acribia 1998; pp.1-6
5. **Blanco, M., Mora,A., Alonso M.A.P., Gonzáles, A.E y BLANCO, J.** 2000.*Escherichia coli* verotoxigenicas en España, ECVT, O157:H7 y no O157 en humanos y alimentos, el ganado bovino como reservorio, técnicas para la detección de ECVT. Universidad de Santiago Barcelona España.
6. **Brown, A.C., Harmon.G.B., Doyle Andersen O.A., And Mage Gr.** 2000.A morphological and immunological study of the human and rabbit appendix for comparison with de avian bursa .develop comp, immune.U.S.App. 24.797.814
7. **Caugant, D.A.,Levin,G.Liding, Jason T.S., Whitam,C.S., Whitma C.,**1999. Genetic diversity and relationship among strains of *Escherichia coli* in the intestine and those causing urinary tract infections.
8. **Cortes, F.A.N. 2003.**Identificación de infocitos infectados durante la infección experimental en el conejo por *Escherichia coli*. Enterohemorrágica. Tesis de Licenciatura. UNAM .México.pp.33-55

9. **Donuhue-Rolfe, A.I., Komdova, J. Mukherjee, K., Chios, D., Hurto. And Tzipori, S.** 1999. Antibody –base protection of Gnotobiotic Piglets infected with *Escherichia coli* O157.H7 against systemic protection associated with shiga Toxin 2 *Inmun* .pp.3645-3648
10. **Garcia, N. F. y Col.** 1999. Role of EspA and Intimin in Expression of Proinflammatory Cytokines from Enterocytes and Lymphocytes by Rabbit Enteropathogenic *Escherichia coli*-Infected Rabbits.
11. **Gaete,B.A.C.**1996. Manual de Técnicas Histológicas para Médicos Veterinarios Zootecnistas Tesis de Licenciatura FES-C-UNAM México.pp.105
12. **Gyles, C.L and C.O. Thoem** 1992. Pathogenesis of bacterial infection in Animal. Ed. Iowa State of University. U.S.A.pp. 734-746
13. **Enciclopedia medica de la salud en español.** nacional library of medicine Med. line pls U.S.A. 2001.pp115-250
14. **Estrada, F.E.** Manual de Técnicas Histológicas AGT. Editor México.pp. 1998 27-70.
15. **Flagler, M. Strasser, J., Chalk, C. Weiss, A.** Comparative Analysis of the Abilities of Shiga Toxins 1 and 2 To Bind to and Influence Neutrophil Apoptosis. *Infect. And immune*, 2007, **vol 75, No 2**:pp.760-765
16. **Gaete, B.A.**1999. Manual de técnicas histológicas para médicos veterinario zootecnistas”.Tesis de licenciatura FES UNAM México.pp.22-39
17. **Caldewood, S.B** 1994. In recent advances in verocytotoxin producing *Escherichia coli* infections *proceedings of the 2 international Symposium and workshop on verototoxin producing Escherichia coli infection”*.
18. **Harrison, L.,Mvan Den, Hoogenc.,** Chemokine expression in the monocytic cell line THP -1Response to purify Shiga Toxin 1 and/or Lipoporisacharides. *Infection and immunity* .pp.2005 403-412.

19. **Jawetz, M. Adelberg.** Microbiologia Medica 15| Ed. Brooks Butel Omston.pp. 1997 225-229.
20. **Jaime, F.J.C., Delgado,G.Y,Castillo, D.G.** Síndrome Urémico hemolítico Rev. Cuba Hematol Inmunol. Hemerot 2003.pp. 19, 2-3.
21. **Kapper, J.B Gansshero,F.F., L.O'Brien, A.D.** 1998. *Escherichia coli* strains.American society for Microbiology”, WashinggtonD.C:pp. 121-177.
22. **Lai Xin –He, J.G, Xu, S., Melga, and B.E Uhlin.**1999. An apoptotic response by macrophage cells is common upon infection with diarrhegenic *Escherichia coli* “FEMS Microbiology letters.
23. **Leuluard, H, Regio, H., Roy G.** Glycicalyx on Rabbit intestinal M Cell display Epytopes from muc. 2 2001 69:pp. 1061-1071.
24. **Mengue, C.H.L, Schlapp And Baljer** 1999. Shiga toxin 1 *E.coli* blocks activation and proliferation of Bovine Lymphocyte sub –population in vitro infect immune.pp27-29.
25. **Marcato, P., Murlay, D.G.** 2001. Cloned Shiga toxin 22NSub unit induced apoptosis in lymphocytes B cell infect immune.pp. 1979-1286.
26. **Orskov, F., Whyttam, T.S., Crevioto, A., Orskov, I.** 1990. Clonal relationship among classic enteropathogenic *Escherichia coli* EPEC belong to different O group j infect” Dis.pp21-22
27. **Perma, y Col.** 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic Escherichia coli 0157:H7 Nature” Pub med. 409:pp. 529-533.
28. **Puente, J.L., Finlay, B.B.** 2001. Pathogenic Escherichia coli in principles of bacterial pathogenesis” ed. E.A Grossman, academic Press.

29. **Paton A.C., y Paton A. W** 2000. Pathogenesis and diagnosis Of Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* infection” Clin Microbiology REV.
30. **Peres, Mi.** 2002. Efecto sobre la respuesta inmune provocada por *Escherichia coli* inoculada en el apéndice cecal de conejo” Tesis de Licenciatura FES UNAM.
31. **Pospisil, R. Mage, R.** 1998. Rabbit appendix a site of development of selection of the B cell repertory Curr Topter Microbial Immunol 229 59-70.
32. **Roiit, Brostff. J. Male, D.D. Whitt.**1994. Bacterial Pathogenesis a molecular Approach Ed American Society Microbiology U:S:A 190-212
33. **Revista Veterinaria México.** Edición 2007 .
34. **Schaechtter, M.G. ang Medoff, and Eiseinter,B.F.** 1993.Mechanisms of Microbial Disease”. Ed Williams & Wilkins U:S:A.
35. **Stefan, H.E., Kaufman, y Kabelitz, D.** 1998. Methods in Microbiology. Ed. Academic Pres U.S.A.
36. **Solis, S.R.** Evaluación de los Efectos Causados por *Escherichia Coli O157:H7* y dos Mutantes en los Génes *Csgd* Y *Cada* Empleando un modelo en conejos. Tesis de Licenciatura.2008.p. 15-20,35-39.
37. **Tarr, B.I., Bilge, S.S.,** 1997. The problem of O157: H7 shiga toxin producing *Eschehrichia coli* infected”
38. **Taylor, F.B., Tesh, V.L., debault, E.T., AL.**1996. Characterization of the baboon responses to shiga –liketoxin: descriptive study of new primate model of toxin responses to Stx1.pp. 6.

39. **Tarr, P. I., M. A. Neill, C. R. Clausen, J. W. Newland, R. J. Neill, and S. L. Mosley.** 1989. Genotypic variation in pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 isolates from patients in Washington, 1984-1987. *J. Infect. Dis.* 159:344-347.
40. **Torres, A. G., and J. B. Kaper.** 2003. Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. *Infect. Immun.* 71:4985-4995.
41. **Valdivia G.** 1995. Desarrollo de un modelo animal en el conejo para el estudio de vero toxina en conejo” FESC UNAM México.
42. **Valdivia, G., Montaras, J.A., Tortora, Peres, J.L.** Linphotoxin effects of verocytotoxin producing *E.coli* in rabbit caecum 3° international symposium and work shop of shiga toxin producing E. coli infection. Baltimore Maryland U.S.A 1997.
43. **Valdivia G.** 2002. Evaluación de las alteraciones inducidas en el conejo por *Escherichia coli* O157:H7 inoculada en el apéndice cecal” Tesis FESC UNAM México. pp52-60
44. **Watson, G.W.R., Redmond, H.P., Wagh, J., Condronc.** Neutrophil Undergo Apoptosis Following Ingestion Of *E.coli* 1996.pp. 3986-3992.